

# Filière Technologies du vivant

## Orientation Technologie alimentaire

# Diplôme 2007

*David Jerjen*

*"Intelligent Packaging"  
Développement d'un tag  
pour les amines biogènes et l'éthanol*

Professeur

Matthias Wuest

Expert

Jean—Luc Luisier

SI	TV	EE	IG	EST
X	X	X	X	

Filière / Studiengang : Life Technologies

Confidentiel / Vertraulich ☐

<b>Etudiant / Student</b> David Jerjen	<b>Année scolaire / Schuljahr</b> 2006/07	<b>No TD / Nr. DA</b> TV/2007/51
<b>Proposé par / vorgeschlagen von</b> HES-SO Valais, DSI		<b>Lieu d'exécution / Ausführungsort</b> HES-SO Valais, DSI  <b>Expert / Experte</b> Jean-Luc Luisier

**Titre / Titel:****"Intelligent Packaging" — Entwicklung eines Tags für Biogene Amine und Ethanol****Description / Beschreibung:**

Intelligente Verpackungen geben Aufschluss über die tatsächliche Frische des Nahrungsmittels und überwachen somit permanent den Zustand des Lebensmittels. Ein Beispiel hierfür sind Etiketten mit Temperatur- und Zeitanzeige, die die Lebensmittelqualität überwachen. Neben Zeit-Temperatur-Indikatoren sind Leck-, Frische- und Toxinindikatoren auf dem Markt.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit soll ein „Tag“ entwickelt werden, mit dem die Frische von Obstsäften und Fischprodukten überwacht werden kann. Grundlage hierfür ist der kürzlich entwickelte Farbstoff CR-546 (N,N-dioctylamino-4'-trifluoroacetyl-2'-nitroazobenzol), welcher mit Aminen und Ethanol farbige Produkte liefert. Alternativ kann der Farbstoff ETH 4001 verwendet werden.

**Objectifs / Ziele:**

- Herstellung einer sensitiven Schicht auf PVC- und Sol-Gel-Basis mit CR-546 und ETH 4001
- Charakterisierung der sensitiven Schichten mittels Reflexionsspektroskopie (Bestimmung der Linearität und Nachweisgrenze gegenüber den Analyten Ethanol und Trimethylamin)
- Integration der Tags in eine Vakuumverpackung (Fischprodukte) und eine Glasflasche (Saft)
- Vergleich des Tags mit klassischen Methoden wie Gesamtkeimzahl bzw. Trimethylaminkonzentration (Fischprodukte) und Ethanolkonzentration (enzymatische Methode für Säfte).

**Signature ou visa / Unterschrift oder Visum**

Leiter Vertiefungsrichtung Lebensmitteltechnologie



Professeur/Dozent: Matthias Wuest



Etudiant/Student:


**Délais / Termine**Attribution du thème / Ausgabe des Auftrags:  
03.09.2007Remise du rapport / Abgabe des Schlussberichts:  
23.11.2007 — 12.00 UhrExposition publique / Ausstellung Diplomarbeiten:  
30.11.2007Défenses orales / Mündliche Verfechtungen  
Woche 49

## « Intelligent Packaging » - Développement d'un tag pour les amines biogènes et l'éthanol

## « Intelligent Packaging » - Entwicklung eines Tags für Biogene Amine und Ethanol

### Objectif

L'objectif est de produire une couche sensitive (tag) à base de PVC et sol-gel avec comme colorant le CR-546 et ETH 4001 ainsi que de les caractériser avec un spectromètre à réflexion (détermination de la linéarité et de la limite de détection par rapport aux analytes éthanol et triméthylamine). Ces tags doivent être intégrés dans un emballage sous vide contenant des produits de pêche et dans une bouteille de verre contenant du jus de fruits. Les résultats doivent être comparés avec les méthodes classiques telles que les germes totaux, respectivement la concentration en triméthylamine pour les produits de pêches, et la concentration d'éthanol pour les jus de fruits avec la méthode enzymatique.

### Résultats

Des faibles concentrations (0.5 %) d'éthanol ne peuvent pas être détectées dans des jus de fruits. Cette concentration se situe à la limite de détection. De plus, il n'est pas possible d'effectuer une mesure absolue sans avoir de référence (réflexion de la solution lorsque elle contient 0 % d'éthanol). Pour la mesure de la fraîcheur des poissons le composé principal est le triméthylamine qui peut être détecté seulement dans des conditions basiques (pH 10). Or, le pH du poisson est plutôt neutre, ce qui rend impossible de donner une information sur sa qualité. De plus, la température vient perturber les mesures en faisant varier les pressions partielles. Toutefois, il est possible de suivre l'évolution d'une fermentation.

### Mots-clés

CR-546, ETH 4001, Jus de fruits, Poisson, Éthanol, Triméthylamine, Tag, Membrane, Couche sensitive, Fermentation, Spin-coating

### Ziel

Das Ziel ist die Herstellung einer sensitiven Schicht (Tags) auf PVC- und Sol-Gel-Basis mit CR-546 und ETH 4001 sowie der Charakterisierung dieser mittels Reflexionsspektroskopie (Bestimmung der Linearität und Nachweisgrenze gegenüber den Analyten Ethanol und Trimethylamine). Die Tags sollen in eine Vakuumverpackung (Fischprodukte) und in eine Glasflasche (Saft) integriert werden. Der Tag soll mit klassischen Methoden wie Gesamtkeimzahl bzw. Trimethylaminkonzentration (Fischprodukte) und Ethanolkonzentration (enzymatische Methode für Säfte) verglichen werden.

### Resultate

Schwache Ethanolkonzentrationen (0.5 %) können nicht erfasst werden, denn sie befinden sich an der Nachweisgrenze. Ausserdem ist es nicht möglich, absolute Messungen durchzuführen ohne eine Referenz (Reflektion der Lösung mit 0 % Ethanol) zu benutzen. Bei der Messung des Trimethylamins um die frische des Fisches zu bestimmen, kann dies nur bei einem alkalischen pH ausgeführt werden (pH 10). Fisch hat einen neutralen pH und deshalb kann die Qualität nicht gemessen werden. Zudem muss berücksichtigt werden, dass die Temperatur den Partialdruck beeinflusst und das wiederum die Messergebnisse. Dennoch ist es möglich, den Fermentationsverlauf zu verfolgen.

### Schlüsselwörter

CR-546, ETH 4001, Fruchtsaft, Fisch, Ethanol, Trimethylamine, Tag, Membran, Sensitive Schicht, Fermentation, Spin-coating

## Travail de diplôme

### « Intelligent Packaging » - Développement d'un tag pour les amines biogènes et l'éthanol

#### Résumé :

Des couches sensibles à base de PVC et avec le procédé sol-gel sont produites avec le colorant CR-546 et ETH 4001 qui changent de couleur en présence d'éthanol et d'amines. Les membranes sont caractérisées par réflexion avec le spectromètre à fibre optique. Ces membranes doivent ensuite être intégrées dans des emballages d'aliments (emballage sous-vide pour du poisson et bouteille en verre pour un jus de fruit) afin de déterminer la fraîcheur en mesurant la phase gazeuse. Les résultats obtenus sont comparés à des méthodes classiques. La membrane a été incorporée dans le couvercle d'un vial et celui-ci rempli d'une solution d'analyte, ou d'un aliment, et mesuré par le spectromètre à fibre optique.

Des faibles concentrations (0.5 %) d'éthanol ne peuvent pas être détectées dans des jus de fruits. Cette concentration se situe à la limite de détection. De plus, il n'est pas possible d'effectuer une mesure absolue sans avoir de référence (réflexion de la solution lorsque elle contient 0 % d'éthanol). La référence dépend de facteurs tels que la distance entre la fibre optique et la membrane qui doit être constante. Pour la mesure de la fraîcheur des poissons, le composé principal est le triméthylamine qui peut être détecté seulement dans des conditions basiques (pH 10). Or le pH du poisson est plutôt neutre, ce qui rend impossible de donner une information sur sa qualité. De plus, la température vient perturber les mesures en faisant varier les pressions partielles.

Les membranes ne sont pas capables de donner des informations sur la qualité des aliments testés. Toutefois, elles pourraient être utilisées pour suivre l'évolution d'une fermentation de manière qualitative.

**David Jerjen**

Mandat : HES-SO Valais, DSI

Professeur : Matthias Wüst

Expert : Jean-Luc Luisier

Filière : Technologie du vivant

Orientation : Technologie alimentaire

Lieu d'exécution : HES-SO Valais, DSI

Date d'exécution : 3 septembre au 23 novembre 2007

Remise du rapport : 23 novembre 2007



## Tables des matières

<b>TABLES DES MATIÈRES .....</b>	<b>2</b>
<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>4</b>
1.1. Objectifs du travail .....	4
1.2. Introduction générale.....	4
1.3. Tag pour éthanol et amine biogène.....	5
1.3.1. Les colorants et leur fonctionnement .....	5
1.3.2. Incorporation du colorant.....	6
1.3.2.1. Principe du procédé sol-gel.....	6
1.3.3. Résultats dans la littérature pour l'absorbance .....	7
1.4. L'altération dans les jus de fruits .....	9
1.4.1. Respiration et fermentation des levures.....	10
1.5. L'altération dans le poisson .....	10
1.5.1. Histamine .....	11
1.6. Mesure de la réflexion avec un spectromètre.....	12
<b>2. MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>14</b>
2.1. Fabrication d'un capteur avec le procédé sol-gel .....	14
2.1.1. Matériels.....	14
2.1.2. Méthode .....	14
2.2. Fabrication d'un capteur à base de papier filtre .....	15
2.2.1. Matériels.....	15
2.2.2. Méthode .....	15
2.3. Fabrication de la membrane à base de PVC.....	16
2.3.1. Matériels.....	16
2.3.2. Méthode .....	16
2.4. Mesures du headspace avec le spectromètre à fibre optique .....	18
2.4.1. Matériels.....	18
2.4.2. Méthode générale .....	18
2.4.3. Solution de calibration .....	20
2.4.3.1. Matériel .....	20
2.4.3.2. Méthode .....	20
2.4.4. Mesures d'aliment .....	21
2.4.4.1. Matériel .....	21
2.4.4.2. Méthode .....	21
<b>3. RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>23</b>
3.1. Tag à base de papier filtre.....	23
3.1.1. Mesure de réflexion avec de l'éthanol.....	23
3.2. Tag fabriqué avec le procédé sol-gel .....	25
3.3. Tag à base de PVC avec le colorant CR-546.....	25
3.3.1. Influence de la hauteur entre la fibre optique et la membrane .....	26
3.3.2. Courbe de calibration avec de l'éthanol .....	28
3.3.3. Influence de la température.....	31

---

3.3.4.	Mesure d'eau déminéralisée .....	33
3.3.5.	Mesures de fermentations de jus de fruits dans un vial .....	35
3.3.5.1.	Jus d'orange.....	35
3.3.5.2.	Jus de raisin .....	37
3.3.5.3.	Jus de pomme.....	38
3.3.5.4.	Comparaison des fermentations de jus de fruits .....	40
3.3.6.	Mesure d'un jus de raisin dans une bouteille .....	41
3.3.7.	Mesure d'altération d'un poisson.....	45
3.4.	Estimation du coût pour un appareil de mesure spécifique .....	47
<b>4.</b>	<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>48</b>
<b>5.</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>49</b>
<b>6.</b>	<b>ANNEXES.....</b>	<b>50</b>

# 1. Introduction

## 1.1. *Objectifs du travail*

L'objectif de ce travail est de produire une couche sensitive (tag) à base de PVC (Polyvinyl chloride) et sol-gel avec comme colorant le CR-546 et ETH 4001. De l'éthanol ou des amines peuvent se lier à ces couches sensibles et faire changer la couleur de celles-ci. Ces changements doivent être caractérisés avec un spectromètre à fibre optique. Plus précisément, la linéarité et la limite de détection pour l'éthanol et le triméthylamine doivent être déterminées. Ces tags doivent être intégrés dans un emballage sous vide contenant des produits de pêche et dans une bouteille de verre contenant du jus de fruits afin de mesurer l'éthanol et les amines dans la phase gazeuse. Les résultats sont comparés avec ceux obtenus par des méthodes classiques telles que les germes totaux, respectivement la concentration en triméthylamine pour les produits de pêches, et la concentration d'éthanol pour les jus de fruits avec la méthode enzymatique.

## 1.2. *Introduction générale*

L'industrie agroalimentaire doit sans cesse s'améliorer pour satisfaire les consommateurs. Beaucoup de ces améliorations concernent directement l'industrie agroalimentaire, tel que le procédé de fabrication ou la formulation du produit, mais il y a aussi certaines améliorations qui la concernent indirectement. Il s'agit entre autres des emballages. Il en existe toute une gamme allant du simple carton à œufs qui protège son contenu aux emballages de cafés autochauffants. Actuellement, les emballages actifs (exemple : produit sous atmosphère modifiée) sont capables de protéger une perte de qualité ou de prolonger la date limite de conservation. La nouvelle génération d'emballages, les emballages intelligents, devront être capables d'indiquer et de surveiller la qualité du produit pendant le transport et le stockage. Présentement, la fraîcheur et la qualité sont surtout assurées grâce à la date limite de consommation (DLC), mais celle-ci est imprécise, car elle varie en fonction des conditions extérieures où le produit est entreposé. Il est donc possible de se retrouver avec un produit périmé dont la DLC n'est pas encore dépassée. L'inverse, c'est-à-dire que la DLC est dépassée, mais que le produit n'est pas périmé, est également possible. Dans les deux cas, le commerçant est pénalisé : dans le premier, il se retrouve avec un client insatisfait, et dans le deuxième il va peut-être jeter un produit non périmé. Sur le marché se trouvent déjà des indicateurs de temps-températures, fuites, fraîcheur et toxines. Incorporer un indicateur dans un emballage d'aliment permet non seulement de rassurer les clients, mais c'est aussi un argument de vente. Une des difficultés est d'incorporer l'indicateur dans l'emballage, car l'emballage doit coûter au maximum 10 % du prix de vente du produit. L'autre problème majeur est que les composants, spécialement le plastifiant, ont tendance à migrer dans le produit si celui-ci est en contact direct avec l'indicateur. [1] [2] [3] [4]

### 1.3. Tag pour éthanol et amine biogène

#### 1.3.1. Les colorants et leur fonctionnement

Les colorants utilisés sont le N,N-dioctylamino-4'-trifluoroacethyl-2'nitroazobenzene (Chromoreactand CR-546) et le 4-(Dioctylamino)-4'-(trifluoroacetyl)azobenzene (ETH 4001) (figure 1.1).

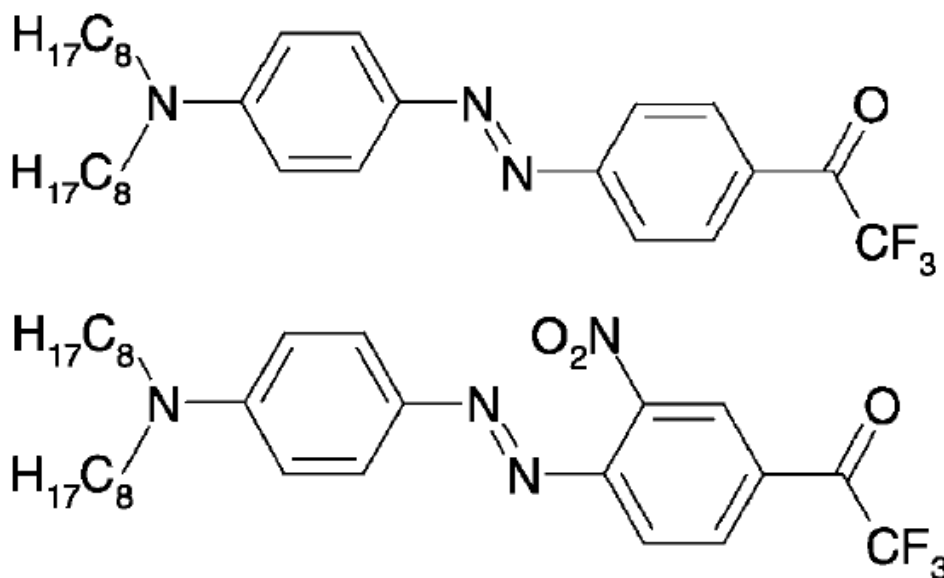


Figure 1.1 : ETH 4001 (en haut) et CR-546 (en bas)

Le groupe trifluoroacétyle qui est présent dans les deux colorants peut soit réagir avec des amines primaires et secondaires afin de former un hémiaminale, soit avec des amines tertiaires pour former une paire d'ions d'ammonium quaternaire, soit avec des alcools, thiols, phénols et thiophénols pour former un hémiacétale ou diol (figure 1.2).

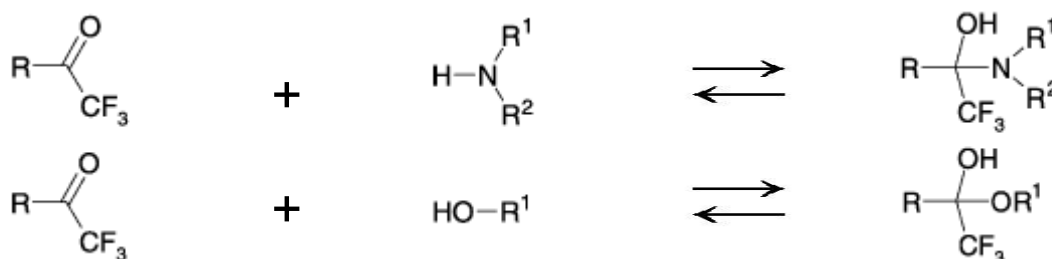


Figure 1.2 : Réaction du groupe trifluoroacétyle avec différents analytes

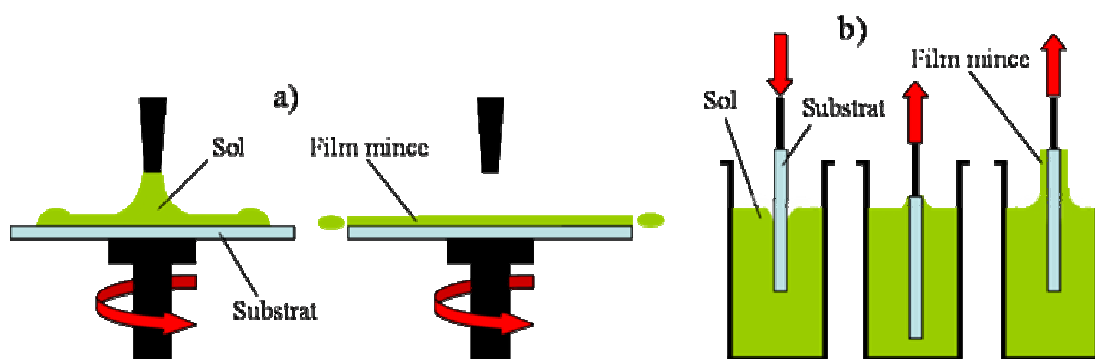
Le colorant CR-546 est 20 fois plus sensible que le colorant ETH 4001. Avec le colorant CR-546 une diminution d'absorbance aux environs de 556 nm et une augmentation d'absorbance aux environs de 482 nm peut être observée. Avec le colorant ETH 4001 la diminution d'absorbance est visible aux alentours de 497 nm et l'augmentation aux alentours de 424 nm. [5]



### 1.3.2. Incorporation du colorant

Les colorants peuvent être incorporés dans/sur trois supports différents. Le support le plus simple est le papier filtre. Le colorant qui est mélangé avec un solvant et un papier filtre est trempé dans ce mélange. Les deux autres supports sont le poly(vinyl chloride) ou un polymère obtenu par le procédé sol-gel. Afin de passer d'une solution liquide à une couche mince deux procédés peuvent être appliqués. Il s'agit du spin-coating (centrifugation) et dip-coating (trempage).

La figure 1.3 représente le schéma du principe pour les procédés sol-gel, mais il est également valable pour la fabrication des membranes à base de PVC, surtout le spin-coating. [6]



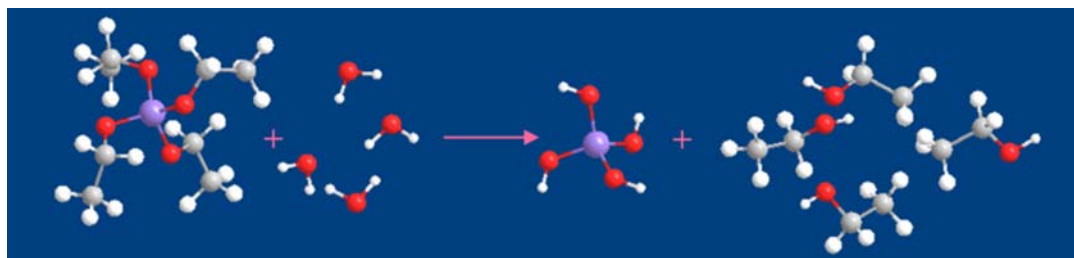
**Figure 1.3 :** Schéma représentant le principe a) de la centrifugation et b) du trempage pour la préparation de film mince à partir de solutions avec une plaque de verre comme substrat

#### 1.3.2.1. Principe du procédé sol-gel

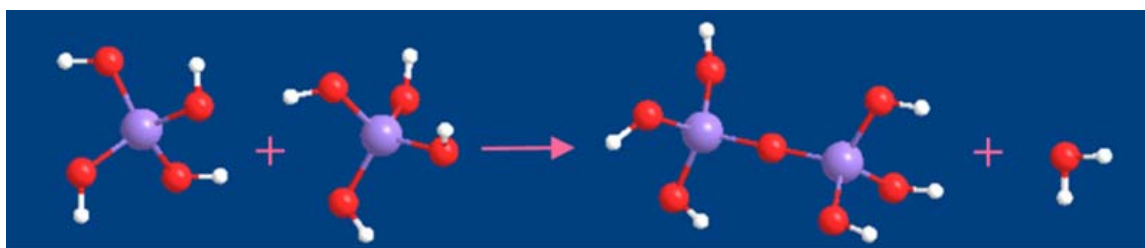
Le procédé sol-gel permet de fabriquer un polymère inorganique par des réactions chimiques simples et à une température proche de la température ambiante (20 à 150 °C). La synthèse est effectuée à partir d'alkoxydes de formule  $M(OR)_n$  où M est un métal ou le silicium et R un groupement organique alkyle  $C_nH_{2n+1}$ .

Un des intérêts de ce procédé est que ces précurseurs existent pour un grand nombre de métaux et non-métaux. Ils sont soit liquides, soit solides. Dans ce cas, ils sont pour la plupart solubles dans des solvants usuels. Il est donc possible de préparer des mélanges homogènes, des monomères (précurseurs) ou oligomères.

