

JORDI ROVIRA FORTUNY

Espectroscòpia ATR-FTMIR i anàlisi multivariant com a eines per a la detecció de desviacions durant la fermentació alcohòlica

Treball de Fi de Grau

Tutora: Laura Aceña Muñoz

Facultat d'Enologia



UNIVERSITAT ROVIRA i VIRGILI

Tarragona

14 de juny de 2021

ÍNDEX

0. RESUM.....	1
1. INTRODUCCIÓ	2
Fermentació alcohòlica	2
Temperatura	2
Nutrients (nitrogen fàcilment assimilable)	3
Control de la fermentació en cellers	3
Les Tecnologies Analítiques de Procés (PAT)	4
Tractament de dades	6
2. OBJECTIUS DEL TREBALL	7
3. MATERIALS I MÈTODES	8
Most i llevats	8
Micro-fermentacions.....	8
Anàlisi Infraroig	9
Recopilació dels espectres i anàlisi multivariant.....	10
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ	11
Regressió per Mínims Quadrats Parcial (Partial Least Squares Regression o PLS).....	16
5. CONCLUSIONS	23
6. BIBLIOGRAFIA.....	24

0. RESUM

Durant la fermentació alcohòlica del vi en bodega poden produir-se diferents desviacions que poden tenir diferents causes i orígens, entre les quals hi pot haver una manca de nutrients nitrogenats o un augment de temperatura inesperat, que poden afectar de manera considerable als llevats i acabar comportant problemes durant el procés fermentatiu o l'obtenció final d'un producte de baixa qualitat que pot implicar pèrdues econòmiques al celler. L'ús de l'ATR-FTMIR com a eina analítica ràpida per controlar el procés de fermentació podria ser molt útil ja que permet obtenir informació a temps real del procés i permetria realitzar els reajustaments necessaris en el moment oportú.

En el present estudi, es preparen tres tipus de micro-fermentacions: una en condicions normals (CON), una altra a la qual se li aplica un augment de temperatura en un moment determinat (TEM) i una altra a la qual no se li subministra compostos nitrogenats (YAN). El seguiment de les fermentacions es duu a terme utilitzant metodologia clàssica (densitat i pH) per una banda i mitjançant l'aparell ATR-FTMIR portable i tractant posteriorment les dades amb anàlisis multivariants. L'objectiu és aprofundir en la detecció ràpida i anticipada de problemes i desviacions en el procés fermentatiu, en aquest cas, per augment de temperatura i per dèficit de nitrogen.

Així doncs, per aconseguir extreure informació sobre la fermentació alcohòlica, s'utilitzen diferents tècniques multivariants com l'Anàlisi de Components Principals, que ens proporciona la informació de la màxima variabilitat que presenta l'espectre; la Regressió per Mínims Quadrats Parcial, la qual permet predir els valors de densitat i pH, i l'Anàlisi Discriminant per Mínims Quadrats Parcial, que permet discriminar correctament entre les fermentacions CON i les YAN a l'hora 72 des de l'inici de la fermentació però, que en canvi no és capaç de fer-ho entre les CON i les TEM.

Com a conclusions, l'ATR-FTIR juntament amb l'anàlisi multivariant mostra un gran potencial com a eina d'anàlisi en línia ràpida i senzilla per controlar la fermentació del vi i detectar problemes del procés en etapes primerenques.

1. INTRODUCCIÓ

Fermentació alcohòlica

Els llevats, com qualsevol ésser viu, per tal de sostenir les seves funcions vitals necessiten un substrat a degradar del qual en puguin obtenir energia. Així doncs, la fermentació alcohòlica és el procés metabòlic que duen a terme aquests microorganismes en condicions anaeròbiques, en el qual s'utilitza com a substrat els sucres que conté el medi i els transformen en etanol. El gènere de llevats principalment responsable de la fermentació alcohòlica en processos vínics és el gènere *Saccharomyces* i, en concret, l'espècie *S. cerevisiae*.