Les réactions chimiques simples à la base du procédé sont déclenchées lorsque les précurseurs sont mis en présence d'eau : l'hydrolyse des groupements alkoxy (figure 1.4) intervient tout d'abord, puis la condensation des produits hydrolysés (figure 1.5) conduit à la gélification du système. [6]



**Figure 1.4** : Schéma réactionnel de l'hydrolyse du tétraéthoxysilane ( $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ )



**Figure 1.5** : Schéma réactionnel de la condensation de deux groupements silanols

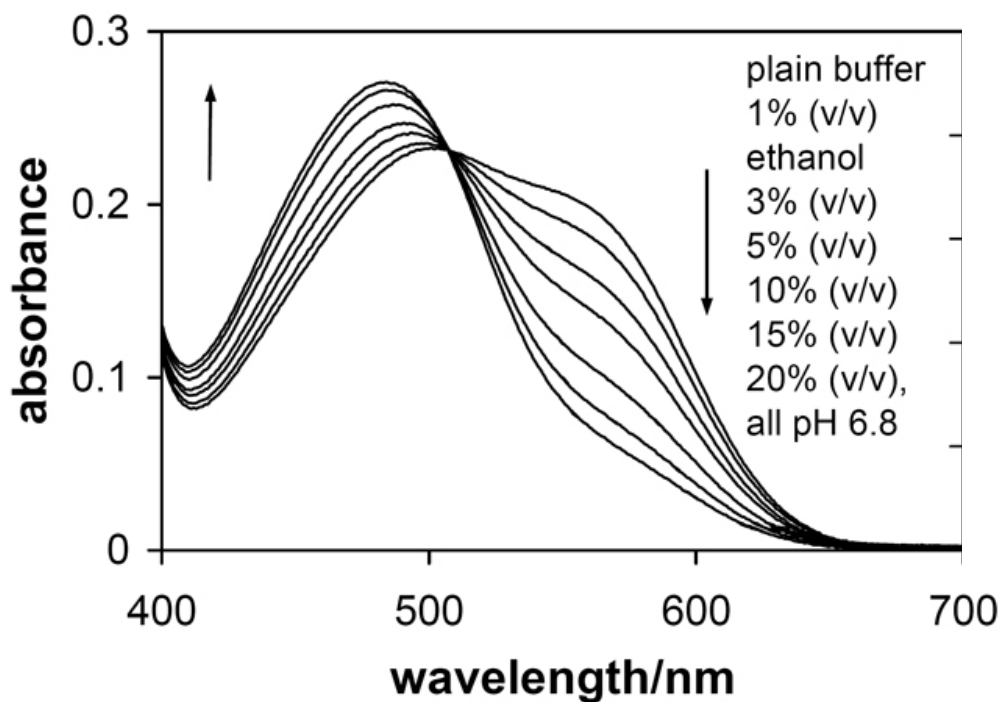
### 1.3.3. Résultats dans la littérature pour l'absorbance

Le colorant CR-546 est mélangé avec du poly(vinyl chloride) et du plastifiant afin de former une membrane sur une plaque de verre avec un spin-coating device. La membrane est réversible, a une épaisseur de 2-6 microns et une durée de vie de 6 mois si elle est stockée à l'abri de la lumière et à température ambiante. Des résultats obtenus avec cette membrane, en mesurant l'absorbance dans des solutions d'éthanol, sont décrits dans la littérature.

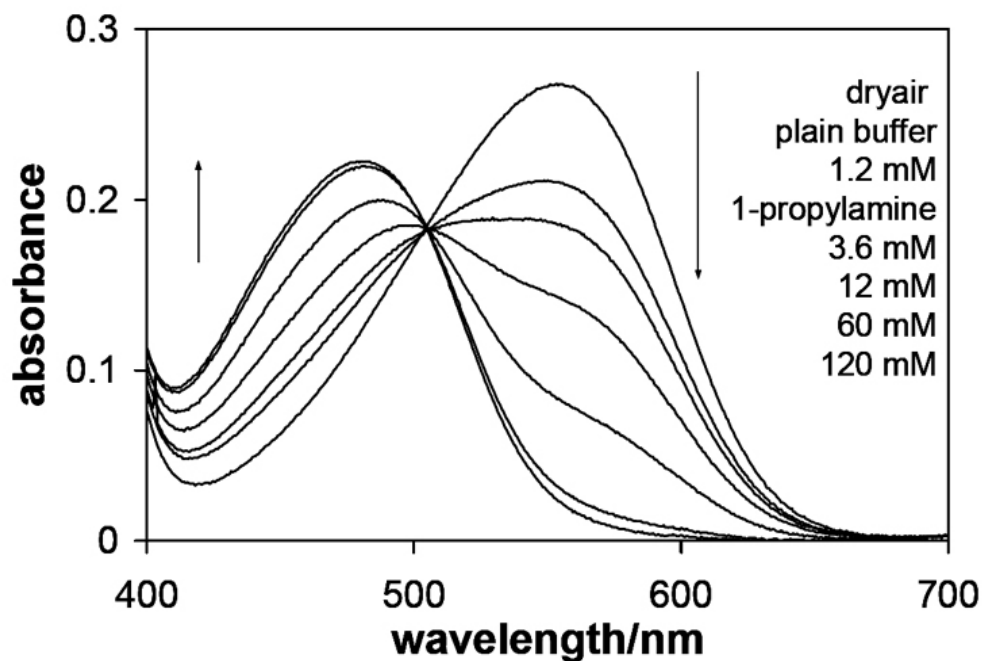
Les changements de l'absorbance sont de pourpre à jaune. Le temps d'attente pour avoir une réponse est dans la gamme de 20 à 40 min. La calibration est linéaire pour des concentrations allant de 1 à 15 % (v/v) avec une limite de détection de 0.1 % (v/v) pour de l'éthanol dans une solution aqueuse (figure 1.6). [7]

Ce même colorant réagit aussi avec des amines si elles sont en forme gazeuse ou que le pH est supérieur à 10, afin d'être sûr que les amines dissoutes ne sont pas protonées. Par exemple, pour du 1-propylamine aqueux tamponné à pH 13, des concentrations de 0.5 à 50 mM avec une limite de détection de 0.1 mM sont mesurables (figure 1.7). Le temps de réponse se situe entre 2 à 10 minutes pour les réactions. [8]

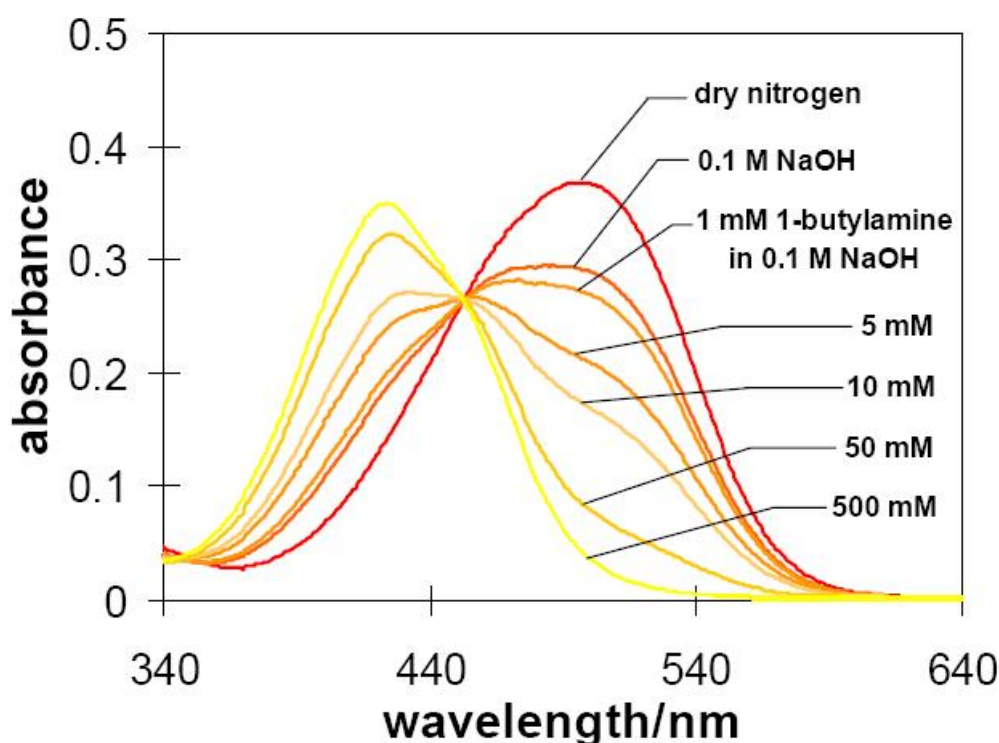
Pour le colorant ETH 4001 des résultats similaires sont également décrits. Le temps de réaction pour du 1-butylamine est de 2 à 6 minutes. La limite de détection se situe aux environs de 0.3 mM et des concentrations allant de 0.5 mM à 50 mM peuvent être mesurées (figure 1.8). [9]



**Figure 1.6 :** Changement d'absorbance du colorant CR-546 en contact direct avec de l'éthanol dans une solution tampon pH 6.8



**Figure 1.7 :** Changement d'absorbance du colorant CR-546 en contact direct avec du 1-propylamine dans une solution tampon pH 13



**Figure 1.8 :** Changement d'absorbance du colorant ETH 4001 en contact direct avec du 1-butylamine dans une solution tampon pH 13

#### 1.4. *L'altération dans les jus de fruits*

Selon l'ordonnance du DFI du 23 novembre 2005 sur les boissons sans alcool (en particulier thé, infusions, café, jus, sirops, limonades), la teneur en alcool éthylique des boissons sans alcool ne doit pas dépasser 0.5 % du volume. [10] Une des altérations les plus fréquentes dans les boissons non alcoolisées du type jus de fruits est la formation d'éthanol par des levures. D'autres microorganismes tels que les bactéries sont beaucoup plus rares, car le pH des jus de fruits se situe souvent dans un domaine acide, ce qui, contrairement aux levures, n'est pas favorable aux bactéries. En général, si la bouteille est remplie à chaud, le risque est faible, car les levures sont faciles à inactiver avec de la chaleur. Une bouteille mal fermée lors de sa production ou encore un emballage pas étanche peuvent permettre la pénétration de levures puis la fermentation éthylique. Il est difficile de reconnaître une fermentation si la bouteille est fermée. Toutefois, le jus devient trouble, et la formation de bulles peut être constatée. Lors de la fermentation, le sucre est transformé en éthanol, mais aussi en gaz carbonique, ce qui fait augmenter la pression à l'intérieur de la bouteille. C'est donc seulement en ouvrant la bouteille qu'il peut être constaté si oui ou non il y a eu fermentation éthylique. Pour connaître la qualité du jus il serait donc intéressant de pouvoir connaître la concentration d'éthanol sans avoir à ouvrir la bouteille, d'où l'intérêt d'incorporer un tag dans l'emballage. [11]

### 1.4.1. Respiration et fermentation des levures

Toutes les levures sont capables de dégrader le glucose, le fructose et le mannose en présence d'oxygène, par un métabolisme oxydatif conduisant à la formation de CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O.

Respiration aérobie :  $C_6H_{12}O_6$  (glucose) + 6 O<sub>2</sub> → 6 CO<sub>2</sub> + 6 H<sub>2</sub>O + énergie utilisable (36-38 ATP)

Cette voie métabolique est très énergétique et permet aux cellules une importante multiplication. En plus des sucres simples, certaines levures peuvent utiliser d'autres glucides (mono, di ou trisaccharides, voir des polysaccharides comme l'amidon) mais aussi des alcools, des acides ou des alcanes.

En plus du métabolisme oxydatif, certaines levures peuvent privilégier une dégradation des glucides par un métabolisme fermentatif qui conduit à la formation d'éthanol et de CO<sub>2</sub> suivant la réaction :

Fermentation alcoolique :  $C_6H_{12}O_6$  (glucose) → 2 CO<sub>2</sub> + 2 CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH (éthanol) + énergie utilisable (2 ATP)

En plus de ces composés majoritaires, des alcools supérieurs, des aldéhydes, des esters, des acides, etc. sont formés en plus petites quantités et participent qualitativement de façon importante et complexe à la formation des saveurs des boissons fermentées. Ce métabolisme est moins énergétique que le métabolisme oxydatif. Ainsi, la multiplication cellulaire en est affectée mais a l'avantage de fonctionner même en anaérobiose. [12]

De plus, deux effets doivent être pris en considération. Selon l'effet Pasteur, en présence d'oxygène, les levures utilisent la voie respiratoire (métabolisme oxydatif) tandis qu'en absence d'oxygène, les levures utilisent la voie fermentative (métabolisme fermentatif) où la production d'éthanol a lieu. Toutefois, un cas particulier existe. Il s'agit de l'effet Crabtree avec lequel, si une concentration élevée en glucose est présente dans un milieu en aérobie (par exemple dans un jus de fruits) la voie fermentative des levures est quand même favorisée. [13]

## 1.5. L'altération dans le poisson

Les poissons contiennent 40-120 mg d'oxyde de triméthylamine (TMAO) par 100 g qui est utilisé pour la régulation de la pression osmotique. Après la mort du poisson, le TMAO est réduit par des bactéries d'altération en triméthylamine (TMA) qui est responsable de « l'odeur du poisson ». Une partie du TMA est décomposée par des enzymes en diméthylamine (DMA) et formaldéhyde. La fraction amine du poisson est composée de TMA, DMA, méthylamine, ammoniacque et des amines biogènes formés par la décarboxylation des acides aminés. Lorsque le poisson est vivant, il possède déjà une faible concentration en TMA, DMA et ammoniacque. Ces trois composés augmentent en fonction du temps. [14]

Puisque le poisson altéré n'a plus d'utilisation commerciale, des méthodes fiables pour déterminer sa qualité sont de grande importance pour le producteur et le consommateur. Du point de vue analytique, il existe trois groupes de substances (indicateurs de fraîcheur) qui sont particulièrement intéressants:

Teneur en azote basique volatil total (total volatile nitrogenous bases – TVB-N)

Teneur en TMAO

Teneur en amines biogènes (histamine, putrescine et cadaverine) [15]

Parmi ces trois groupes, il existe, en Suisse, seulement l'ordonnance du DFI du 26 juin 1995 sur les substances étrangères et les composants dans les denrées alimentaires (OSEC) qui définit une valeur de tolérance de 100 mg/kg et une valeur limite de 500 mg/kg pour l'histamine qui est une amine biogène. [16]

Dans l'Union Européen, il existe aussi une valeur limite pour l'histamine, mais en plus une valeur limite pour TVB-N. Celle-ci se situe entre 25 à 35 mg d'azote par 100 g de chair de poisson en fonction de l'espèce. [17]

Les méthodes qui sont actuellement utilisées pour déterminer de manière analytique la fraîcheur sont longues et coûteuses. L'utilisation d'un indicateur pourrait éventuellement remplacer les méthodes telles que la chromatographie ionique ou la distillation d'un extrait déprotéinisé par l'acide perchlorique.

Il est à noter que le terme « fraîcheur du poisson » est complexe. Un poisson peut être considéré comme « frais » tant que l'ensemble de ses propriétés sont proches de celles avant la mort du poisson ou qu'il vient d'être capturé. Toutefois, la fraîcheur ne peut pas être facilement mesurée ni bien définie. Pour cela, il faut définir de combien les propriétés peuvent dériver par rapport à un poisson vivant et il faut connaître quel facteurs environnementaux ont quelles influences. Selon les cultures, un poisson stocké sur glace peut être considéré comme frais pendant 3 jours ou même jusqu'à 7-15 jours. Le tout est compliqué par le fait que les teneurs initiales et l'évolution de celles-ci dépendent entre autres de la famille du poisson. Il est donc presque plus juste de parler de qualité que de fraîcheur, d'autant plus que, par exemple, la limite de TVB-N pour la morue est atteinte seulement après un stockage d'environ 15 jours dans la glace et qu'à ce moment le poisson est de mauvaise qualité. [18]

### **1.5.1. Histamine**

Lorsque certains poissons, en particulier des *scombroïdes* (exemple : le thon, la bonite et le maquereau), commencent à se décomposer, de l'histamine est libérée. L'histidine, acide aminé d'origine naturelle, est transformée en histamine par un enzyme produit par certaines bactéries. Les poissons ayant de la viande rouge ont des teneurs élevées en histidine qui se situe entre 0.6 - 1.3 %. À petites doses, l'histamine est nécessaire au bon fonctionnement du système immunitaire humain, mais elle peut déclencher une réaction allergique grave lorsqu'elle est absorbée en doses élevées. La présence de teneurs élevées en histamine dans un poisson indique toujours que la décomposition a commencé, même si elle n'est pas visible. Des quantités toxiques d'histamine peuvent être présentes avant que l'odeur ou le goût du poisson ne soit désagréable.



Les poissons appartenant aux familles des *Scombridés* et des *Scombérésocidés*, dits poissons-scombroïdes, sont la source la plus courante de l'intoxication à l'histamine et sont des poissons à viande rouge. Ils contiennent des teneurs élevées en histidine libre qui peut être transformée en histamine à l'entreposage. L'intoxication à l'histamine peut aussi être causée par le makaire et des poissons d'autres familles, comme les *Clupéidés* (hareng, sardine) et les *Coryphénidés* (mahi-mahi), ou même par des aliments comme le fromage. La formation d'histamine chez le poisson dépend de la température à laquelle il est conservé à partir du moment de la capture jusqu'à la consommation. Par conséquent, afin d'éviter l'intoxication à l'histamine, il est très important que le poisson soit réfrigéré lors du transport et de l'entreposage. La cuisson ou tout autre traitement thermique (comme la mise en conserve et le fumage) ne détruisent pas l'histamine. [19]

### 1.6. Mesure de la réflexion avec un spectromètre

La réflexion de la lumière peut être spéculaire ou bien diffuse suivant la nature de l'interface. La réflexion diffuse (figure 1.9) intervient sur les interfaces irrégulières, la lumière est réfléchie dans un grand nombre de directions et l'énergie du rayon incident est redistribuée dans une multitude de rayons réfléchis.

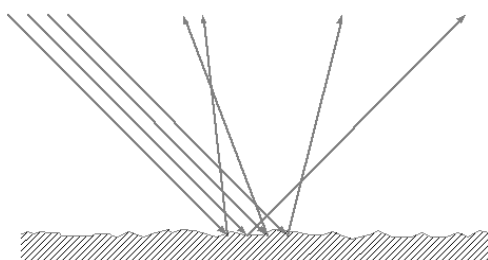


Figure 1.9 : Réflexion diffuse sur une interface irrégulière

La réflexion est dite spéculaire (figure 1.10) lorsque le rayon incident donne naissance à un rayon réfléchi unique. Idéalement, l'énergie du rayon incident se retrouve totalement dans le rayon réfléchi. En pratique, une partie de l'énergie peut être absorbée ou diffusée au niveau de l'interface.

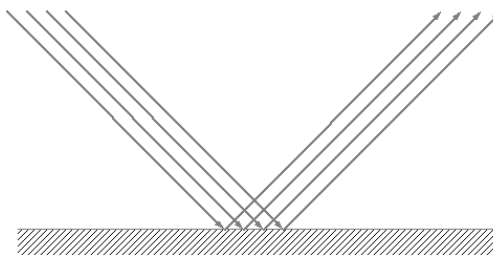


Figure 1.10 : Réflexion spéculaire sur une interface régulière

La qualité de la réflexion dépend de la qualité de l'interface. Dès que la taille des défauts de l'interface est inférieure ou de l'ordre de grandeur de la longueur d'onde, l'interface tend à devenir parfaitement réfléchissante. C'est pourquoi une surface de métal brut qui diffuse fortement devient parfaitement réfléchissante quand on la polit (on l'abrase jusqu'à ce que la taille des défauts soit comparable à la longueur d'onde de la lumière). Dans le cas d'une membrane en PVC les deux types de réflexion sont présents. [20]

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. *Fabrication d'un capteur avec le procédé sol-gel*

#### 2.1.1. Matériels

*N,N*-Dioctyl-4-[4-(trifluoroacetyl)phenylazo] (ETH 4001), Fluka 18596

Methyltriethoxysilane (MTriEOS), Fluka 69435

Tetraethyl orthosilicate (TEOS), Aldrich 333859

Ammonium hydroxide solution 0.1M (NH<sub>4</sub>OH), HES-SO Valais/Wallis Sion

Nitric acid 65 % PA, Pharmacochimie

Ethanol absolut, Ranreac 361086-1612

Ultrasonic cleaner VWR, model USC100TH, Leaven, Belgium

Microscope Cover Glasses 15 x 15 x 0.13 mm<sup>3</sup> (10.0360.02), Menzel GmbH + Co KG, Braunschweig, Germany

Vial 20 ml

#### 2.1.2. Méthode

La méthode utilisée pour fabriquer le capteur a été adaptée à celle utilisée par Š. M. Korent [21].

9 mg de ETH 4001 sont pesés et 4.2 ml d'éthanol sont ajoutés dans un vial, puis mélangés pendant 10 min dans un bain à ultra-son. Le vial est complété avec 0.219 ml de MTriEOS et 0.142 ml de TEOS et le tout est à nouveau mélangé dans un bain à ultra-son pendant 10 min. 0.5 ml de NH<sub>4</sub>OH 0.1 M sont ajoutés pour catalyser la réaction. Le tout est mélangé dans un bain à ultra-son pendant 60 min. Cette durée est nécessaire pour éviter la séparation en deux phases liquides.

Le mélange est vieilli à température ambiante pendant 4-5 jours dans le vial fermé.

En parallèle, les verres sont traités avec de l'acide nitrique afin d'activer les groupes silanols à leur surface. Le traitement dure 24 h dans de l'acide nitrique concentré (65 %). Les plaques de verre sont ensuite nettoyées avec de l'eau déminéralisée et de l'éthanol, puis séchées à 100 °C pendant 3 h.

Une fois le gel à maturation, les plaques de verre sont trempées dans le gel. Un côté est nettoyé, puis les plaques de verre sont séchées pendant 24 h à température ambiante avant d'être séchées 24 h à 70 °C.

## 2.2. *Fabrication d'un capteur à base de papier filtre*

### 2.2.1. Matériels

N,N-dioctylamino-4'-trifluoroacetyl-2'-nitroazobenzene (Chromoreactand CR-456) Selectophore, Fluka 08709

N,N-Dioctyl-4-[4-(trifluoroacetyl)phenylazo] (ETH 4001), Fluka 18596

Tetrahydrofuran (THF), Fluka 87370

Papier-filtre avec un diamètre de 9 cm, Nr. 589<sup>3</sup>, Schleicher & Schnell AG, Feldbach, Schweiz  
Bâton de colle Power Pritt, Henkel

Tube Eppendorf 1.5 ml

Papier noir mat

### 2.2.2. Méthode

Les colorants (CR-546 et ETH 4001) sont mélangés avec du solvant (THF) dans un tube Eppendorf de 1.5 ml avec les rapports suivant :

1 mg de CR-546 pour 0.7 ml de THF (pf 1)

9 mg d'ETH 4001 pour 0.7 ml de THF (pf 2)

1 mg d'ETH 4001 pour 0.7 ml de THF (pf 3)



**Figure 2.1:** Papier filtre dans tube

Le papier filtre est coupé afin d'obtenir des bandes de ~7 mm de large et ~21 mm de long. La bande de papier filtre est plongée dans la solution. Il est important que le papier ne touche pas le bord du tube (figure 2.1). Le tube doit être tenu à l'horizontale et il est tourné autour de son axe longitudinal pendant 5 min. Les bandes de papier filtre imprégnées sont séchées pendant au moins 20 min à température ambiante. Pendant le séchage la bande de papier filtre ne doit en aucun cas être en contact avec une quelconque surface, sinon une décoloration peut être observée aux points de contact.

Des rondelles en papier noir mat de la taille du septum du vial sont trouées en leur centre (4 mm de diamètre). Des carrés de 7 mm de côtés sont obtenus en coupant la bande de papier filtre imprégné. Ces carrés sont fixés avec de la colle afin de boucher le trou au centre d'une rondelle noire. Celle-ci sont à leur tour fixées dans le couvercle du vial.

## **2.3. Fabrication de la membrane à base de PVC**

### **2.3.1. Matériels**

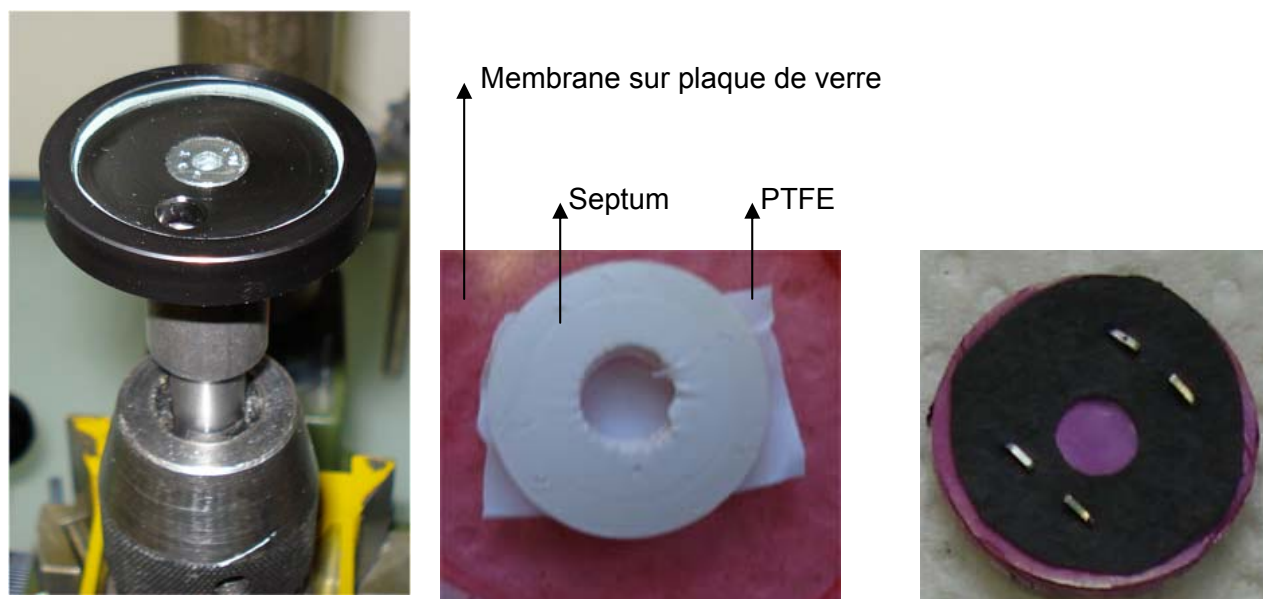
N,N-dioctylamino-4'-trifluoroacetyl-2'-nitroazobenzene (Chromoreactand CR-456)  
Selectophore, Fluka 08709  
N,N-Dioctyl-4-[4-(trifluoroacetyl)phenylazo] (ETH 4001), Fluka 18596  
Tridodecylmethylammonium chloride Selectophore, Fluka 91661  
2-nitrophenyloctyl ether (NPOE) Selectophore. Fluka 73732  
Poly(vinyl chloride) (PVC, high molecular weight) Selectophore, Fluka 81392  
Tetrahydrofuran (THF), Fluka 87370  
Vortex, Heidolph Reax 2000, Schwabach, Germany  
Balance Mettler AE240 et M3  
Plaques de verre avec un diamètre d'environ 4 cm et 3 mm d'épaisseur, fabriquées sur mesure par Barman et Nanzer, Sion, Switzerland  
Perceuse Metabo avec colonne Proxxon, Nürtingen, Germany  
Plate-forme en Ertacetale se fixant dans la perceuse et tenant le verre, fabriqué par l'atelier mécanique de la HES-SO Valais//Wallis Sion  
PTFE Thread Seal Tape (Art. Nr. 1715.1), Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Germany  
Papier noir mat  
Vial de 20 ml

### **2.3.2. Méthode**

La méthode utilisée pour fabriquer la membrane a été adaptée à celle utilisée par M. Mohr [22].

40 mg de PVC, 1 mg de CR-546 ou ETH 4001 et 0.2 mg de tridodecylmethylammonium chloride sont mis dans un tube à fond plat refermables de 2 ml. Ensuite, 80 mg de NPOE sont ajoutés. La solution est mélangée tout doucement afin que ça ne gicle pas dans les bords, pendant au moins 5 min. Une fois que le NPOE a pénétré et ramolli le PVC, 0.7 ml de THF sont ajoutés, puis immédiatement vortexés pendant 2 min. Avec une micropipette, 0.2 ml de la solution sont pipettés rapidement sur la plaque en verre tournant à environ 560 tour/min, puis la membrane est séchée à température ambiante pendant au moins 20 min.

Une couche de PTFE ou papier filtre et la membrane sont transférés sur un septum de vial perforé (diamètre de 6 mm). La membrane est coincée avec un autre septum également perforé (diamètre de 8 mm) au milieu, puis les deux septums sont agrafés ensemble et immobilisés dans le bouchon du vial. Une variante est de remplacer le 2<sup>ème</sup> septum par une rondelle en papier noir mat. (figure 2.2).



**Figure 2.2** : Étapes de la fabrication de la membrane – à gauche spin-coating device – au centre ordre de montage de la membrane (membrane sur PTFE sur septum) – à droite résultat final

Une autre manière de produire des membranes est de pipetter la solution (0.1 ml au lieu de 0.2 ml) directement sur une bande PTFE fixée sur la plaque en verre au lieu de le faire sur le verre. De plus, au lieu de coincer la membrane entre deux septums, la coincer entre un septum (avec un trou en son centre d'un diamètre de 6 mm) et une rondelle en papier noir mat (avec un trou en son centre d'un diamètre de 4 mm). Le tout tenu par 2 agrafes (figure 2.3). Ceci a comme avantage de faciliter l'incorporation dans le vial et la résistance physique de la membrane est augmentée.



**Figure 2.3** : Étapes de la fabrication de la membrane – à gauche résultat après le spin-coating – au centre membrane fixée sur le septum – à droite membrane montée dans le couvercle du vial



## **2.4. Mesures du headspace avec le spectromètre à fibre optique**

### **2.4.1. Matériels**

The Ocean Optics, Dunedin FL 34698, USA :  
Tungsten halogen lamp LS-1  
Étalon de référence, blanc WS-1  
Fibre optique QR450-7-XSR, Reflection/backscattering probe  
Spectromètre USB2000  
Logiciel SpectraSuite avec Java 1.4.2\_09

### **2.4.2. Méthode générale**

La membrane/papier-filtre qui est coincée dans le couvercle d'un vial est mesurée en réflexion avec un spectromètre à fibre optique. Une variante est d'utiliser une bouteille d'un litre au lieu d'un vial. La fibre optique est entourée par du carton noir mat et en son centre se trouve le vial. De plus, pour augmenter la précision, la fibre est fixée sur un axe mobile qui vient se poser sur un autre axe fixe. Ceci permet d'avoir toujours la même différence de hauteur entre la fibre et la membrane. La fibre est placée à moins d'un millimètre de la membrane et les mesures sont effectuées avec le logiciel SpectraSuite (Figure 2.4). Avant de pouvoir effectuer une mesure, une référence (WS-1) ainsi que le spectre noir (pour cela : débrancher la fibre optique qui sort de la source lumineuse) doivent être prises. La même référence et le même spectre noir sont utilisés pour tous les essais. SpectraSuite donne directement le résultat en pourcent de réflexion grâce à la formule suivante :

$$\%T = \frac{S_{\lambda} - D_{\lambda}}{R_{\lambda} - D_{\lambda}} * 100$$

Où,

$S_{\lambda}$  = Intensité de l'échantillon à la longueur d'onde  $\lambda$

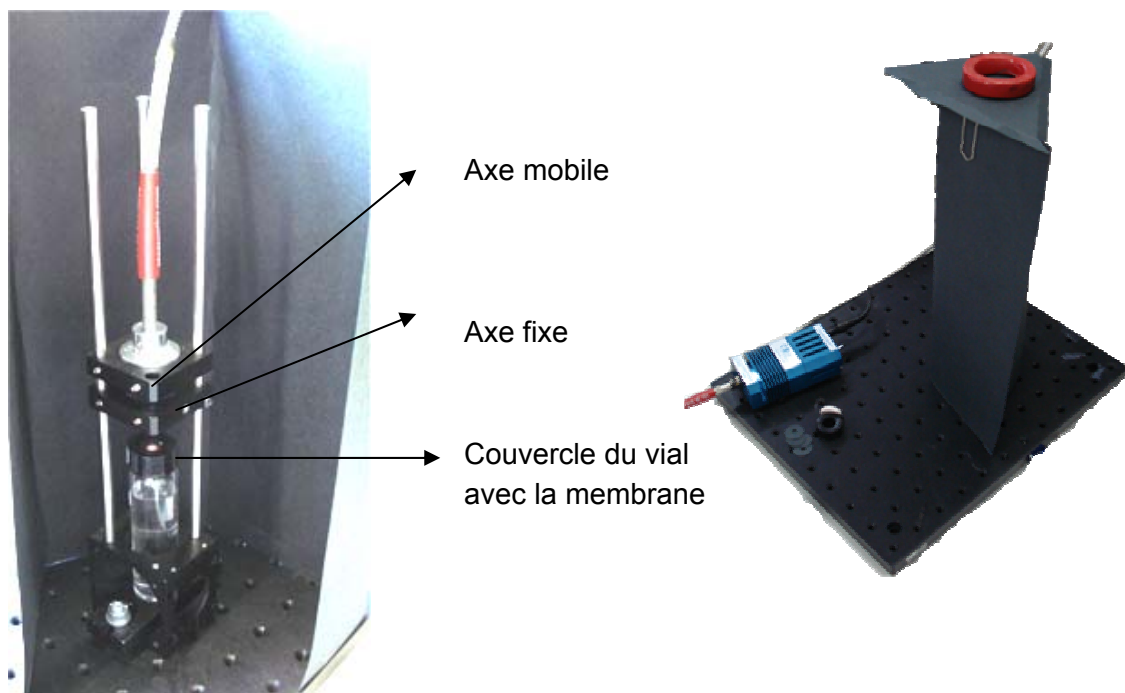
$D_{\lambda}$  = Intensité noir à la longueur d'onde  $\lambda$

$R_{\lambda}$  = Intensité de la référence à la longueur d'onde  $\lambda$

Comme paramètres standards le temps d'intégration a été fixé à 400 ms et une moyenne de 5 scans du spectre est utilisée. Des mesures peuvent être prises automatiquement chaque x minutes et elles sont traitées avec Excel.

Lors de la mesure du spectre des mesures sont prises de 340.59 nm jusqu'à 1022.61 nm et ceci chaque 0.37 nm. Une normalisation par rapport au max (c'est-à-dire que le max est déterminé pour chaque mesure et toutes les valeurs obtenues pour une mesure sont divisées par le max) est effectuée, mais seulement avec le spectre allant de 450.01 nm à 699.72 nm.

Les valeurs ainsi obtenues sont appelées « Réflexion normalisée MAX » ou « Normalisation MAX » et fluctuent entre 0 et 1. Une autre normalisation est également effectuée, il s'agit de « Normalisation à 505 nm ». Celle-ci est par rapport à la longueur d'onde 505 nm qui correspond à une longueur d'onde du point isobestique lors de l'utilisation du colorant CR-546. Afin de lisser les courbes, la moyenne de 20 points est utilisée. D'autres traitements mathématiques sont également envisagés pour traiter les résultats. Par exemple, la dérivée du signal. Cependant, avec la dérivée, les pentes sont mises en valeur sans pour autant fournir une information essentielle.



**Figure 2.4** : Installation de mesure avec fibre optique et vial

### **2.4.3. Solution de calibration**

#### **2.4.3.1. Matériels**

Tampon pH 6.8

Potassium dihydrogen phosphate, Fluka 60230

Di sodium hydrogen phosphate dodecylhydrate, Fluka 71652

Tampon pH 10

Sodium carbonate anhydrous, Fluka 71350

Sodium bicarbonate, Fluka 71627

Tampon pH 12

Glycine, Fluka 50050

Sodium chloride, Panreac 131659.1211

Sodium hydroxide, 0.1M (NaOH), HES-SO Valais//Wallis Sion

Ethanol absolut, Ranreac 361086-1612

Trimethylamine hydrochloride, Fluka 92270

Bain-marie, omnilab S30H Elmasonic, Elma, Singen, Germany

#### **2.4.3.2. Méthode**

Préparation de trois solutions tampons à pH 6.8, pH 10 et pH 12 :

- pH 6.8 - 50 % de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1/15 M avec 50 %  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1/15 M
- pH 10 - 53.4 % de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1/10 M avec 46.6 %  $\text{NaHCO}_3$  1/10 M
- pH 12 - 46 % de Glycine 1/10 M et  $\text{NaCl}$  1/10 M avec 54 %  $\text{NaOH}$  1/10 M

Toutes les mesures sont effectuées de la même manière. Les vials sont remplis avec 20.0 ml de solution tampon ou eau déminéralisée. Le vial est ensuite placé sous la fibre optique et des mesures sont effectuées toutes les 10 min pendant une période de 60 min sans bouger le vial. Au bout de cette période le contenu du vial est remplacé par une solution contenant un analyte (ETOH ou TMA) puis le tout est à nouveau mesuré pendant 60 min. Chaque fois que la solution est remplacée, ceci est fait par une concentration (de 5 % pour l'ETOH) plus élevée.

Pour permettre de faire varier la température, le vial peut être mis dans un bain-marie.

## 2.4.4. Mesures d'aliments

### 2.4.4.1. Matériels

**Tableau 2.1:** Aliments utilisés

Aliment	Nom du produit	Acheté chez	Produit par	Composition glucide [%] protéine [%] lipide [%]	Remarques
<i>Jus d'orange</i>	Pur jus d'orange	Carrefour	Emmi AG	9 0.7 <0.5	Pasteurisé
<i>Jus de raisin</i>	Jus de fruits premium de Granador	Casino	Unidrink AG	16 <0.5 <0.1	Pasteurisé et sans ajout de sucre
<i>Jus de pomme</i>	Jus de pomme de Lufurutta	Casino	Unidrink AG	11 <0.5 <0.5	Pasteurisé, sans ajout de sucre, contient 10 % jus de poire
<i>Poisson frais</i>	Maquereau	Manor	-	-	Stocké sur glace

Vitilevure B+C, *S. cerevisiae* (M1157) et *bayanus* (Pasteur 877), DLUO: 2010-04, Martin Vialatte Oenologie, France

Kit enzymatique, Enzytec fluid Ethanol de scil, ref 5340, Dispolab AG, Dielsdorf, Switzerland

Kit enzymatique, Ethanol UV-Test de Boehringer Mannheim / R-biopharm, Roche 10 176 290

Solution Carrez I et II, 23.01.07, HES-SO Valais/Wallis Sion

Filtre, Exapure Syringe Filters PTFE 0.45-13, N° SY13TF4, Alys Technologies

Syringe 10 ml

Vial 20 ml

Vase (bouteille) de micro vinification 1l

### 2.4.4.2. Méthodes

- Fermentation d'un jus de fruits dans un vial

Dans trois vials, 15 ml du jus de fruit sont pipettés. Dans deux d'entre eux, 150 mg (corresponds à ~1 % du poids) de levures (Vitilevure B+C) y sont ajoutées. De plus, 50 ml de jus de fruits sont mis dans un becher et 500 mg de levures sont ajoutées. Les vials ainsi que le becher sont fermés avec une membrane, respectivement de la parafilm, et un vial est mesuré avec le spectromètre à fibre optique toutes les 30 min sans être bougé tout au long de l'essai. Les deux autres vials ainsi que le becher sont stockés dans une armoire à l'abri de la lumière. Chaque 2 heures un échantillon de 1 ml est prélevé dans le becher puis congelé immédiatement. L'incubation des jus avec levures se fait à température ambiante, donc à

environ 20 °C et ceci sans agitation. À la fin de l'essai, l'éthanol se trouvant dans les échantillons est déterminé grâce à un kit enzymatique en utilisant la moitié des réactifs. Les échantillons, avant de pouvoir être mesurés avec le kit enzymatique, doivent être traités. La première étape consiste à diluer l'échantillon afin d'obtenir une concentration en éthanol allant de 20 – 250 mg/l et par la même occasion effectuer une clarification selon Carrez pour précipiter les protéines et les graisses. Pour la clarification 1 % (du volume final de l'échantillon dilué) de la solution 1 puis 1 % (du volume final de l'échantillon dilué) de la solution 2 de Carrez y sont ajoutés. La 2<sup>ème</sup> étape consiste à filtrer le jus dilué et clarifié, avec une syringe de 10 ml et un filtre de 0.45 µm de diamètre. [23]

- Fermentation d'un jus de fruits dans une bouteille

Deux essais sont effectués avec du jus de raisin dans un vase de micro vinification. Sa spécificité est que le couvercle contient deux trous. Un premier sert à fixer la membrane et le deuxième est relié avec un tuyau à un récipient contenant de l'eau. Ceci à comme but de garder la pression constante. Le premier essai est effectué avec 900 ml de jus de raisin et un ajout de 9 g de levure (correspond à 1 % du poids) et le second avec 800 ml de jus de raisin avec 2 g de levure (correspond à 0.25% du poids). Pour le second, une sonde embarquée effectuant une mesure toute les minutes est ajoutée dans la bouteille afin de suivre l'évolution de la température. Les mesures sont effectuées toutes les 30 min sans bouger la bouteille pendant toute la durée de l'essai.

- Altération d'un poisson dans un vial

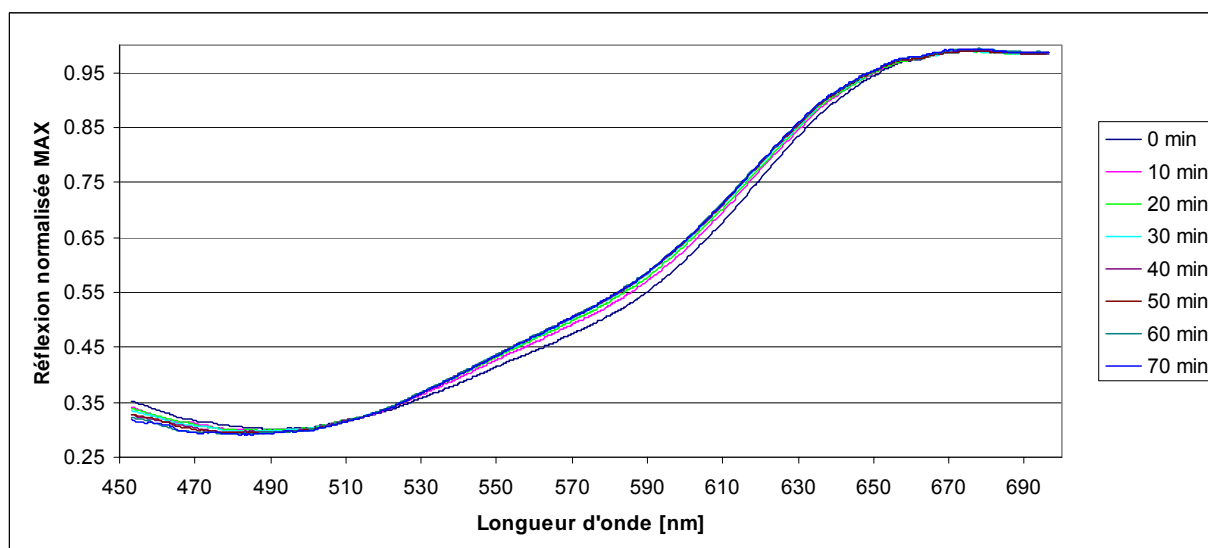
2 g d'un poisson sont mis dans un vial et chaque 30 min des mesures sont effectuées avec le spectromètre à fibre optique sans déplacer le vial pendant l'ensemble de la durée de l'essai. Pour le poisson utilisé, il s'agit d'un poisson stocké sur glace. L'essai dure environ 2 jours à température ambiante.