Perquè els llevats puguin dur a terme un creixement i un desenvolupament òptim durant la fermentació alcohòlica, hi ha una sèrie de factors que influiran de manera molt notable en aquest procés. Aquests són la temperatura de fermentació, el règim de ventilació i la disponibilitat de nutrients, entre d'altres.

Quan aquestes condicions es veuen alterades o desviades, és quan es poden produir problemes en la fermentació com ara aturades o alentiments pronunciats en el procés. Aquest tipus de fets normalment representen un gran inconvenient, ja que poden donar lloc a vins dolços, causats per la manca de sucres fermentats, la qual cosa també pot acabar derivant en refermentacions en ampolla i, alhora, aquesta problemàtica també pot propiciar la contaminació del substrat per part d'altres microorganismes que utilitzin els sucres que han quedat sense fermentar per dur a terme els seus propis processos metabòlics i, així, provocar un canvi important tant a nivell fisicoquímic com a nivell organolèptic del producte final fent-ne devaluar la seva qualitat [1].

Els dos factors que més es poden destacar i que afecten al creixement de la població de llevats i, per tant, al transcurs del procés fermentatiu són:

Temperatura

La temperatura és el factor més rellevant en la cinètica fermentativa. És comprovat que entre 5° i 40 °C es pot dur a terme l'inici i el desenvolupament de la fermentació alcohòlica. A més, cal destacar que el punt òptim de cinètica de fermentació es troba entre 30 i 35 °C, la qual cosa no implica que sigui la temperatura adequada per a dur a terme fermentacions víniques, ja que en aquestes condicions de temperatura es generen subproductes que fan davallar molt la qualitat organolèptica del vi resultant. Precisament per aquest motiu, es recomana que les fermentacions siguin entre 15° i 20°C per a mostos blancs i entre 25° i 30°C per a mostos negres.

Així doncs, quan la temperatura sobre passa els 35-40°C, es pot produir una paralització del creixement de la població de llevats causat per la desnaturalització de les proteïnes cel·lulars del llevat. Per altra banda, si la temperatura és massa baixa (inferior a 5°C), es pot inhibir la fermentació alcohòlica ja que es redueix la fluïdesa de la membrana plasmàtica dels llevats dificultant així el transport de substàncies [1].

Nutrients (nitrogen fàcilment assimilable)

Per altra banda, cal tenir en compte les necessitats nutricionals dels llevats. Perquè aquests puguin sintetitzar les proteïnes requerides per al seu creixement i desenvolupament, necessiten disposar de compostos nitrogenats fàcilment assimilables, com ara l'ió amoni, els aminoàcids (excepte la prolina) i algunes cadenes de pèptids. A vegades, el most en si ja conté les quantitats de nitrogen òptimes per tal que es pugui dur a terme tot el procés de fermentació sense inconvenients, però, malgrat això, en força casos cal afegir aquests compostos en forma de sals amoniacals, normalment quan els valors de nitrogen fàcilment assimilable (NFA) es troben per sota de 150-200 mg/L.

El dèficit de nitrogen, molt sovint apareix com a conseqüència de mostos massa nets, degut a que el procés de clarificació propicia l'arrossegament i la posterior precipitació d'aquestes molècules i d'aquesta manera es perden molts compostos nitrogenats del medi. Nogensmenys, també hi pot haver una carència de nitrogen causada per veremes molt empobrides en aquestes substàncies per diferents situacions com ara vinyes massa velles, estrès hídric, vigor insuficient o la simple manca d'aquests compostos en els sòls on es troben les vinyes [1].

Com s'ha esmentat anteriorment, les alentides i les aturades de fermentació poden tenir conseqüències força greus per a un celler ja que sovint provoquen canvis organolèptics molt pronunciats que fan davallar molt la qualitat del producte final o la obtenció de mostos a mig fermentar, la qual cosa acaba implicant pèrdues econòmiques importants, ja que la gestió d'aquest producte defectuós pot ser molt complicada. Per tant, tenint en compte aquests impactes, és d'extrema utilitat trobar una manera de poder predir fermentacions problemàtiques amb antelació per tal de poder dur a terme accions correctives que redueixin significativament aquestes pèrdues [2].