### 3. Résultats et discussion

#### 3.1. Tag à base de papier filtre

##### 3.1.1. Mesures de réflexion avec de l'éthanol

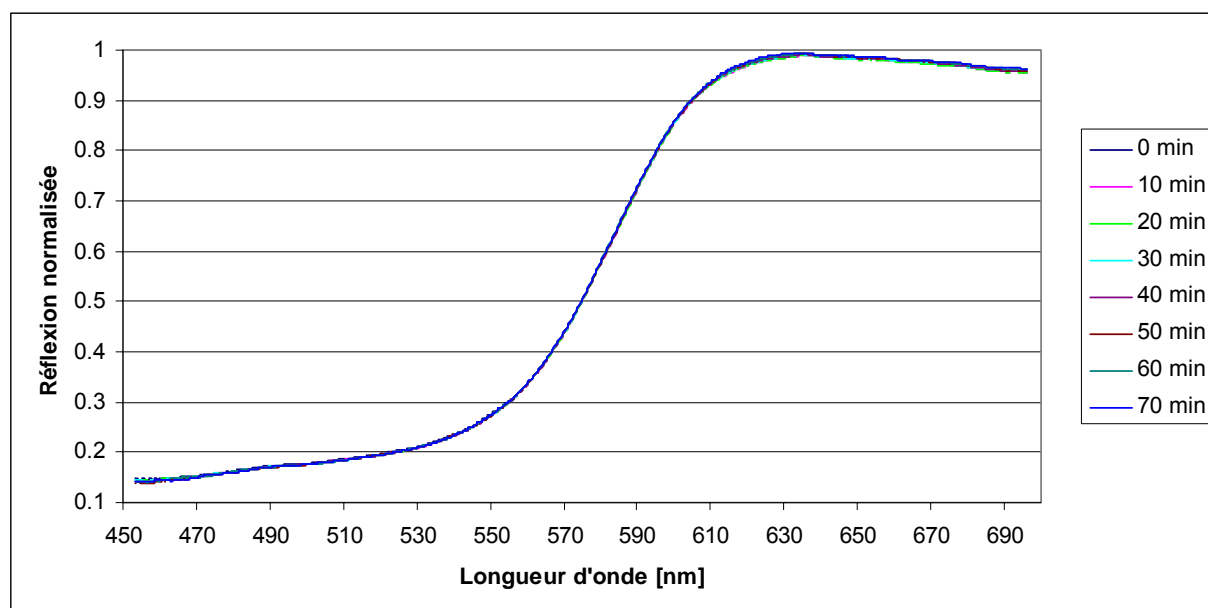
Selon la méthode « solution de calibration », toutes les 10 min des mesures sont prises afin de suivre le temps nécessaire pour passer de la concentration initiale (0 %) à une concentration finale (10 %) d'éthanol. De plus, les mesures permettent de décrire l'allure générale et les changements de la courbe. Avec le CR-546 les courbes se croisent aux alentours de 505 nm. En dessous de ce croisement, la réflexion diminue, et au-delà elle augmente en fonction du temps (figure 3.1). Après environ 40 min les courbes de réflexion ne varient presque plus.



**Figure 3.1 :** Évolution du tag à base de papier filtre avec le colorant CR-546 (pf 1) pour une concentration allant de 0 à 10 %

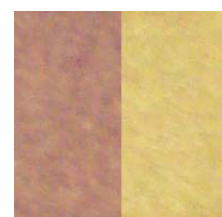


La même méthode appliquée dans les mêmes conditions donne un résultat différent pour le colorant ETH 4001. Aucun changement n'est visible au bout de 70 min (figure 3.2).



**Figure 3.2 :** Évolution du tag à base de papier-filtre avec le colorant ETH 4001 (pf 3) pour une concentration allant de 0 à 10 %

La durée de vie des capteurs a été étudiée. Avec le colorant CR-546 la durée de vie est très courte. Déjà au bout de 4 jours le papier filtre passe d'un rose-violet à un orange (figure 3.3) s'il est en contact avec de l'air ambiant. Au bout de 2 semaines, il a presque perdu toute sa couleur. Par contre, l'ETH 4001 ne décolore pas s'il est en contact avec de l'air.



**Figure 3.3 :** Papier filtre avec CR-546, à gauche âgé de 1 jour et à droite âgé de 4 jours

Pour le CR-546 les caractéristiques observées sont similaires à celles de la littérature (point 1.3.3) pour les membranes en PVC, c'est-à-dire un croisement aux alentours de 505 nm, la diminution avant et l'augmentation après du signal en fonction de l'augmentation de la concentration d'éthanol. Ceci permet d'affirmer que les capteurs sont fonctionnels. En ce qui concerne le tag avec le colorant ETH 4001 aucun changement de signal n'a pu être observé au bout de 70 min avec les deux concentrations (pf 2 et pf 3) de colorants utilisés. Il se peut que le tag mette plus de 70 min pour réagir, mais ceci n'a pas été déterminé.

Étant donné qu'un signal « en direct » peut seulement être obtenu avec le colorant CR-546, les tests avec le colorant ETH 4001 ont été interrompus. De plus, à cause de la mauvaise durée de vie du tag avec le colorant CR-546, des tests avec du TMA n'ont pas été effectués et les tags à base de papier filtre ont totalement été abandonnés.

### 3.2. Tag fabriqué avec le procédé sol-gel

Le gel obtenu n'était pas visqueux et lors de l'immersion de la plaque de verre dans ce gel la plaque n'était pas couverte de manière homogène avec le gel. Pour combler ce défaut, plusieurs trempages consécutifs ont été effectués. Toutefois, le résultat obtenu est une couche très hétérogène (figure 3.4).

Ce procédé a rapidement été abandonné pour deux raisons majeures. La première est que le procédé de fabrication est long, c'est-à-dire qu'il faut compter entre 6 à 7 jours pour en fabriquer. La deuxième raison est que le tag obtenu est un gel sur une plaque de verre. Ce tag étant en verre, il ne peut pas être incorporé dans le couvercle d'un vial sans se briser. De ce fait, aucune mesure n'a été effectuée avec le spectromètre à fibre optique. Cependant, des verres ont été trempés dans des solutions d'éthanol pour observer un changement de couleur. Toutefois, aucun changement visuel n'a pu être constaté.

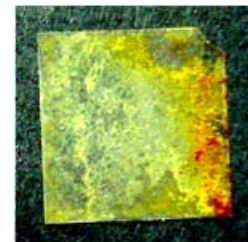


Figure 3.4 : Sol-gel séché sur une plaque de verre

### 3.3. Tag à base de PVC avec le colorant CR-546

Deux manières de produire le tag ont été expérimentées. La première consiste à mettre la solution avec le colorant en contact avec la plaque de verre, puis de transférer la membrane ainsi obtenue sur une couche de PTFE ou papier filtre. La deuxième consiste à transférer la solution avec le colorant directement sur une couche de PTFE. Comme le montre la figure 3.5, la membrane produite avec la première manière ondule de manière régulière tandis que celle produite avec la deuxième manière est pratiquement lisse.

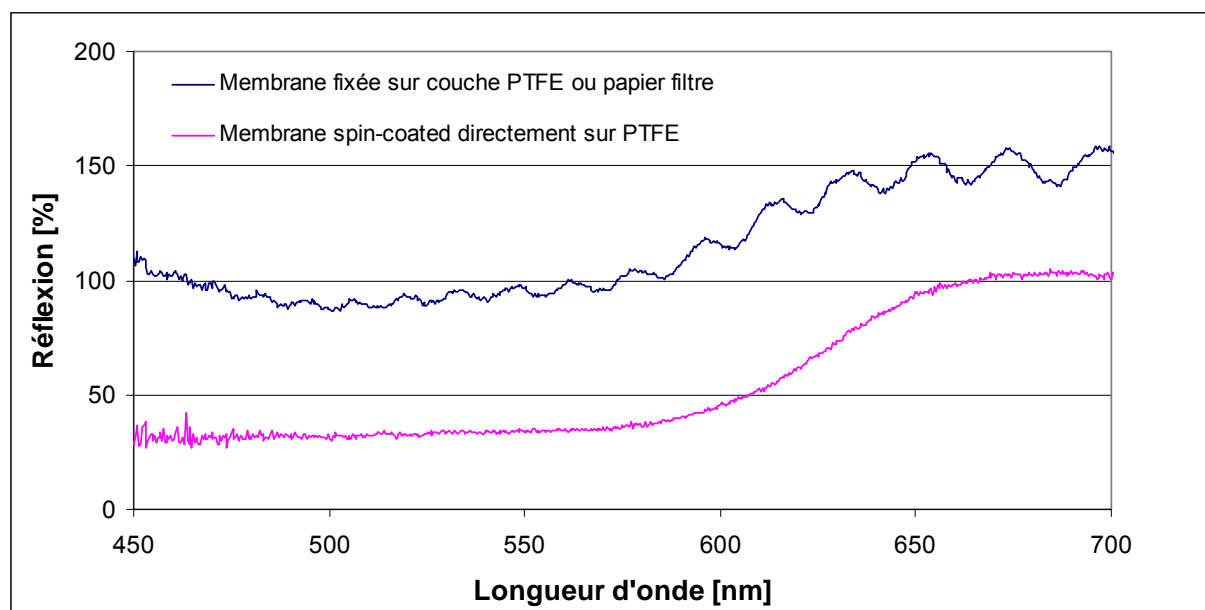


Figure 3.5 : Comparaison du signal brut d'une membrane à base de PVC avec le colorant CR-546 produite de deux manières différentes

Des deux manières de produire la membrane, la seconde (spin-coating directement sur PTFE) à été conservée et la première (spin-coating sur plaque de verre puis transfère sur PTFE) abandonnée. La raison pour laquelle la première ondule est probablement un espace d'air très mince entre la membrane et la couche PTFE ou papier filtre. La réflexion ne serait pas uniquement effectuée sur la membrane, mais la traverserait et il y aurait également une réflexion sur la couche PTFE. Une partie de la réflexion de la couche PTFE resterait bloquée entre la membrane et la couche PTFE. Le transfert de la membrane sur une couche de PTFE est effectué manuellement et il n'y a pas de compression entre la membrane et la couche en PTFE. De plus, lors de manipulation avec le bouchon, la membrane et le PTFE subissent des tensions.

### 3.3.1. Influence de la hauteur entre la fibre optique et la membrane

La distance entre la fibre optique et la membrane a également une influence non négligeable. Pour le démontrer, une membrane a été fixée sur un vial vide, et uniquement la hauteur entre la fibre et la membrane a été modifiée. Comme le montre la figure 3.6, à une distance minimale, le signal brut est près de 0, et avec une distance d'un demi-millimètre le signal atteint presque son maximum. Dépassé 1 mm, le signal diminue en fonction de l'augmentation de la hauteur. La figure 3.7 est la normalisation moyenne de la figure 3.6. Mise à part la distance nulle, les signaux sont similaires, mais pas identiques. La figure 3.8 est également une normalisation, mais pas par rapport au maximum, mais à la longueur d'onde 505 nm qui correspond au point isobestique. À nouveau, mise à part la distance nulle, les courbes sont similaires, mais se croisent.

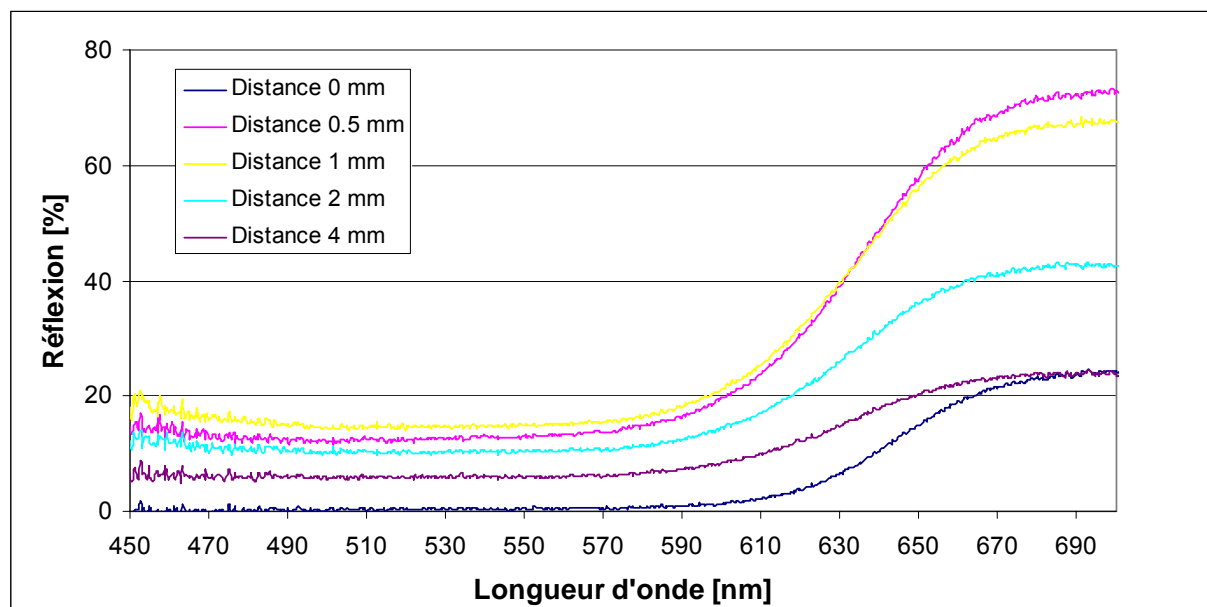
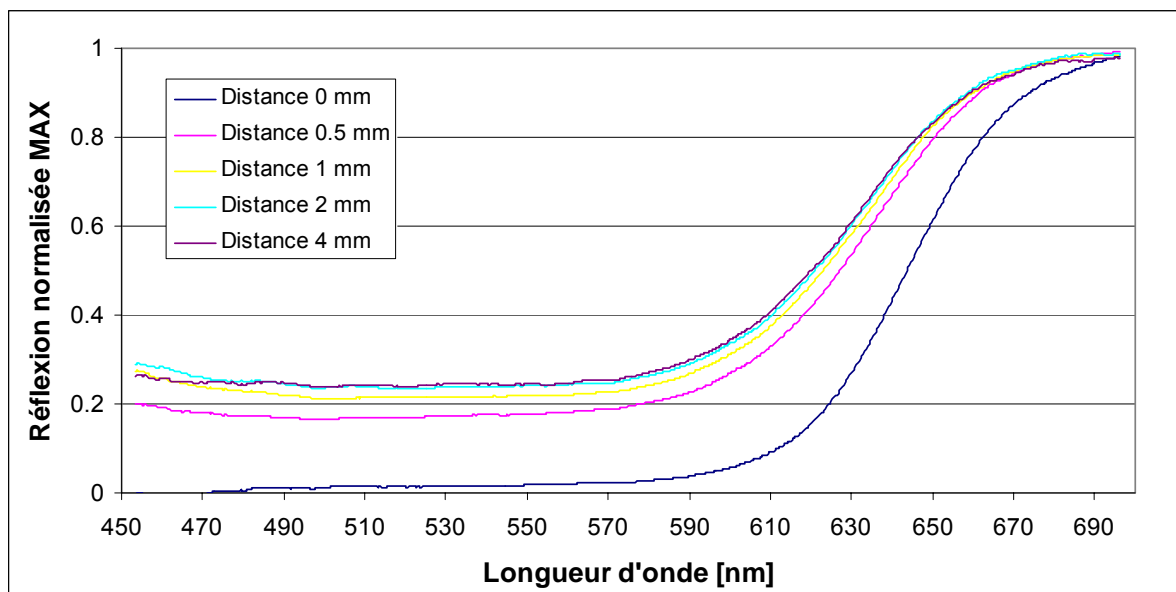
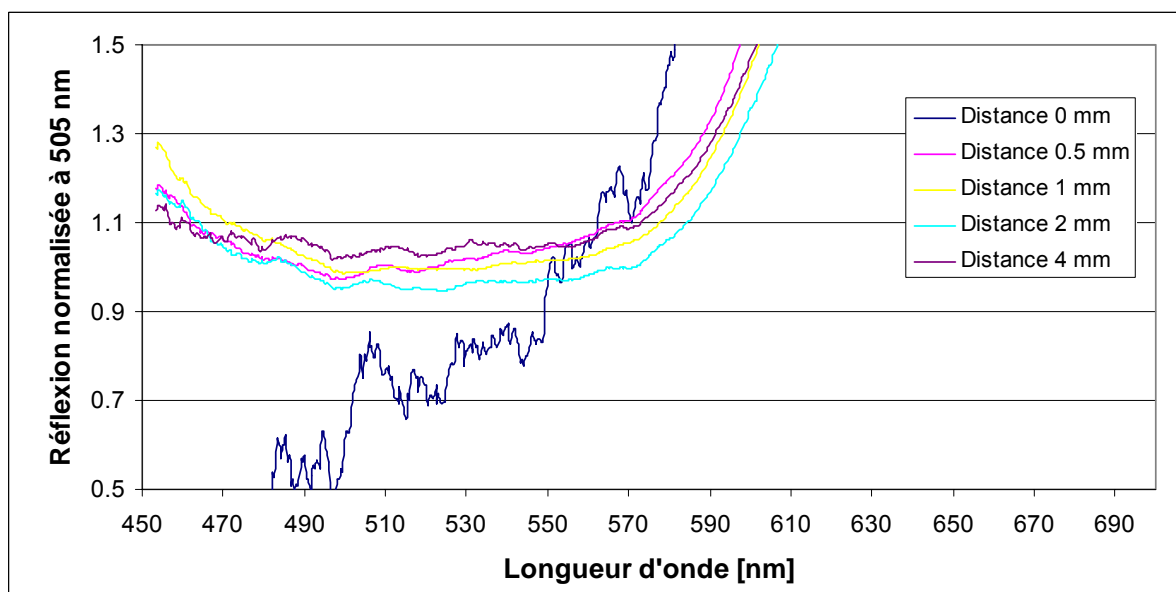


Figure 3.6 : Mesure d'une membrane avec la fibre optique à différentes hauteurs



**Figure 3.7 :** Résultat normalisé MAX d'une mesure d'une membrane avec la fibre optique à différentes hauteurs



**Figure 3.8 :** Résultat normalisé à 505 nm d'une mesure d'une membrane avec la fibre optique à différentes hauteurs

Une différence de hauteur influence de manière importante le signal. Même avec une normalisation par rapport au max, il est impossible d'obtenir le même résultat. Si la distance nulle est mise de côté, il peut être constaté que les courbes ont la même allure, mais qu'elles sont quand même séparées d'une distance importante. Cette distance est d'environ 0.1 à 560 nm ce qui correspond environ à la variation maximale obtenue à 560 nm pendant une fermentation (voir point 3.3.5). Cette normalisation est donc inadaptée pour corriger les changements de hauteur. Avec la normalisation par rapport à 505 nm les résultats sont

similaires. Si la distance nulle est à nouveau mise à l'écart, la différence entre les courbes est d'environ 0.1 ce qui est, comparé à une fermentation (voir point 3.3.5), dans un domaine encore acceptable. Ces résultats permettent de conclure que la distance idéale entre la fibre optique et la membrane se situe entre 0.5 et 1 mm. De plus, afin d'obtenir des résultats répétables, la hauteur entre la membrane et la fibre optique doit être constante, car aucune des deux normalisations ne permet de corriger de manière satisfaisante la variation de hauteur. Il n'est donc pas possible de positionner à la main la fibre au-dessus de la membrane et d'obtenir un résultat précis.

### 3.3.2. Courbe de calibration avec de l'éthanol

La courbe de calibration est effectuée avec des solutions d'éthanol dans de l'eau déminéralisée. L'éthanol est mesuré chaque 10 min pendant 60 min par tranche de 5 %. La figure 3.9 montre l'évolution d'une mesure à 15 % pendant 60 min. Au bout d'environ 40 min le signal ne varie presque plus, ce qui correspond au temps de réponse. Cette constatation est également valable pour toutes les mesures.

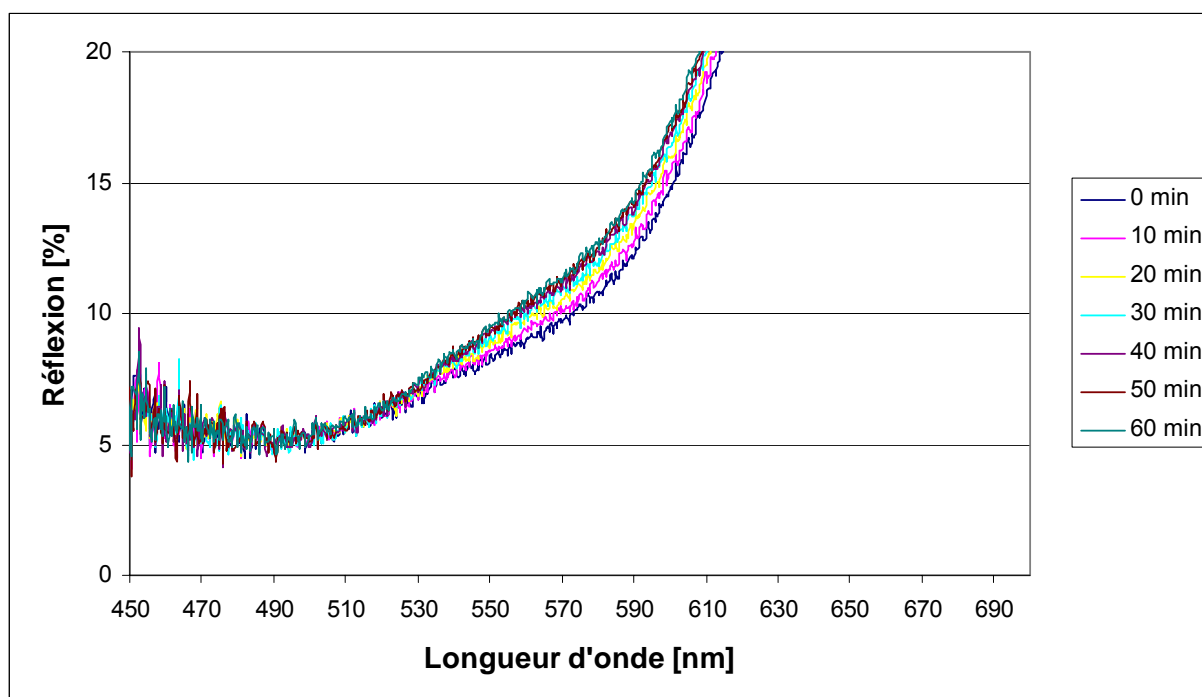


Figure 3.9 : Données brutes de l'évolution d'une solution contenant 15 % ETOH

Seule la mesure au bout de 60 min pour une concentration est conservée puis normalisée pour être comparée avec d'autres concentrations. La figure 3.10 illustre la normalisation MAX de différentes concentrations au bout de 60 min. Avec cette normalisation, la corrélation entre la concentration et la réflexion est mauvaise. La figure 3.11 montre l'autre normalisation, celle à 505 nm, et celle-ci, contrairement à la première, peut être corrélée comme le montre la figure 3.12. Le coefficient de détermination est effectué avec les valeurs obtenues à 560 nm grâce à la normalisation à 505 nm et est de 0.9872.

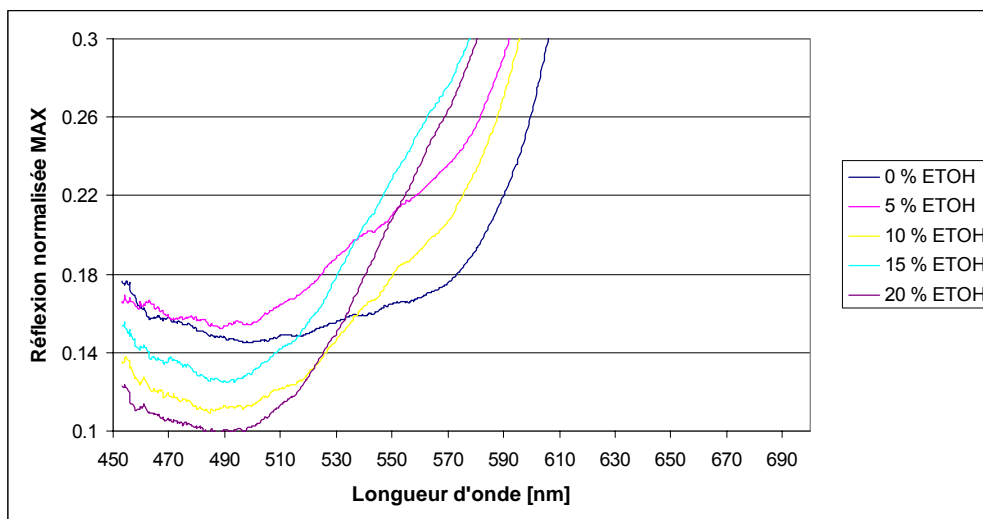


Figure 3.10 : Données normalisées MAX de solution contenant différente concentration en ETOH

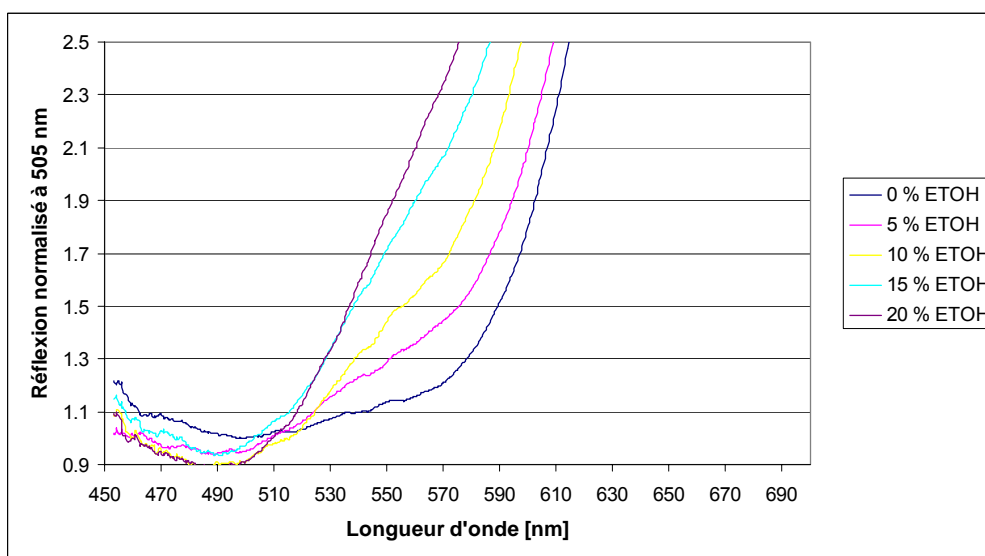


Figure 3.11 : Données normalisées à 505 nm de solution contenant différente concentration en ETOH

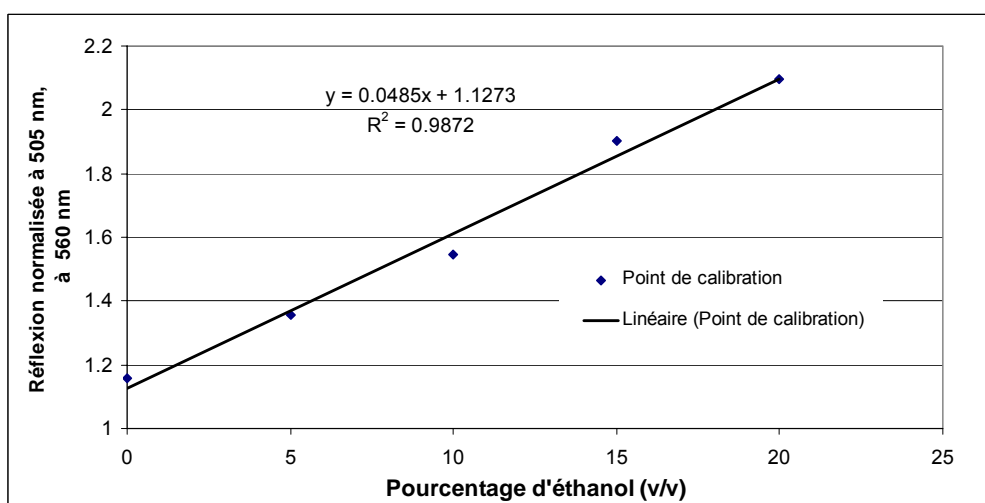


Figure 3.12 : Courbe de calibration avec la longueur d'onde 560 nm normalisés à 505 nm



Plusieurs courbes de calibration ont été effectuées (figure 3.13). Les trois courbes sont effectuées avec le même vial. De plus, la membrane et la hauteur entre celle-ci et la fibre est la même pour la calibration 1 et 2 tandis que pour la calibration 3 la hauteur est augmentée à cause de l'utilisation d'une autre membrane.

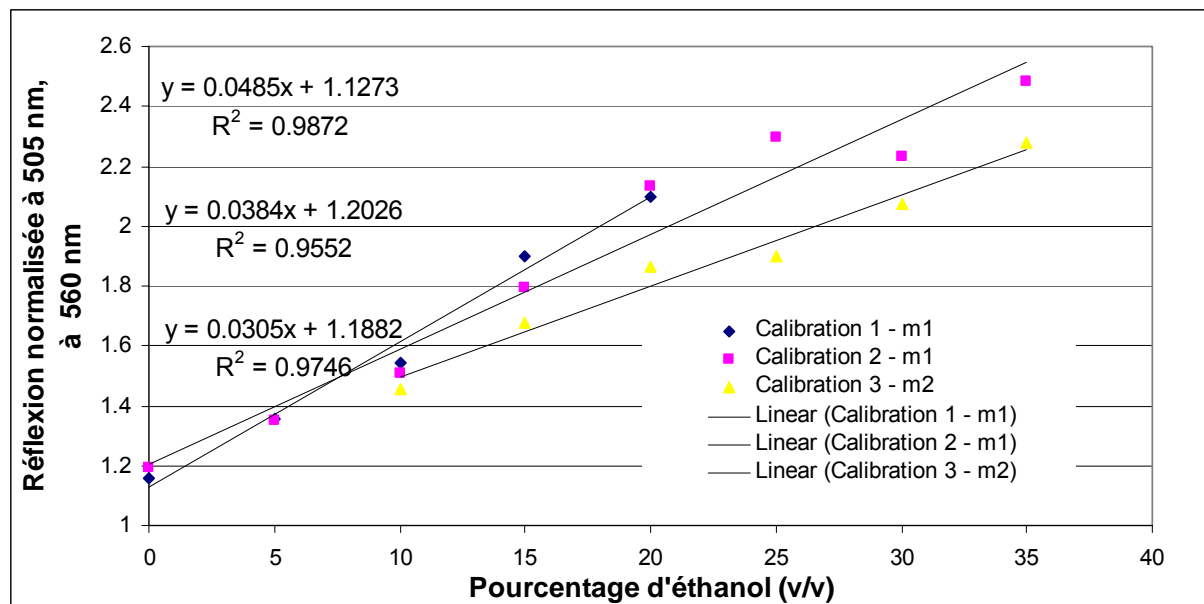


Figure 3.13 : Courbes de calibrations avec la longueur d'onde 560 nm normalisés à 505 nm

Comme le montre la figure 3.9, le signal augmente rapidement pendant les 40 premières minutes puis se stabilise tout en variant légèrement. La normalisation MAX (figure 3.10) pour la courbe de calibration est inadaptée, car d'une part les courbes de 5 et 10 % sont inversées, et d'autre part il n'y a pas de point isobestique à 505 nm mais des croisements un peu partout et de manière aléatoire. La raison du résultat obtenu et qu'entre chaque série de mesure qui dure 60 min la fibre optique est déplacée, le vial est ouvert, la solution d'éthanol est remplacée, le vial est fermé puis replacé sous la fibre optique. Toutes ces manipulations physiques ont diverses influences telles que la hauteur entre la fibre optique et la membrane ou l'emplacement de la source lumineuse sur la membrane. Afin d'atténuer ces effets, la normalisation à 505 nm est utilisée. Pour la même membrane, les résultats obtenus (figure 3.11) sont acceptables. Toutefois, en répétant la même opération avec des conditions identiques (membrane et vial) les résultats sont similaires, mais pas identiques. En utilisant une autre membrane (m2) et en augmentant légèrement la distance entre la fibre optique et la membrane, la courbe de calibration est fortement différente. Les courbes de calibration peuvent être considérées comme linéaires jusqu'à 20 %. Passé cette concentration des variations sont observables. Le plateau n'a pas pu être exactement déterminé. Du point de vue du changement de couleur, à faible concentration la membrane est pourpre/violet et lors de hautes concentrations elle devient orange.

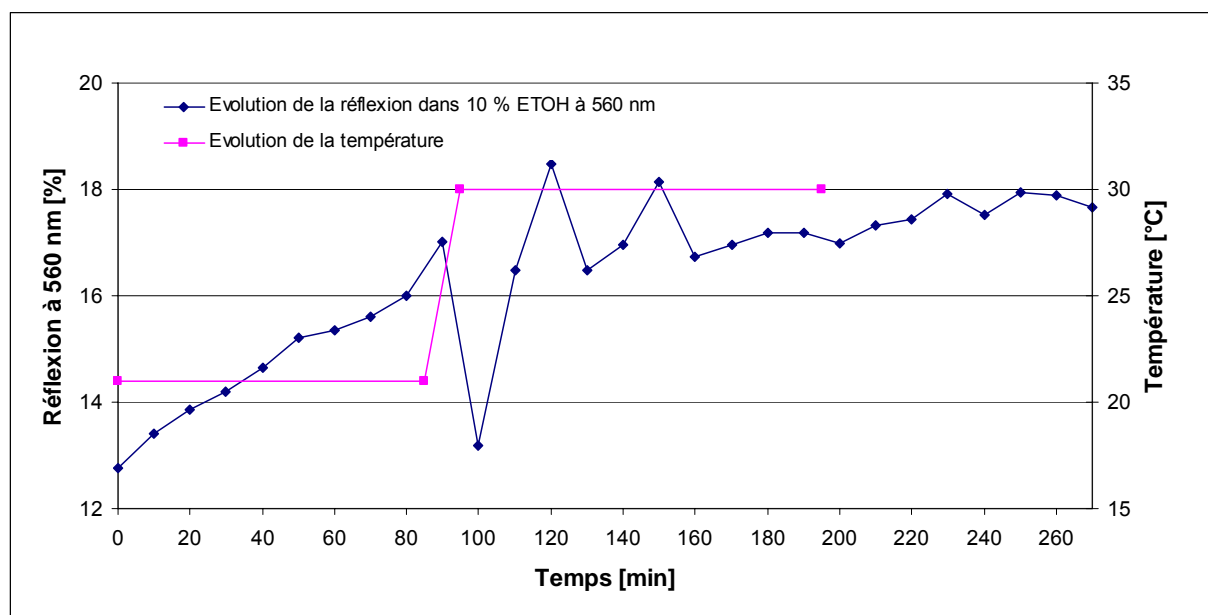
Les différences obtenues avec les courbes de calibration sont trop grandes pour déterminer de manière exacte une concentration d'éthanol grâce à une courbe de calibration pour une concentration inférieure à 0.5 %. Cette concentration devrait pourtant être détectée pour déterminer la fraîcheur d'un jus de fruit. Ceci permet d'affirmer que des mesures, afin d'obtenir

des résultats absolus, ne sont pas possibles pour des faibles concentrations, car les erreurs d'imprécision dues à la manipulation sont trop élevées. De plus, ces résultats permettent de conclure qu'afin d'obtenir des résultats répétables la distance entre la fibre optique et la membrane ne doivent pas varier tout au long de l'essai.

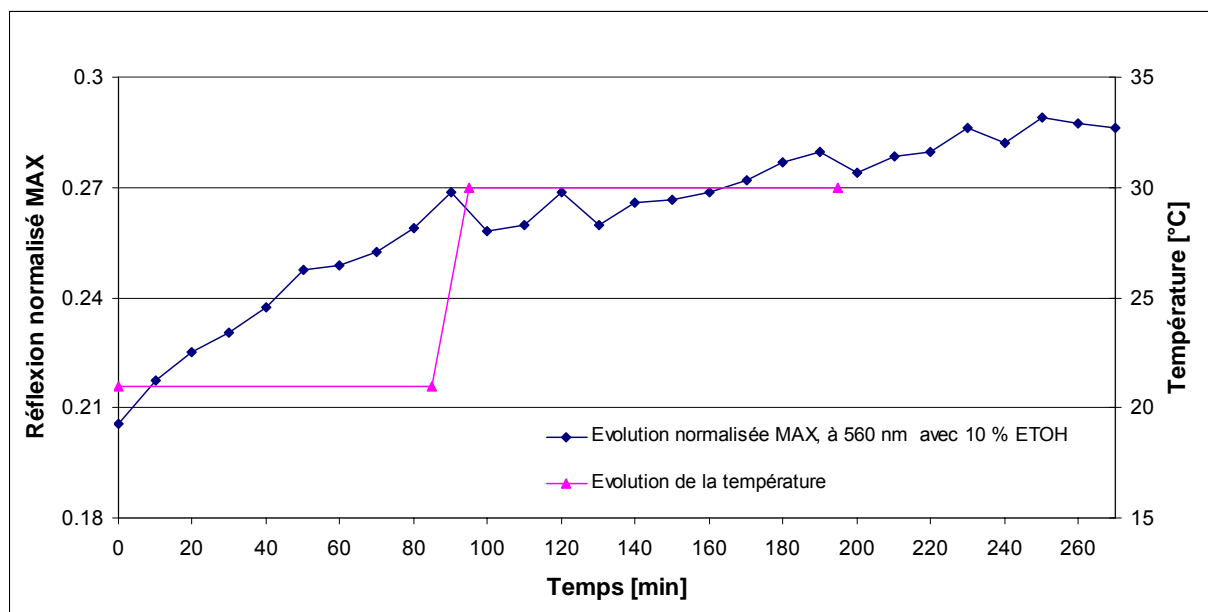
### 3.3.3. Influence de la température

Le vial est mis dans un bain-marie à température ambiante, c'est-à-dire environ 20 °C, et toutes les 10 min une mesure est effectuée. Après 80 minutes, la température est réglée à 30 °C. Il faut environ 10 min pour que le bain-marie atteigne la température de consigne.

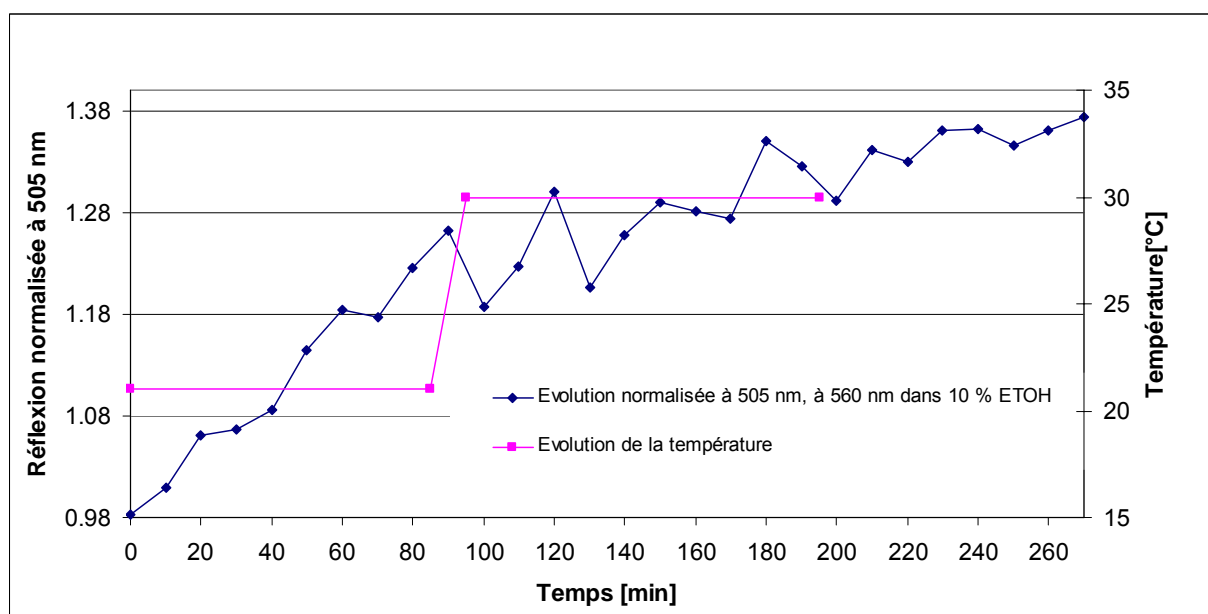
La figure 3.14 montre que la réflexion monte rapidement les 60 premières minutes puis se stabilise quelques minutes avant de faire de grandes variations. Ces variations ont lieu après que la température ait été augmentée. Au bout de 180 minutes, le signal se stabilise. La figure 3.15 illustre qu'avec la normalisation MAX les variations visibles dans la figure 3.14 après 90 min sont atténuées, mais que l'allure générale reste la même. Par contre, avec la normalisation à 505 nm (figure 3.16) les variations sont plus importantes, mais l'allure générale reste également la même.



**Figure 3.14 :** Données brutes de l'évolution d'une solution contenant 10 % ETOH à 560 nm



**Figure 3.15 :** Données normalisées MAX de l'évolution d'une solution contenant 10 % ETOH à 560 nm



**Figure 3.16 :** Données normalisées à 505 nm de l'évolution d'une solution contenant 10 % ETOH à 560 nm

En se basant sur les résultats de la courbe de calibration, l'hypothèse suivante a été faite pour cet essai : L'équilibre entre la phase aqueuse et la phase gazeuse est établi après plus de 40 min, de même que la stabilité du signal. Afin d'assurer une marge, la température a seulement été augmentée au bout de 80 min. Les figures 3.14, 3.15 et 3.16 ne peuvent pas montrer deux choses. La première est que lors de l'augmentation de la température une partie de la solution se transforme en vapeur et vient se condenser sous la membrane.

La deuxième est qu'une fois la température à 30 °C il y a d'énormes variations de signal et ceci de manière aléatoire. Elles ne sont pas forcément visibles, car elles peuvent avoir lieu

pendant 5 min et les mesures ont lieu toutes les 10 min. La figure 3.14 illustre bien que ces variations importantes ont seulement lieu lorsque la température est augmentée.

### 3.3.4. Mesure d'eau déminéralisée

Les essais étant faits à température ambiante et la température ayant une influence sur le signal, l'influence de la variation de la température ambiante a été étudiée. Pour cela 800 ml d'eau déminéralisée sont mesurés dans une bouteille de micro vinification pendant une période d'environ 115 h tout les 30 min afin de déterminer si le signal varie en fonction du temps. L'essai a démarré à 14 h 30. De plus, la température est mesurée à l'aide d'une sonde embarquée chaque minute afin de suivre son évolution. La température varie d'environ 1 °C pendant la durée de l'essai. La figure 3.17 montre que le signal brut varie de plus d'un pour cent, la figure 3.18 montre qu'avec une normalisation MAX les valeurs varient de moins de 0.02 et la figure 3.19 montre la normalisation à 505 nm où la variation est inférieure à 0.1. Pour les deux premières figures, la température a tendance à varier de manière inverse au signal, tandis que pour la figure 3.19 la tendance est moins claire, mais semble presque suivre le signal.