Control de la fermentació en cellers

El problema actual en vers l'anticipació d'aquest tipus de fenòmens, rau en la metodologia que empren la immensa majoria de cellers per controlar la dinàmica de la fermentació. Per tal de fer un seguiment de tot aquest procés, normalment només es duen a terme controls de

temperatura, densitat i pH que, com a molt, tan sols es mesuren dues vegades diàries i, sovint, sumat a un examen sensorial del most per tal de poder fer una revisió aromàtica, gustativa i visual del producte. D'aquesta manera, quan el procés de fermentació avança sense cap impediment, aquest tipus d'avaluacions són suficients per tal de realitzar-ne un bon seguiment però, quan s'hi produeixen problemes com els esmentats anteriorment, ens trobem amb l'inconvenient de la lentitud i la poca capacitat d'anticipació que presenten aquests tipus de controls [3].

Precisament per aquest motiu, és necessari cercar altres tècniques i mètodes que permetin un examen del procés de fermentació molt més ràpid, a temps real, per tal de poder actuar i anticipar-se enològicament a qualsevol tipus de problema que pugui sorgir o bé, poder reconduir amb èxit qualsevol inconvenient que s'estigui duent a terme.

Les Tecnologies Analítiques de Procés (PAT)

Dins d'aquesta recerca per poder estudiar els processos de producció de manera més ràpida i eficient, hi trobem les anomenades Tecnologies Analítiques de Procés (PAT, per les seves sigles en anglès). Les PAT es poden definir com un sistema per analitzar i controlar el procés d'elaboració d'un producte mitjançant mesures puntuals i oportunes, obtenint així dades a temps real que serveixin per a millorar la qualitat final d'aquest, de tal manera que si s'hi observen desviacions, les accions correctives es poden aplicar de forma molt prematura [4]. Aquest tipus de tècniques fa temps que són aplicades en grans indústries com ara la farmacèutica o l'alimentària amb grans èxits i, és per això, que actualment es busca com es poden utilitzar en la indústria vitivinícola [3].

De totes aquestes tècniques ràpides, s'ha vist que una de les més efectives per a controlar processos fisicoquímics és l'espectrofotometria infraroja, tant la propera (entre 4000 i 14000 cm^{-1}), com la mitjana (entre 700 i 4000 cm^{-1}). L'absorbància que les mostres presenten per aquests rangs de mesura quan s'analitzen per espectroscòpia infraroja i l'espectre que en resulta de cada mesura, està relacionat amb les principals substàncies químiques dels aliments, com ara les proteïnes, els hidrats de carboni, els greixos i l'aigua. En particular, en aquestes regions de l'espectre infraroig, es determinen les vibracions dels enllaços O-H, C-H, C-C, C-O i N-H, que, alhora són la immensa majoria d'enllaços que trobem en un medi com el most o el vi. La fermentació alcohòlica es pot explicar, bàsicament, com la disminució de la quantitat de sucres i el conseqüent augment de la quantitat d'etanol. Això es tradueix en tot un seguit d'espectres diferents. Tot això, sumat al fet de que es tracta d'un mètode no-destructiu i molt ràpid

d'utilitzar, fa que sigui de les millors alternatives existents als anàlisis químics convencionals per tal d'obtenir i monitoritzar a temps real el procés de fermentació [5].

Tot i això, si es comparen les dues regions infraroges, la propera (Near Infrared o NIR) i la mitjana (Mid-Infrared o MIR), és observat que l'espectre generat pel MIR, proporciona molta més informació de servei que no pas la NIR, ja que aquesta última és molt més complexa per l'alta sensibilitat que presenta [6]. Per aquesta raó, per tal de poder caracteritzar i analitzar els mostos i els vins, s'utilitzarà l'espectrofotometria infraroja mitjana.