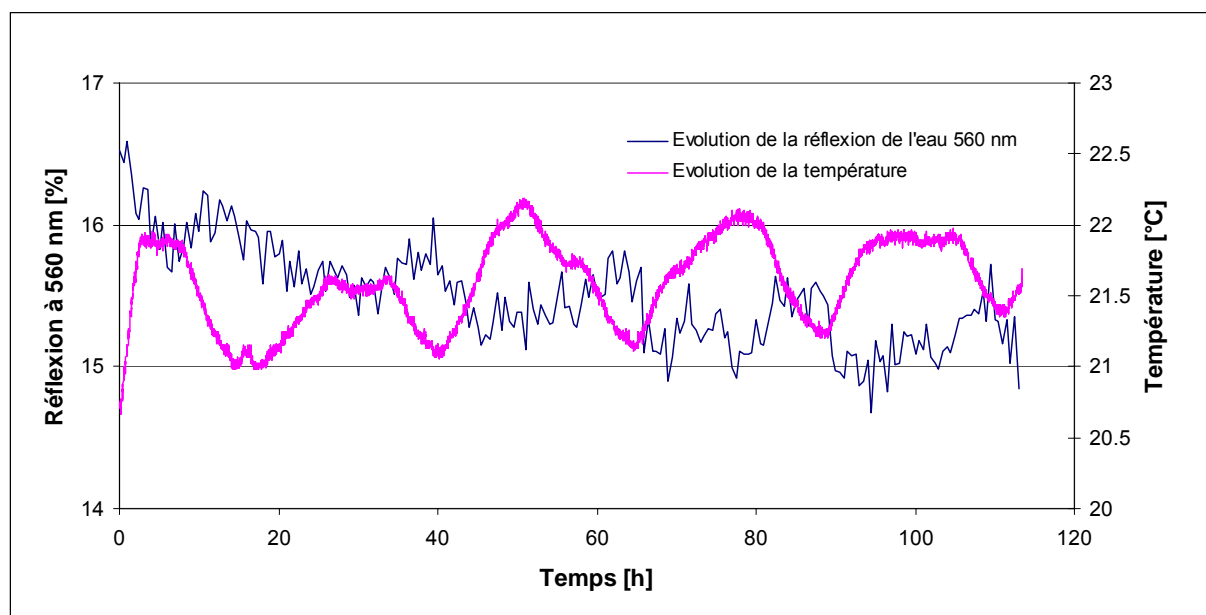
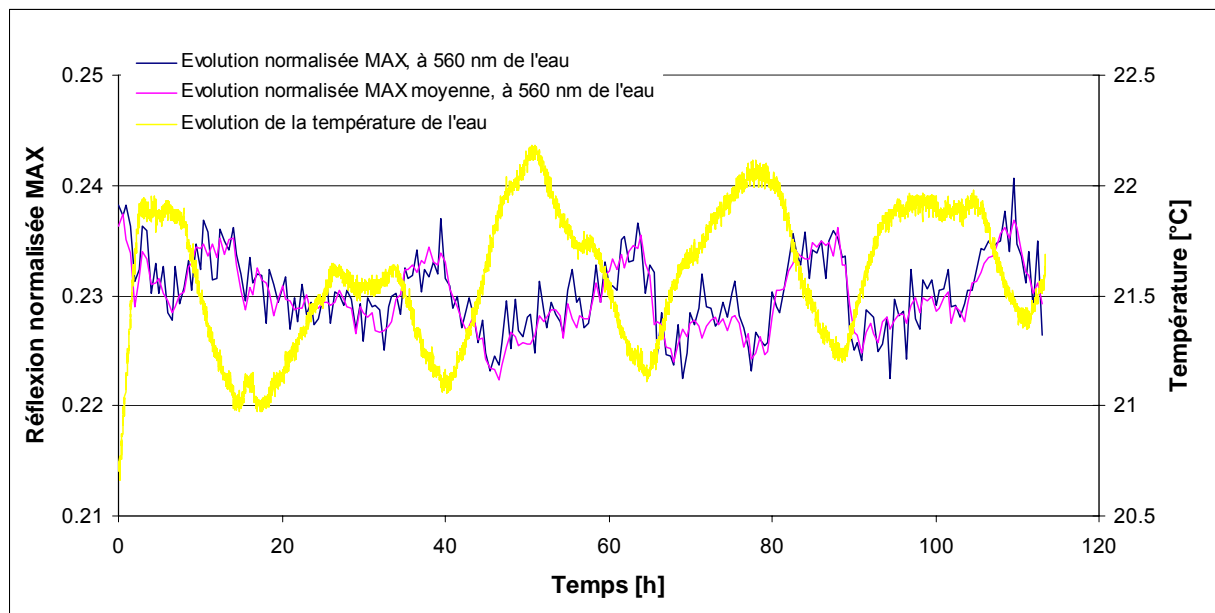
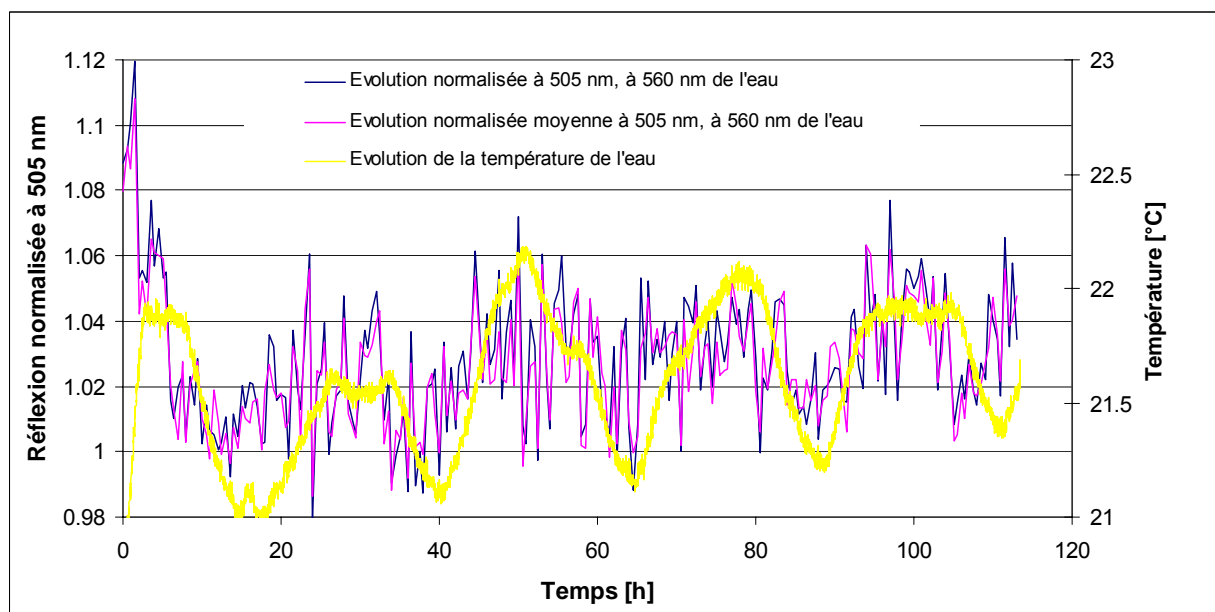


Figure 3.17 : Données brutes à 560 nm et la température de l'eau



**Figure 3.18 :** Réflexion normalisée MAX, à 560 nm et la température de l'eau



**Figure 3.19 :** Réflexion normalisée à 505 nm, à 560 nm et la température de l'eau

Cet essai permet de déterminer le bruit de fond. La bouteille utilisée permet de travailler à pression constante, contrairement aux vials. Les variations de températures peuvent être expliquées par le fait que pendant la journée le chauffage est réglé à 20 °C et que pendant la nuit et le weekend la consigne du chauffage est diminuée à 16 °C. De plus, si un nombre élevé de personnes se trouvent dans le laboratoire (exemple : pendant les travaux pratiques) la température a également tendance à augmenter. À la fin de l'essai, de l'eau qui avait condensé était présente sous le couvercle de la bouteille. Un faible changement de température a une répercussion importante sur la membrane. Ce n'est probablement pas la

température elle-même qui a une influence, mais sa conséquence qui est de varier l'humidité relative dans le vial. Une publication traitant du développement d'une membrane pour mesurer l'humidité vient appuyer cette hypothèse. Bien que beaucoup de paramètres de la publication soient différents de ceux utilisés, la membrane utilisée dans la publication possède également un groupe trifluoroacétyle. De l'eau peut se lier au groupe trifluoroacétyle avec l'aide d'un catalyseur dans des conditions basiques et un changement d'absorption peut être observé. [24]

### 3.3.5. Mesures de fermentations de jus de fruits dans un vial

Plusieurs jus de fruits pasteurisés ont été inoculés avec des levures. L'évolution de la fabrication d'éthanol peut être suivie grâce aux mesures, prise toutes les 30 min, de la membrane avec le spectromètre à fibre optique.

#### 3.3.5.1. Jus d'orange

Les figures 3.20, 3.21 et 3.22 montrent le changement de réflexion à 560 nm tout au long de la fermentation du jus d'orange et l'ETOH mesurés à plusieurs reprises. Pour les trois figures, il peut être constaté que le signal monte fortement les 18 premières heures puis se stabilise. Une chute importante du signal est observée au bout de 70 h pour les figures 3.20 et 3.21 tandis que cette chute est invisible sur la figure 3.22. De plus, avec la normalisation MAX moyenne les courbes sont plus lisses qu'avec la normalisation moyenne à 505 nm. Quant aux mesures d'éthanol, elles semblent suivre la tendance de la courbe. Au bout de 24 h la concentration en ETOH est de 5.8 %.

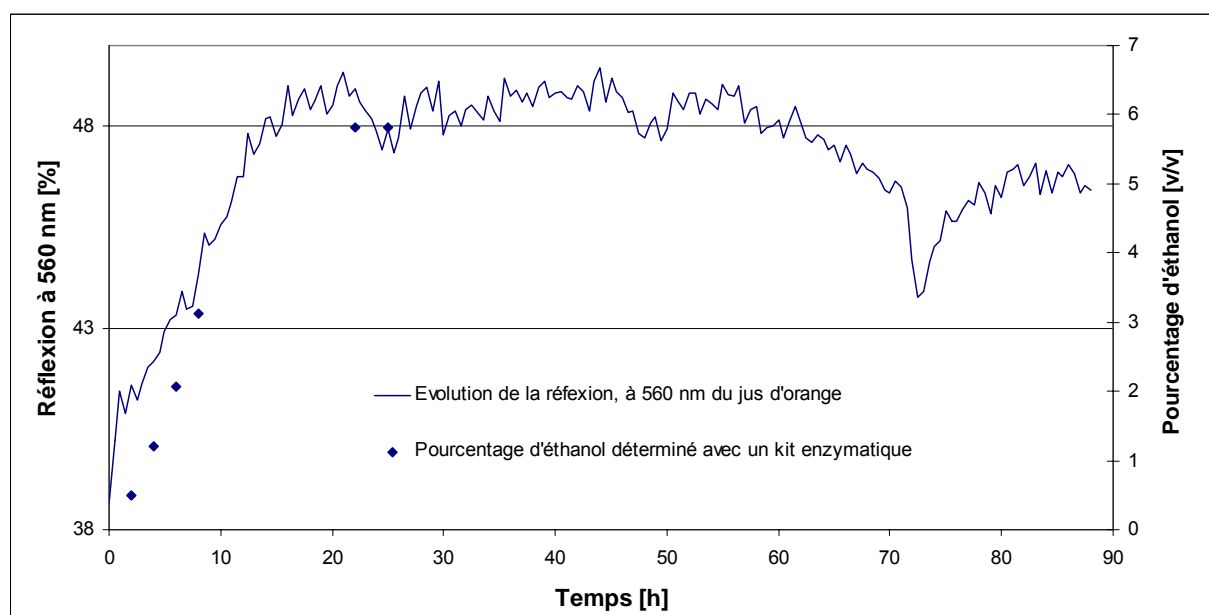


Figure 3.20 : Évolution de la réflexion de l'éthanol dans un jus d'orange en fermentation

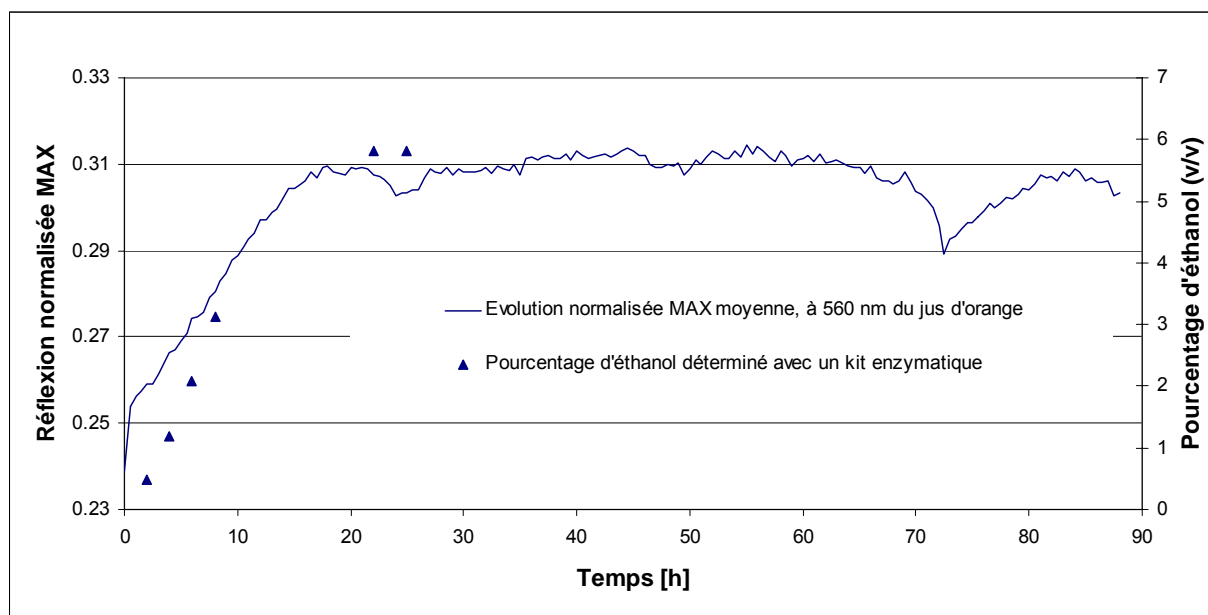


Figure 3.21 : Évolution normalisée MAX de l'éthanol dans un jus d'orange en fermentation

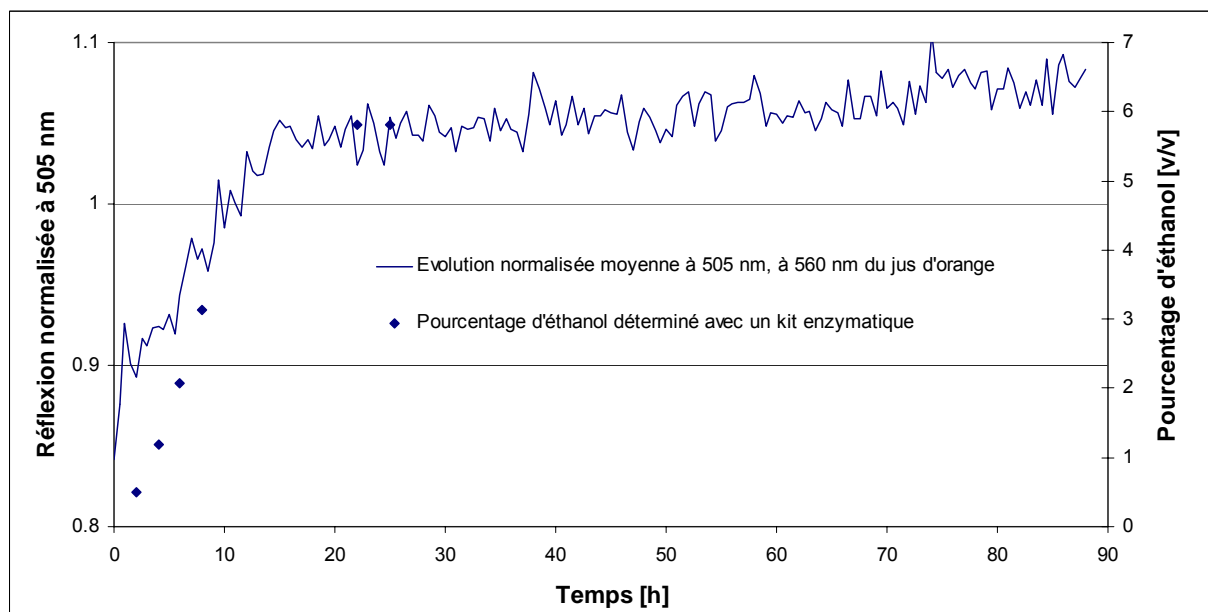


Figure 3.22 : Évolution normalisée à 505 nm de l'éthanol dans un jus d'orange en fermentation

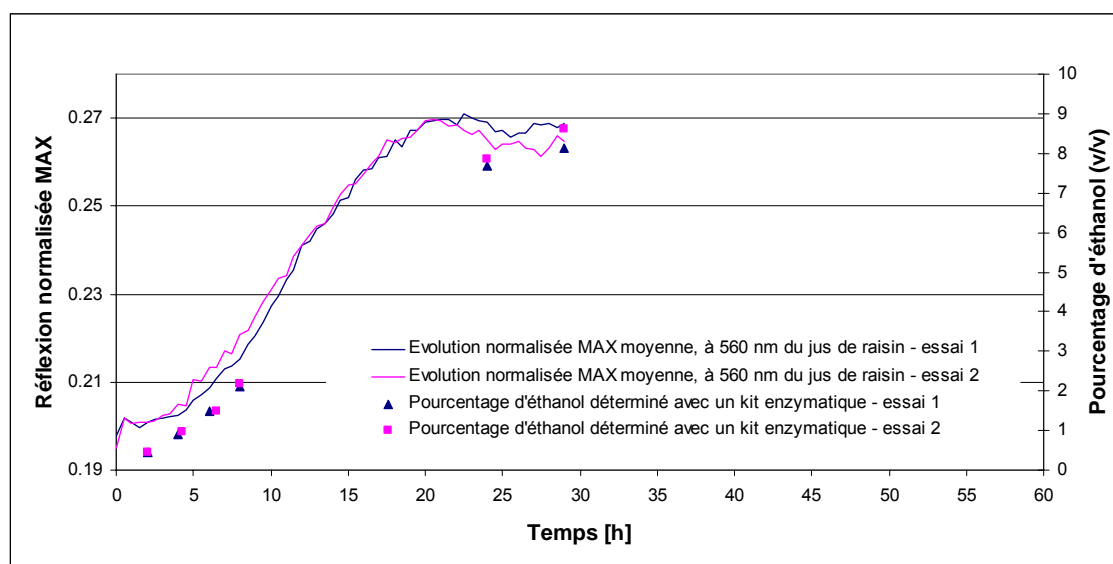
Afin de pouvoir effectuer des mesures avec des jus de fruits, deux hypothèses concernant la température ont été faites. La première est que pendant la fermentation les levures dégagent de la chaleur, mais le volume de fermentation étant faible (15 ml), l'air ambiant suffit pour garder la température à l'intérieur du vial constante. La deuxième est que l'air ambiant a une température constante pendant toute la durée de l'essai. La chute de signal au bout de 70 h est la conséquence d'un faible déplacement de la fibre optique. Seule la normalisation à 505 nm permet de corriger de manière efficace le signal brut. Toutefois, avec la normalisation



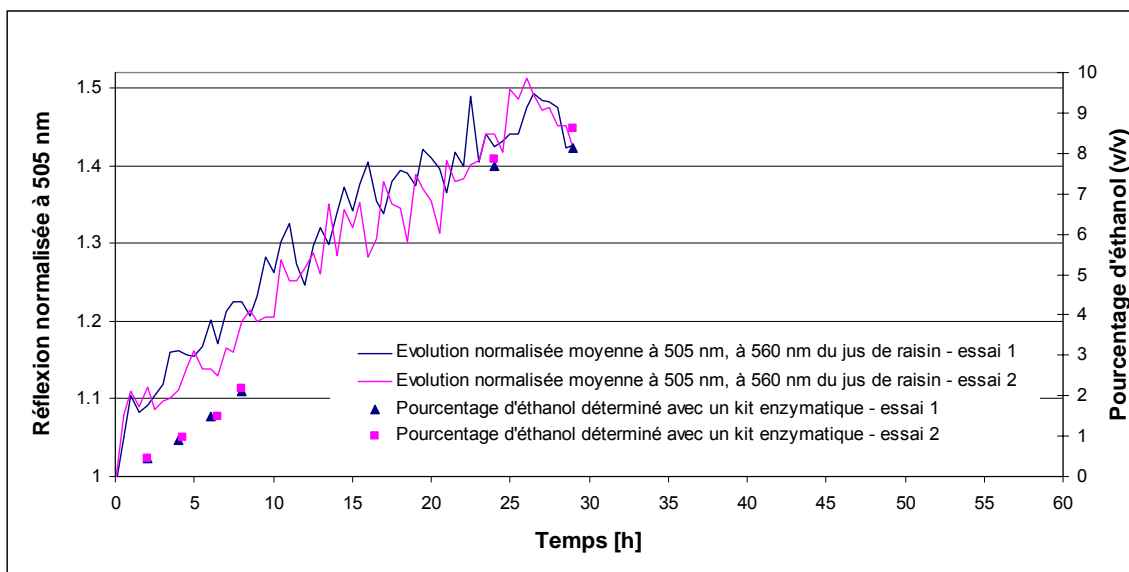
à 505 nm les variations tout au long du temps sont beaucoup plus importantes qu'avec la normalisation MAX. Par conséquent, bien que la normalisation à 505 nm soit plus adaptée pour corriger le signal brut, les résultats obtenus perdent de la précision due aux variations importantes.

### 3.3.5.2. Jus de raisin

Les observations effectuées pour le jus d'orange sont similaires à celles du jus de raisin (figure 3.23). Le signal maximum est atteint au bout d'environ 22 h puis se stabilise lui aussi. Cette stabilisation n'est pas visible sur la figure 3.24 où la normalisation à 505 nm est appliquée. En ce qui concerne la formation d'éthanol, elle est forte dans les premières heures et se stabilise au bout de 20 h à une concentration de 8.5 %. Les différences entre les essais 1 et 2 sont plus faibles pour la normalisation MAX que pour la normalisation à 505 nm.



**Figure 3.23 :** Évolution normalisée MAX de l'éthanol dans un jus de raisin en fermentation



**Figure 3.24 :** Évolution normalisée à 505 nm de l'éthanol dans un jus de raisin en fermentation

La quantité d'éthanol formée au bout de 24 h est de 8.5 %. Ce résultat plus élevé que pour le jus d'orange s'explique par le fait que la concentration en glucide dans le jus de raisin est de 16 g/100 ml contre 9 g/100 ml dans le jus d'orange. Lorsque la concentration d'éthanol se stabilise, ceci ne veut pas forcément dire qu'il n'y a plus de glucide, mais uniquement que la formation d'éthanol s'est arrêtée. Avec la normalisation MAX, un arrêt de la production d'éthanol peut être observé au bout de 22 h, tandis qu'avec la normalisation à 505 nm l'arrêt n'est pas visible. En se basant sur les résultats du kit enzymatique qui disent que la production d'éthanol est arrêtée au bout de 24 h, l'arrêt de la production d'éthanol avec la normalisation à 505 nm ne peut pas être identifié de manière claire à cause de ses variations de signal trop important.

### 3.3.5.3. Jus de pomme

Comme le montre les figures 3.25 et 3.26 la production d'éthanol s'arrête au bout d'environ 20 h avec une concentration 6.3 %. La formation d'éthanol est linéaire les 15 premières heures puis commence à atteindre un plateau. Les différences entre les essais 1 et 2 sont similaires pour la normalisation MAX et la normalisation à 505 nm.