Malgrat això, l'aplicació del MIR per a estudiar mostres amb una matriu molt aquosa com el most o el vi, presenta forces problemes amb els resultats ja que en aquesta regió de l'espectre es monitoritzen absorcions excessivament pronunciades dels enllaços O-H relacionats amb l'aigua que saturen el detector. Per tal de minimitzar aquests efectes de l'aigua i poder obtenir senyals òptimes, es va dissenyar la tècnica de la Reflectància Total Atenuada (ATR), que es basa en fer passar la transmissió de la radiació infraroja a través d'un cristall, que normalment és un diamant, que està en contacte amb la mostra. D'aquesta manera es permet mesurar els espectres de les mostres aquoses, reduint les grans senyals que l'aigua podia provocar anteriorment i que solapaven altres bandes produïdes per altres compostos [6]. Aquest fenomen es deu a un canvi ràpid en l'índex de refracció de la mostra a través d'un pic d'absorció infraroja i, també, del coeficient d'absorció molar atribuït al model vibracional [7]. Normalment, l'ATR requereix poca o cap preparació de la mostra.

Per altra banda, la millora de la senyal gràcies a la tècnica de l'ATR se suma amb una altra millora anomenada Transformada de Fourier (FT). Aquesta, enlloc d'utilitzar monocromadors convencionals, utilitza interferòmetres i així aconsegueix millorar molt els problemes relacionats amb l'estabilitat i la mesura dels sorolls que poden aparèixer (sensibilitat) [6]. Aquest interferòmetre rep la radiació a través d'un feix i diferents miralls. La radiació es divideix en dos feixos iguals que es transmeten a un mirall fix i es reflecteixen en un mirall mòbil, respectivament. Aquests dos feixos es recombinen en un feix modulad amb una única freqüència introduint una diferència de camí òptic que fa variar contínuament els valors. Aquesta estructura FT proporciona una bona repetibilitat de dades, la qual cosa comporta mesures sense fluorescència i, alhora, una gran precisió de la longitud d'ona. Finalment, hi ha un detector que converteix la intensitat de la llum en una senyal elèctrica que es representa mitjançant un interferograma. Aquestes freqüències es desmodulen mitjançant una funció matemàtica anomenada Transformada de Fourier, que acaba proporcionant el corresponent espectre òptic (Relació entre intensitat i freqüència) mitjançant un processador de dades [8].

Tractament de dades

El procés bioquímic de la fermentació proporciona molta complexitat de dades i matrius, la qual cosa implica que tota aquesta informació espectral ha de ser tractada amb un conjunt de mètodes matemàtics i estadístics complexos. La branca de la química que s'ocupa d'aquests tipus de tractaments de dades per poder acabar extraient informacions rellevants, és l'anomenada quimiometria [6].

Així doncs, controlar la fermentació amb ATR-FTMIR és molt complex, ja que implica un procés que genera una matriu de dades de tres dimensions. En primer lloc el número de mostres, en segon lloc el número de variables i en tercer lloc el número de punts de temps recollits durant la fermentació alcohòlica. És per això que és totalment necessari aplicar la quimiometria per tal d'extreure la informació que sigui rellevant dels espectres complets. Es tracta de cercar quina és la part de l'espectre que presenta la màxima variabilitat per poder relacionar-ho amb el procés fermentatiu. Abans, però, s'ha de realitzar un pre-tractament de les dades. En aquest cas, s'ha utilitzat la Variant Normal Estàndard (*Standard Normal Variate* o SNV), ja que aquesta permet eliminar les variacions de pendent i corregir els desplaçaments de la línia base causats per l'instrument [8]. Tan bon punt s'ha dut a terme el pre-tractament de les dades, arriba el torn de realitzar els diferents anàlisis per extreure'n informació. En primer lloc s'aplica l'Anàlisi de Components Principals (*Principal Components Analysis* o PCA). Aquesta eina identifica les direccions ortogonals de màxima variància en el conjunt de dades originals i les ordena de manera decreixent. A continuació, es projecta aquest recull de dades en un espai format per un subconjunt dels components de màxima variància, en el qual el primer component significatiu explica el major percentatge de la variància total respecte el segon amb més percentatge [9]. Així doncs, a partir de les màximes diferències espectrals, es poden descriure canvis específics en la composició de la matèria basats en el coneixement previ i les respectives comprovacions pels mètodes d'anàlisi químic clàssics [10]. Per continuar amb el tractament de les dades, també s'aplica l'anomenat Mínims Quadrats Parcial (Partial Least Squares o PLS). Aquesta tècnica aprofita una correlació existent entre les dades espectrals i les concentracions dels components de les mostres. Enlloc de descompondre primer la matriu espectral en un conjunt de vectors propis, la PLS utilitza la informació de la concentració durant el procés fermentatiu, per tal de poder construir models de predicció [6]. Una altra tècnica usada és la PLS d'Anàlisi Discriminants (*Discriminant Analysis of Partial Least Squares* o PLS-DA). Aquesta té el mateix fonament que l'anterior amb la diferència que la matriu X conté els espectres de les mostres i la matriu Y conté una variable fictícia que codifica el tipus de mostres que es volen discriminar mitjançant una representació binària (0 i 1). Amb aquesta tècnica es pretén buscar el nombre