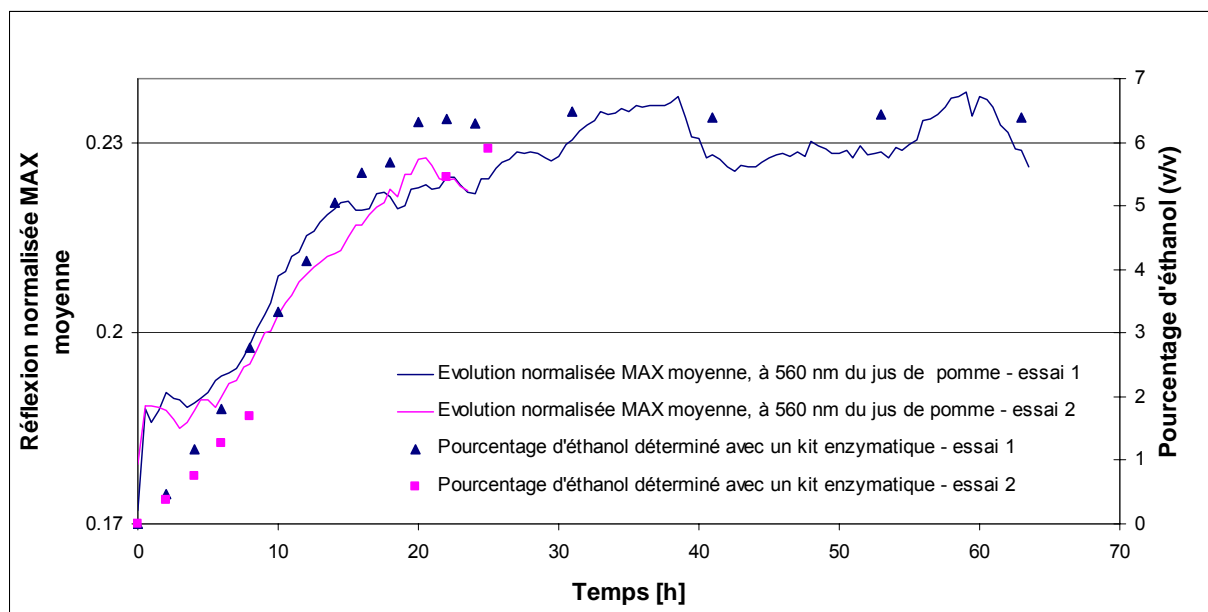


Figure 3.25 : Évolution normalisée MAX de l'éthanol dans un jus de pomme en fermentation

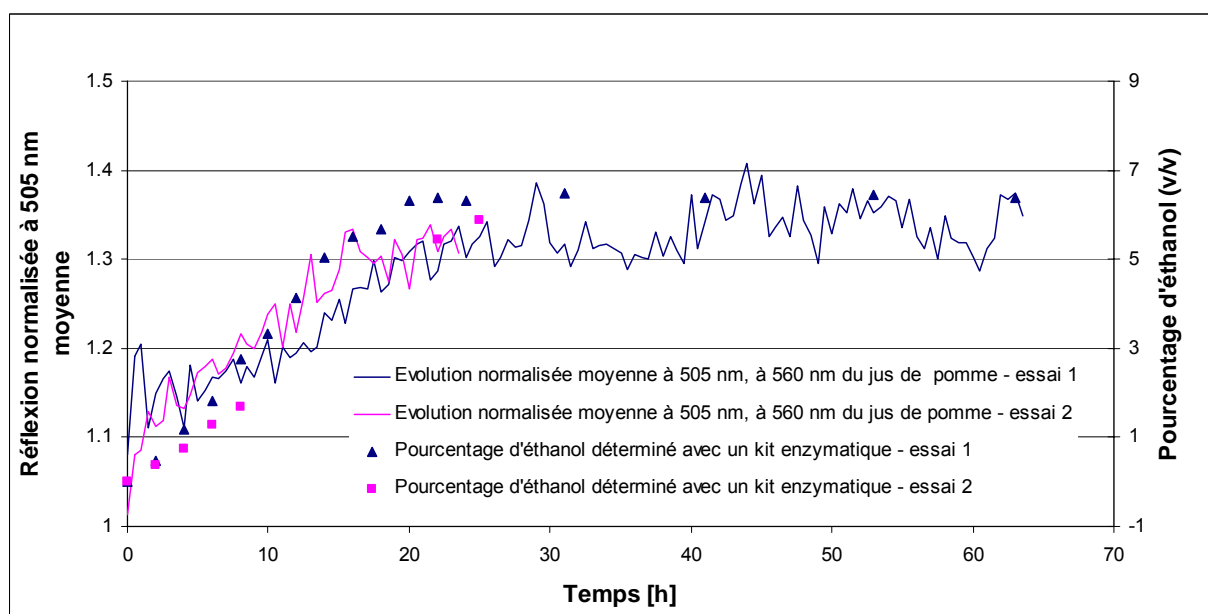
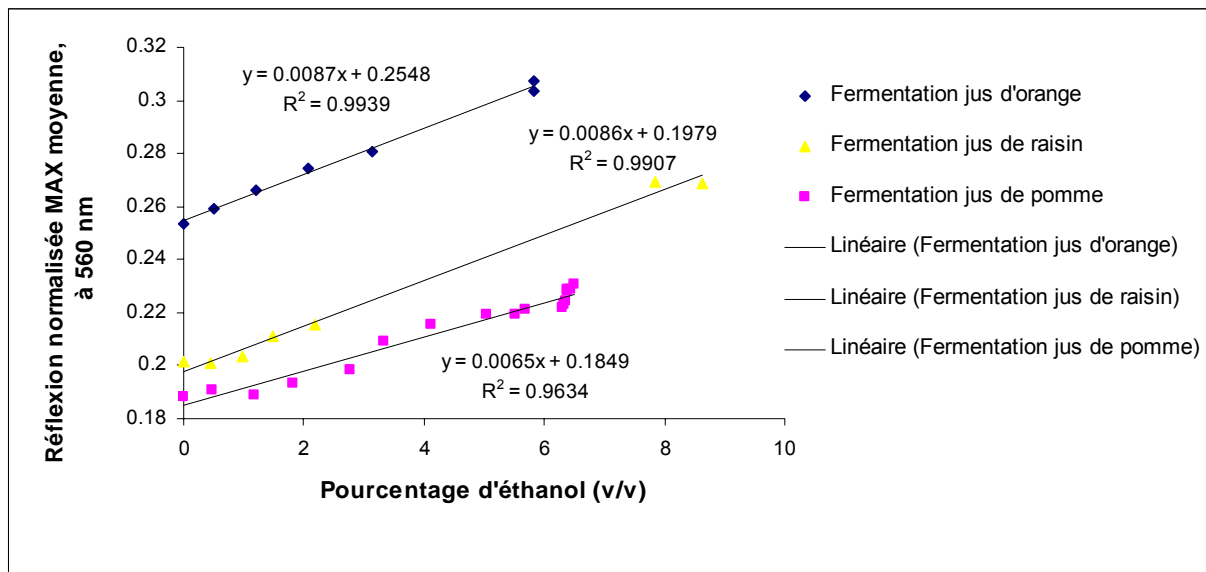


Figure 3.26 : Évolution normalisée à 505 nm de l'éthanol dans un jus de pomme en fermentation

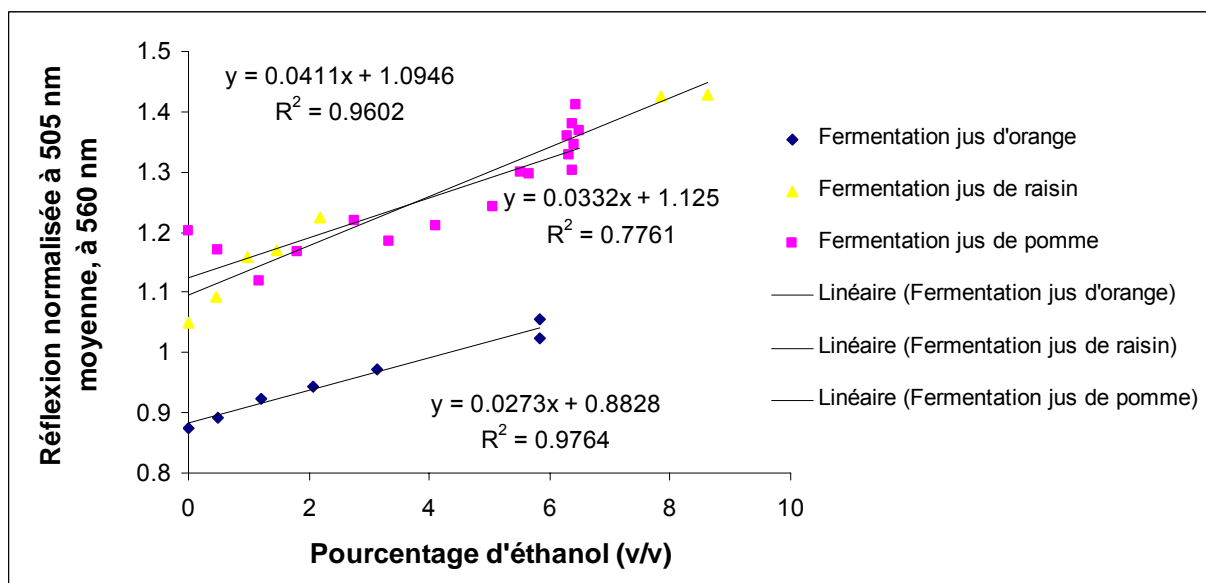
Pour les essais avec le jus d'orange et le jus de raisin, une partie de la fermentation allant de 10 h à 22 h n'était pas couverte par la détermination d'éthanol avec le kit enzymatique. Il n'était donc pas possible d'affirmer que le signal correspond à l'éthanol. L'essai avec du jus de pomme où toutes les 2 h des échantillons ont été pris permet de dire que l'éthanol mesuré à l'aide d'un kit enzymatique tout au long de la fermentation correspond au changement de couleur de la membrane.

### 3.3.5.4. Comparaison des fermentations de jus de fruits

La figure 3.27 représente le signal normalisé MAX moyen et la figure 3.28 le signal normalisé moyen à 505 nm en fonction de l'ETOH déterminé avec le kit enzymatique pour la fermentation de jus d'orange, de raisin et de pomme. Pour les figures 3.27 et 3.28, avec une régression linéaire de premier ordre, il peut être constaté que l'ordonnée à l'origine est différente, mais que les pentes sont similaires.



**Figure 3.27 :** Évolution du signal à 560 nm avec la normalisation MAX lors d'une fermentation en fonction de la teneur en éthanol



**Figure 3.28 :** Évolution du signal à 560 nm avec la normalisation à 505 nm lors d'une fermentation en fonction de la teneur en éthanol

Les coefficients de détermination obtenus avec la normalisation MAX sont meilleurs que ceux obtenus avec la normalisation à 505 nm. Ceci illustre les variations plus élevées de la normalisation à 505 nm contrairement à la normalisation MAX. Il faut également prendre en compte les imprécisions lors de la prise d'échantillons pour la détermination d'éthanol ainsi que la manipulation du kit enzymatique lui-même, car l'éthanol est volatil.

Les résultats de suivi de fermentation sont des résultats relatifs et non absolus. Le changement de l'ordonnée à l'origine atteste qu'il n'est pas possible de mesurer une concentration sans une référence (blanc). Dans ce cas, la référence (0 % éthanol) correspond au signal 30 min après le début de l'essai. De plus, il n'est pas possible de suivre la fraîcheur d'un jus de fruits, car il peut être considéré comme « frais » seulement s'il y a moins de 0.5 % d'éthanol. Même avec un suivi en continu cette concentration est trop faible pour être détectée. Les variations du signal tout au long de la fermentation sont supérieures à 0.5 %.

Toutefois, l'évolution d'une fermentation de jus de fruit peut être suivie. Les mesures ne sont pas assez précises pour avoir un résultat quantitatif, mais un résultat qualitatif peut être obtenu. La cinétique de la fermentation ainsi qu'un arrêt de production d'éthanol peuvent facilement être observés. Une application serait donc de surveiller la fermentation de jus de fruits.

### 3.3.6. Mesure d'un jus de raisin dans une bouteille

La fermentation dans une bouteille avec 900 g de jus de raisin avec 9 g de levure se comporte de façon similaire aux essais effectués avec les vials (figure 3.23 et 3.24). Comme le montrent les figures 3.29, 3.30 et 3.31, le signal atteint son maximum aux alentours de 20 h puis se stabilise. Pour les figures avec les normalisations, le signal varie fortement une fois les 20 h dépassées un plateau semble être visible au bout de 50 h.

- Premier essai avec jus de raisin

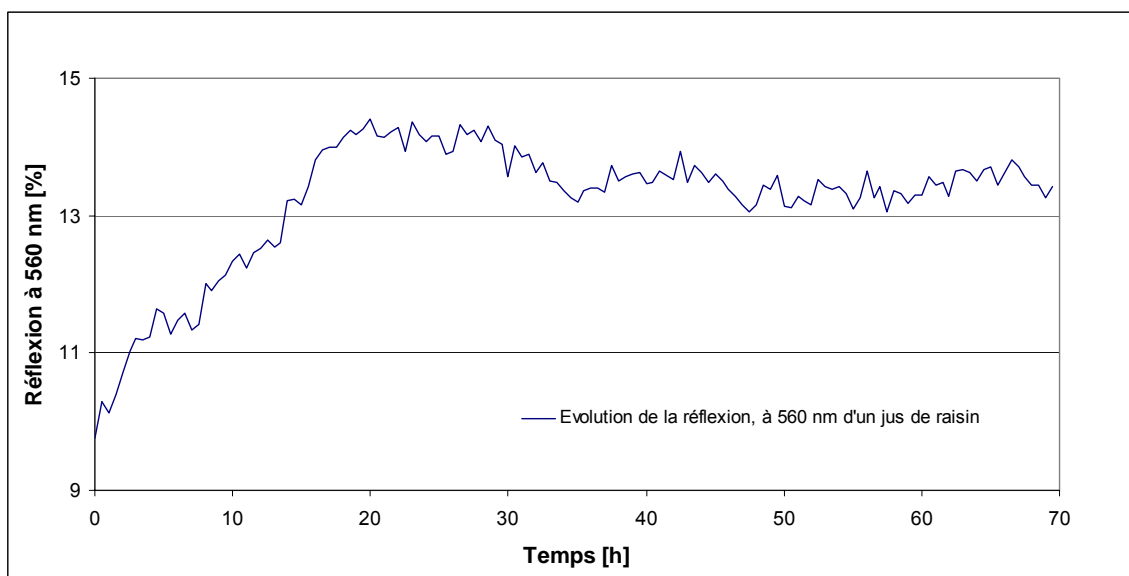
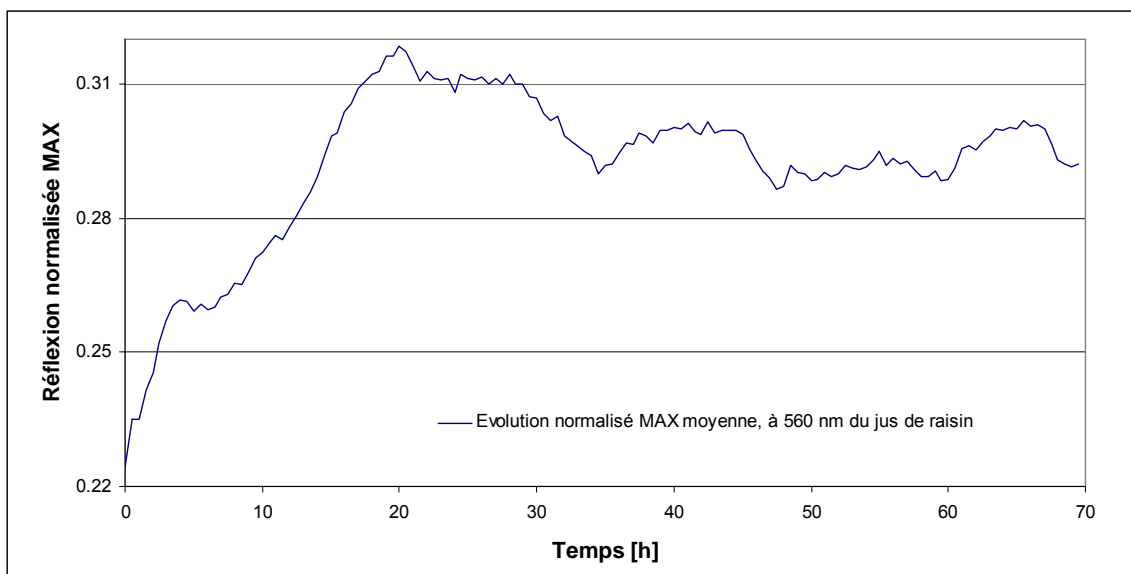
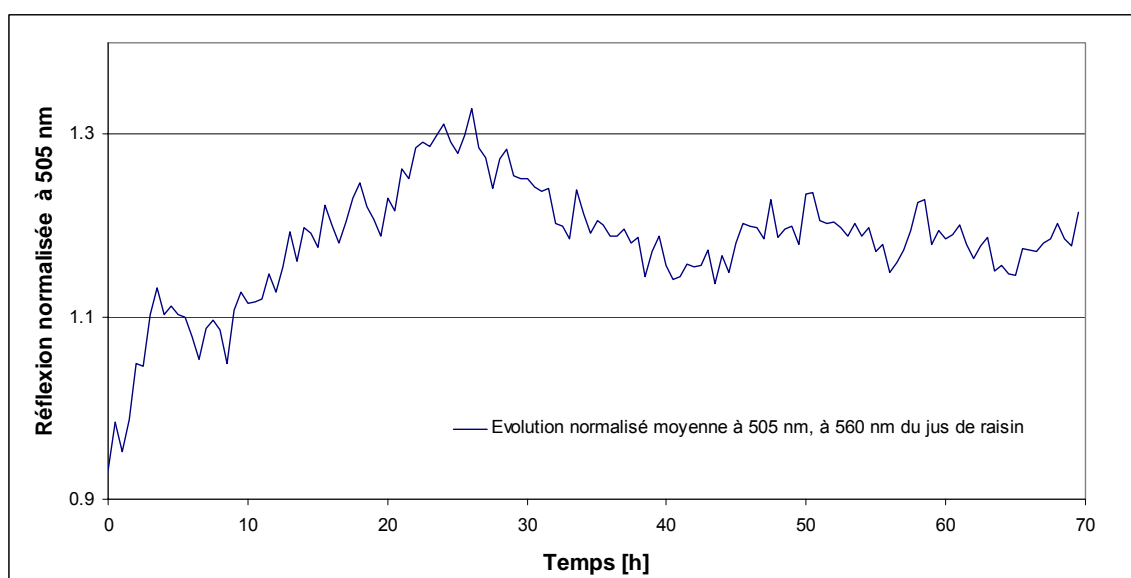


Figure 3.29 : Évolution de la réflexion de l'éthanol dans un jus de raisin en fermentation



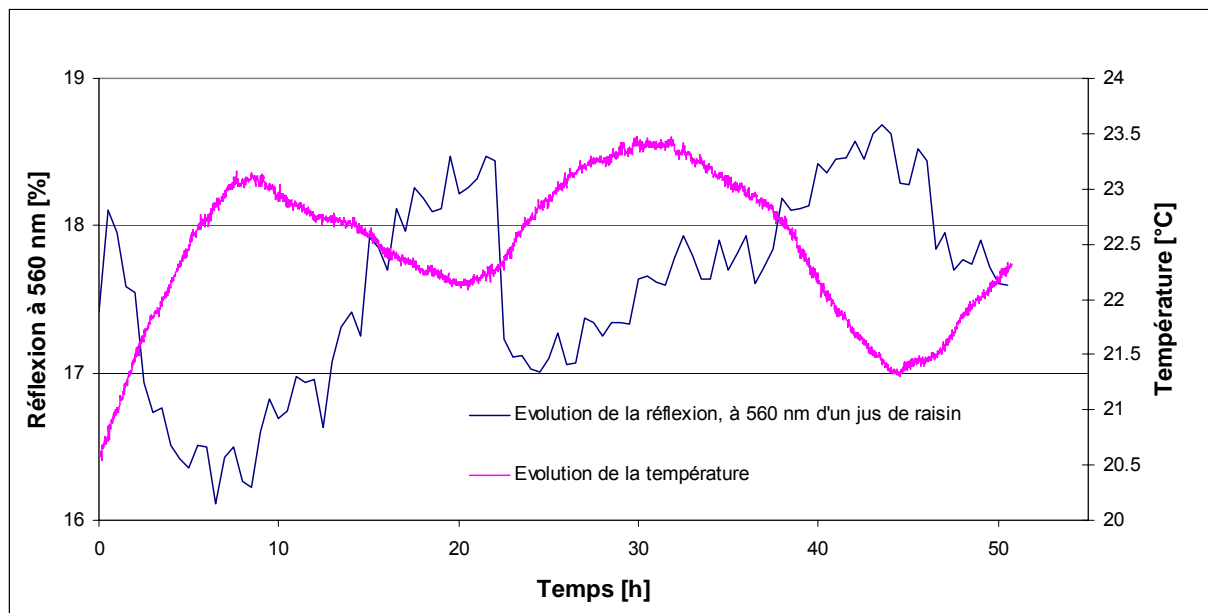
**Figure 3.30 :** Évolution normalisée MAX de l'éthanol dans un jus de raisin en fermentation



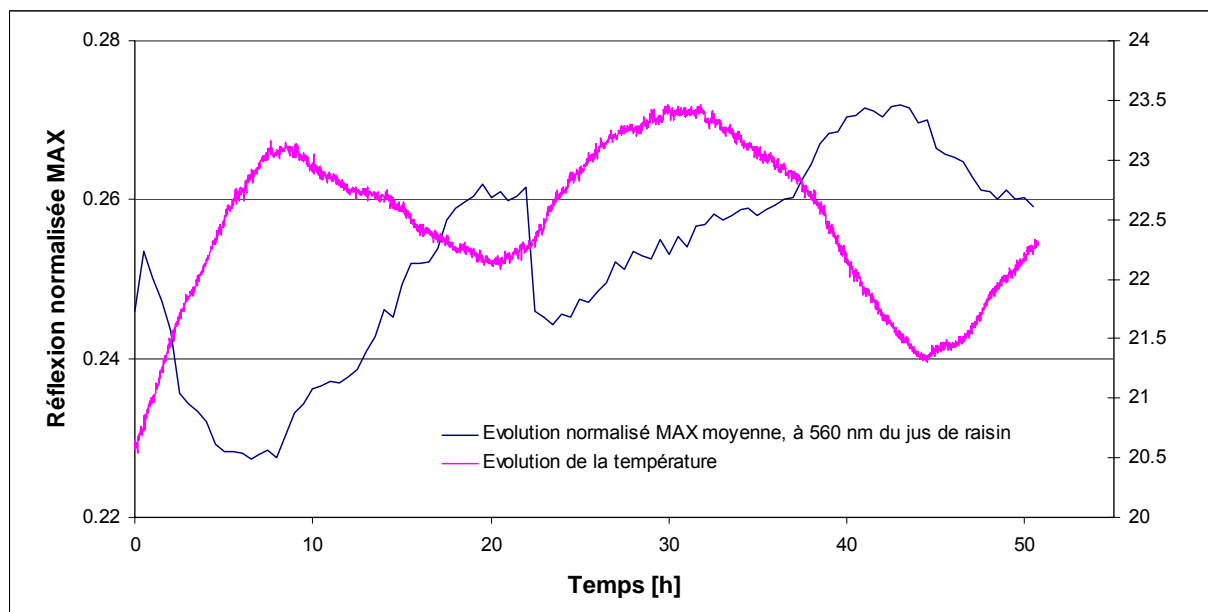
**Figure 3.31 :** Évolution normalisée à 505 nm de l'éthanol dans un jus de raisin en fermentation

- Deuxième essai avec du jus de raisin

Une fermentation dans une bouteille contenant 800 ml jus de raisin avec 2 g de levures est illustrée par les figures 3.32, 3.33 et 3.34. De plus, la température est suivie grâce à une sonde embarquée. Des variations importantes du signal sont observées sur les deux premières figures tandis que sur la troisième les variations sont beaucoup plus faibles. En ce qui concerne la température, les résultats pour les deux premières figures sont similaires aux figures 3.17 et 3.18. C'est-à-dire que la température ondule de manière inverse au signal. Pour la normalisation à 505 nm les variations de la température et du signal ne sont pas liées.

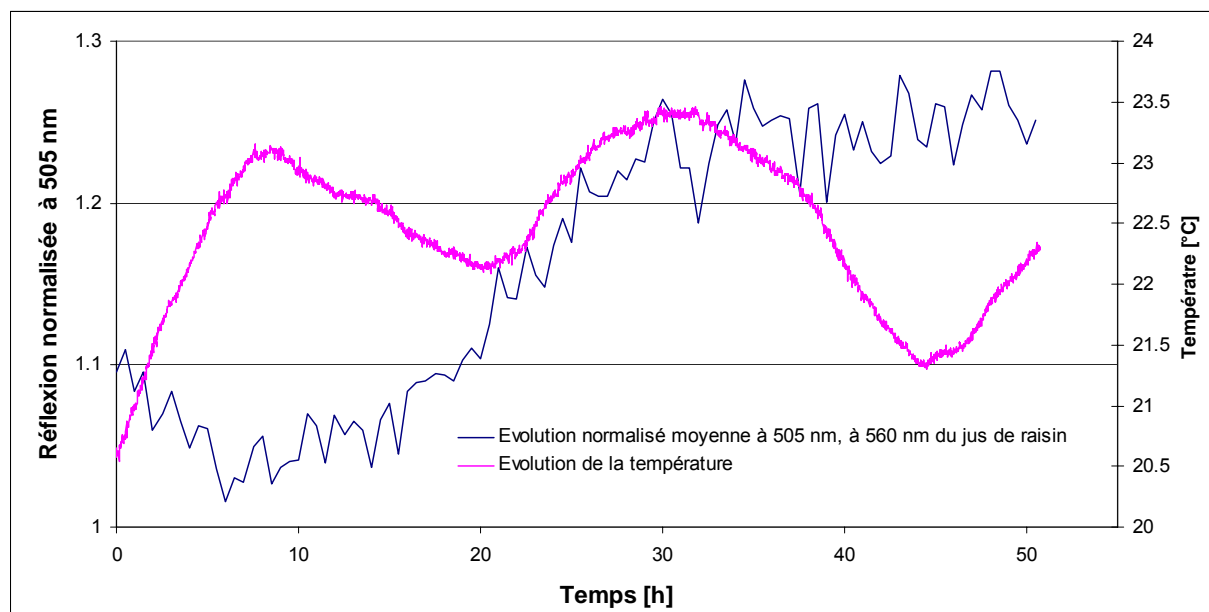


**Figure 3.32 :** Évolution de la réflexion de l'éthanol dans un jus raisin en fermentation



**Figure 3.33 :** Évolution normalisée MAX de l'éthanol et de la température dans un jus de raisin en fermentation





**Figure 3.34 :** Évolution normalisée à 505 nm de l'éthanol et de la température dans un jus de raisin en fermentation

En effectuant un scaling-up en passant d'un volume de 15 ml à 900 ml de jus de raisin (figures 3.29, 3.30 et 3.31) pour la fermentation, des variations importantes sont apparues. Surtout en ce qui concerne les deux normalisations. D'une part, la pente n'est pas régulière, et d'autre part, au bout de 20 h, les variations sont très importantes. Sur le couvercle beaucoup de condensats de vapeur ont pu être observés ce qui indique une forte variation de température. Le 2<sup>ème</sup> essai le confirme. En effet, tout au long de la fermentation, la température varie d'environ 2 °C. Si dans un vial l'hypothèse que la température ne varie pas peut être faite, ceci n'est pas valable pour un volume plus grand. Sur le deuxième essai pendant les 10 premières heures le signal diminue puis augmente. Cette diminution est due au fait que la membrane utilisée pour cet essai n'était pas encore totalement revenue à son état d'origine. La normalisation à 505 nm est la plus adaptée pour corriger les fluctuations de la température. Toutefois, ses variations restent assez importantes.

Au vu de ces résultats, il est difficile de prédire comment le signal se comporterait lors d'une fermentation de jus de raisin afin de produire du vin à échelle industrielle. Plusieurs observations peuvent toutefois être prises en compte. Les concentrations de levures utilisées pour les essais étaient 50 fois plus élevées que dans l'industrie, ceci afin d'avoir une fermentation en 1 à 2 jours au lieu de 4 à 5 jours. La variation de température influencée par la chaleur produite par les levures pour les essais avec des petits volumes est plus faible que pour des volumes industriels. De plus, si une faible concentration de levures est présente, celles-ci doivent d'abord se multiplier à l'aide du métabolisme oxydatif qui dégage plus de chaleur que le métabolisme fermentatif. Sachant qu'en industrie la fermentation est plus longue et que les variations de températures sont plus importantes, il est probable que les résultats obtenus risquent d'être très imprécis.

### 3.3.7. Mesure d'altération d'un poisson

2 g d'un maquereau (poisson) frais sont mis dans un vial et la réflexion est mesurée chaque 30 min avec le spectromètre à fibre optique. La figure 3.35 montre que le signal varie peu tout au long de l'essai et que les courbes ne croissent pas de manière régulière en fonction du temps. Sur la figure 3.36 la même chose peut être observée, mais en plus il peut être constaté qu'il n'y a pas de point isobestique aux alentours de 505 nm. Le changement de signal à 560 nm est inférieur à 0.05. La figure 3.37 présente des propriétés similaires à la figure précédente et sa différence en signal est inférieure à 0.05.

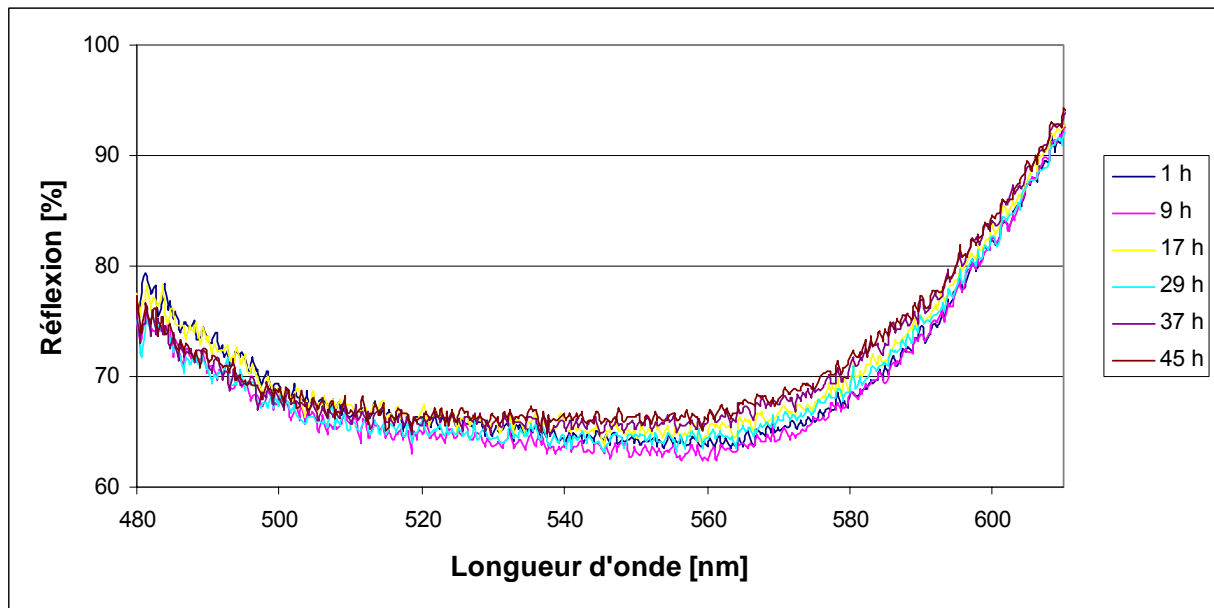


Figure 3.35 : Courbes de réflexion brute d'une altération de poisson en fonction du temps

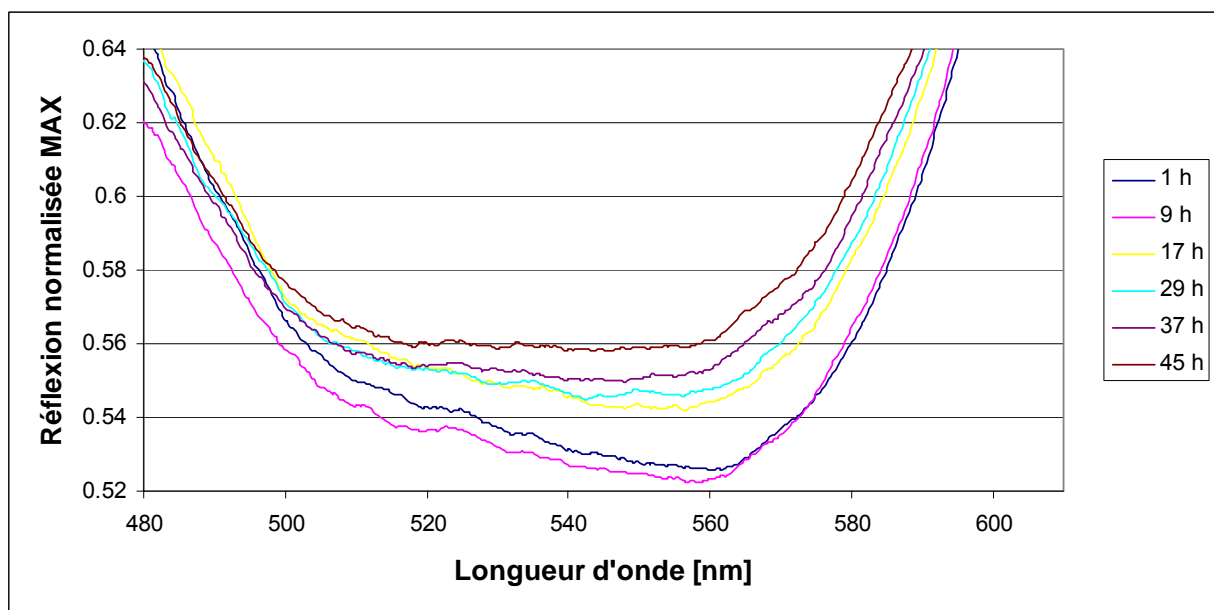
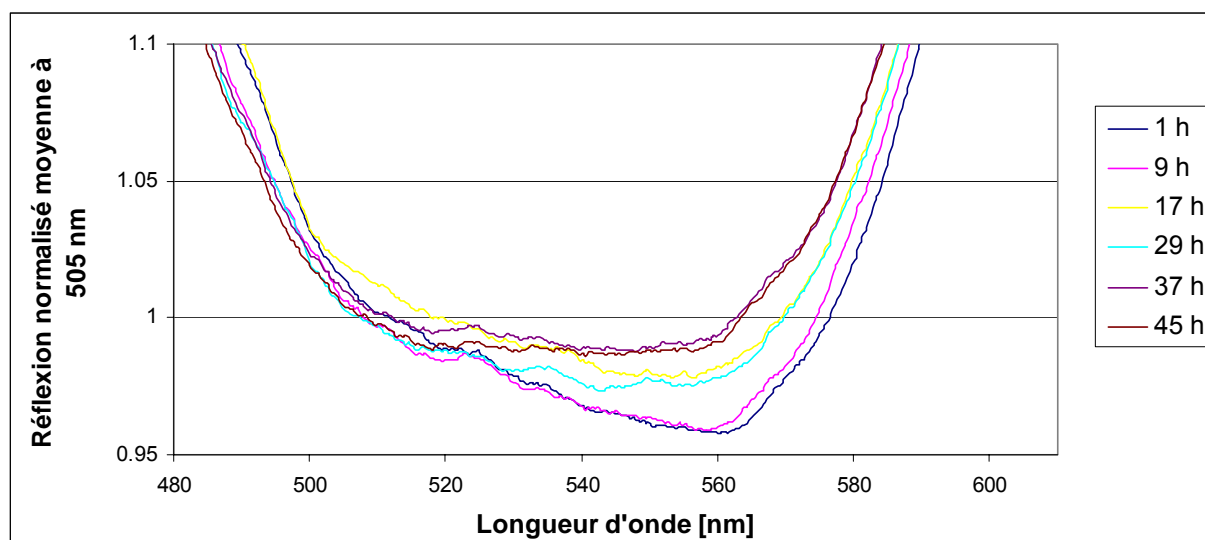


Figure 3.36 : Courbes de réflexion normalisée MAX d'une altération de poisson en fonction du temps



**Figure 3.37 :** Courbes de réflexion normalisée à 505 nm d'une altération de poisson en fonction du temps

L'altération du poisson a été mesurée pendant 2 jours à température ambiante. Bien que le changement de signal soit faible, ce qui pousse à dire que le poisson est faiblement altéré, au bout de cette période l'odorat n'arrivait pas à la même conclusion. Selon l'odeur le poisson stocké à température ambiante était périmé au bout de 2 jours. L'absence d'un point isobestique à 505 nm confirme que le signal varie uniquement en intensité et que les différences sont des erreurs de précision. De plus, en regardant la figure 3.37 avec la normalisation à 505 nm et en la comparant avec la figure 3.19, une variation de 0.05 peut très bien correspondre à l'influence du changement de la température ambiante. Les raisons pouvant expliquer pourquoi il n'y a pas de changement de signal sont les suivantes :

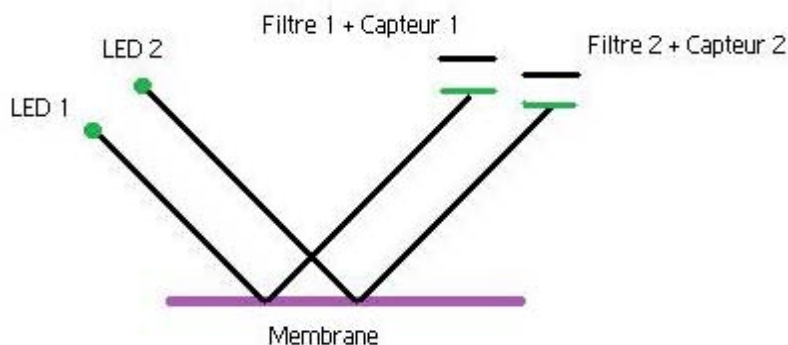
D'une part, la concentration en oxyde de triméthylamine dans le poisson est faible et varie entre 40 – 150 mg/100 g, ce qui correspond grossièrement à 5 – 20 mM. Or tout n'est pas transformé en TMA. Également, cette faible concentration peut se situer à la limite de détection. La 2<sup>ème</sup> chose à prendre en compte est que la membrane réagit seulement avec des composés neutres. Or le triméthylamine se trouve dans sa forme neutre seulement au-delà d'un pH de 10 et le poisson a un pH proche de 6.8. Donc, même en supposant qu'une concentration importante en triméthylamine soit présente, cela n'est pas mesurable si le pH est inférieur à 10. En préparant des solutions de triméthylamine à différents pH ceci a été confirmé. Avec un pH 6.8 et une concentration de 100 mM de TMA, aucun changement de couleur n'est observable tandis que pour la même concentration, mais avec un pH 10, un changement de couleur peut être observé. Cependant, pour qu'un changement de couleur ait lieu il faut compter plusieurs heures.

Il peut donc être conclu que suivre la fraîcheur du poisson n'est pas possible, car d'une part la concentration est faible, et que d'autre part il faudrait des conditions basiques pour que l'analyte soit neutre et réagisse avec la membrane.

### 3.4. Estimation du coût pour un appareil de mesure spécifique

Au lieu de travailler avec tout le spectre visible, il est possible de travailler seulement avec deux longueurs d'ondes. Lorsque la normalisation à 505 nm est effectuée, tout le spectre est mesuré, mais seuls les longueurs d'ondes 505 et 560 nm sont utiles. Par conséquent, il est possible d'obtenir un résultat en n'utilisant que ces deux longueurs d'onde. Un spectromètre à fibre optique est cher et demande une puissance de calcul élevée afin de balayer et de traiter tout le spectre visible.

Il est possible de fabriquer un appareil s'intéressant uniquement aux longueurs d'ondes spécifiques. Pour cela il faut deux LED (diodes électroluminescentes) vertes qui vont de 500 à 600 nm puis deux filtres afin d'isoler seulement les deux longueurs d'ondes intéressantes, c'est-à-dire 505 et 560 nm. Puis deux capteurs, ainsi qu'une carte servant à faire le lien entre les capteurs et un ordinateur (figure 3.38). Bien entendu, la distance entre les LED et la membrane ainsi que celle entre la membrane et les filtres doivent être fixes. Le prix du matériel pour cela se situe entre 500 et 1'000 CHF sans compter le travail de conception



**Figure 3.38 :** Schéma du fonctionnement de l'appareil

## 4. Conclusion et perspectives

Des deux colorants (CR-546 et ETH 4001) et des deux méthodes de fabrication (membrane en PVC et à base de sol-gel), le travail s'est concentré sur le CR-546 incorporé dans une membrane en PVC. La mesure de la fraîcheur d'un jus de fruits à l'aide de la sensibilité de la membrane à l'éthanol n'est pas possible, car les concentrations devant être trouvées (maximum 0.5 % d'éthanol) se situent à la limite de détection. De plus, il n'est pas possible d'effectuer une mesure absolue sans avoir de référence (blanc de la solution lorsque elle contient 0 % d'éthanol). La référence dépend de facteurs tels que la distance entre la fibre optique et la membrane qui doit être constante. Seule une évolution du signal peut être suivie, ce qui veut dire que les résultats sont relatifs et non absolus. Ceci permet donc de suivre par exemple la cinétique d'une fermentation. Cependant, des facteurs comme la température, qui provoquent une vaporisation partielle de la solution, viennent perturber le signal et fournissent des résultats d'une mauvaise précision. Par conséquent, la détermination est plus qualitative que quantitative.

En ce qui concerne la détection des amines (triméthylamine) dans du poisson avec l'aide de la membrane, ceci n'est pas possible, car d'une part les concentrations en amines sont faibles et d'autre part la membrane réagit seulement avec des analytes à l'état neutre. Or, le triméthylamine doit avoir un pH supérieur à 10 pour être présent sous sa forme neutre et se lier à la membrane.

Si le travail doit être poursuivi pour les jus de fruits il est important qu'un montage soit effectué où la distance entre la fibre optique et la membrane soit toujours la même. Afin de s'assurer qu'elle reste constante, deux possibilités existent. La première serait de fabriquer un appareil comme décrit dans le point 3.4 et la seconde d'utiliser une pièce venant se fixer au bout de la fibre optique et permettant de fixer la membrane. Toutefois, ceci ne corrigerait pas totalement l'influence de la température sur la membrane. De ce fait, il faudrait peut-être plutôt essayer de mesurer la phase aqueuse directement au lieu du headspace.

## 5. Bibliographie

- [1] Stubenrauch C., Gut verpackt? Neue Verpackungen für Lebensmittel, Chem. Unserer Zeit, 39, (2005), 310-316
- [2] Kerry J. P., O'Grady M. N. & Hogan S. A., Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review, Meat Science, 74, (2006), 113-130
- [3] Mills A., Oxygen indicators and intelligent inks for packaging food, Chem. Soc. Rev., 34, (2005), 1003-1011
- [4] Martine E., Les fonctions de l'emballage, heig-vd, septembre 06
- [5] Mohr G. J., Chromo- and Fluororeactands: Indicators for Detection of Neutral Analytes by Using Reversible Covalent-Bond Chemistry, Chem. Eur. J., 10, (2004), 1082-1090
- [6] Procédé sol-gel, [http://fr.wikipedia.org/wiki/Proc%C3%A9d%C3%A9\\_sol-gel](http://fr.wikipedia.org/wiki/Proc%C3%A9d%C3%A9_sol-gel), consulté le 18.09.07
- [7] Mohr G. J., Optical sensor for aqueous ethanol based on inner filter effect between a trifluoroacetylazobenzene dye and a fluorophore, Friedrich-Schiller-Universität Jena
- [8] Mohr G. J., Optical sensors for alcohols and amines, Sigma-Aldrich Sensorics, 05-08
- [9] Mohr G. J., Optical sensors for gaseous and aqueous amines based on chromoreactands, Friedrich-Schiller-Universität Jena
- [10] Ordonnance du DFI du 23 novembre 2005 sur les boissons sans alcool (en particulier thé, infusions, café, jus, sirops, limonades), RS 817.022.111, Etat le 12 décembre 2006, OFSP, Bern
- [11] Innerhofer G., Das Grosse Buch der Obstverarbeitung Handbuch\_für\_praktiker, avbuch, (2005), 092-095
- [12] Levure, <http://fr.wikipedia.org/wiki/Levure>, consulté le 30.10.07
- [13] Schmitt R., Cours microbiologie alimentaire, chapitre pain, HEVs, 2006
- [14] Belitz, Grosch et Schieberle, Lehrbuch der Lebensmittelchemie, 5., vollständig überarbeitete Auflage, Springer, Berlin, (2001), 613-616
- [15] Wie frisch ist der Fisch? – Die Ionenchromatographie gibt Aufschluss! - Biogene Amine in Fisch, Metrohm Information Heft, 2, (2005), 22-24
- [16] Ordonnance du DFI du 26 juin 1995 sur les substances étrangères et les composants dans les denrées alimentaires (Ordonnance sur les substances étrangères et les composants, OSEC), RS 817.021.23, Etat le 10 octobre 2006, OFSP, Bern
- [17] Décision de la Commission, du 8 mars 1995, fixant les valeurs limites en azote basique volatil total (ABVT) pour certaines catégories de produits de la pêche et les méthodes d'analyse à utiliser, 95/149/CE, Journal officiel n° L 097 du 29/04/1995, 0084-0087
- [18] Olafsdóttir G. et al, Methods to determine the freshness of fish in research and industry : proceedings of the Final Meeting of the Concerted Action "Evaluation of fish freshness" AIR3CT94 2283 : Nantes conference, November 12-14, 1997 / International Institute of Refrigeration, 30-35 et 82-99

- 
- [19] Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA), <http://www.inspection.gc.ca/francais/fssa/concen/cause/histamf.shtml>, consulté le 20.09.07
- [20] Réflexion optique, [http://fr.wikipedia.org/wiki/R%C3%A9flexion\\_optique](http://fr.wikipedia.org/wiki/R%C3%A9flexion_optique), consulté le 18.09.07
- [21] Korent Š. M., Lobnik A. & Mohr G. J., Sol-gel-based optical sensor for the detection of aqueous amines, *Anal Bioanal Chem*, 387, (2007), 2863-2870
- [22] Mohr G. J., Tailoring the sensitivity and spectral properties of a chromoreactand for the detection of amines and alcohols, *Analytica Chimica Acta*, 508, (2004), 233-237
- [23] Mode opératoire pour l'utilisation du kit enzymatique, [http://www.scildiagnostics.com/multimedia/de/Scildiagnostics/pdf/Produkte/5340/PI/PI\\_5340\\_fr-width--height-.pdf](http://www.scildiagnostics.com/multimedia/de/Scildiagnostics/pdf/Produkte/5340/PI/PI_5340_fr-width--height-.pdf), consulté le 02.10.07
- [24] Mohr G. J. et Spichiger-keller U. E., Development of an Optical Membrane for Humidity, *Mikrochim. Acta*, 130, (1998), 29-34

## 6. Annexes

- Mesures de réflexion sur CD