òptim de variables latents que maximitzen la covariància entre els espectres infrarojos i les classes de mostres, la qual cosa implica cercar els punts significatius per poder dur a terme una discriminació. Així doncs, aquest llindar de discriminació es troba entre 0 i 1 [3].

2. OBJECTIUS DEL TREBALL

Després d'haver-se realitzat diferents estudis sobre l'aplicabilitat de la tècnica de l'ATR-FTMIR en processos enològics i d'haver comprovat amb èxit que es tracta d'una tècnica totalment apte per a dur a terme controls fisicoquímics durant el procés fermentatiu de manera molt ràpida, l'objectiu d'aquest treball és poder aprofundir en la detecció ràpida i anticipada de problemes i desviacions en el procés fermentatiu, en aquest cas, per augment de temperatura i per dèficit de nitrogen, controlant el procés de manera que es puguin comparar espectres i dades entre els processos alterats i els que segueixen la cinètica normal.

3. MATERIALS I MÈTODES

Most i llevats

El most que es va fer servir per preparar les fermentacions a petita escala, va ser proporcionat per *Mostos Españoles SA (Ciudad Real, Espanya)* i es va produir durant la campanya de 2019. El most en qüestió va ser desat a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en ampolles d'1,5 L, en les quals s'hi va afegir nitrogen gasós (N_2) per tal d'evitar fermentacions espontànies. Per tal de descongelar el most, es va deixar a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ i, quan aquest ja es trobava en fase líquida va ser diluït amb aigua destil·lada per ajustar la concentració de sucres a uns $200 \pm 10\text{ g/L}$.

La soca comercial de *S. cerevisiae* en format de llevats secs actius que es va utilitzar va ser la "IOC RÉVÉLATION THIOLS" (Lallemand, Australia).

Micro-fermentacions

Amb l'objectiu de disposar d'un número suficient de mostres controlades, es va emular el procés d'elaboració del vi a petita escala. D'aquesta manera, es van establir 3 tipus diferents de micro-fermentacions: les fermentacions control, les fermentacions a les quals se'ls hi va aplicar un augment de temperatura en un moment concret i les fermentacions amb dèficit de nitrogen i sense activadors de fermentació. D'aquesta manera, es van preparar quatre rèpliques per les fermentacions control i tres rèpliques per cadascun dels altres dos casos fermentatius. En total, doncs, es van preparar 10 micro-fermentacions dipositades en diferents matrassos Erlenmeyer de 500 mL de capacitat cadascú.

Aquestes micro-fermentacions es van preparar posant 350 mL del most diluït en cada matràs. Posteriorment es van afegir 0,30 g/L d'ENOVIT (SPINDAL S.A.R.L Gretz Armainvilliers, France) i 0,30 g/L d'ACTIMAX en cada matràs excepte en els tres que havien de tenir dèficit de nitrogen. Aquests dos productes esmentats anteriorment són nutrients rics en nitrogen i activadors de la fermentació, de tal manera que, amb les quantitats afegides, es va obtenir una concentració final de nitrogen assimilable pels llevats d'uns $300 \pm 20\text{ mg/L}$ en 7 de les 10 micro-fermentacions a preparar (les 4 fermentacions control i les 3 fermentacions per a l'augment de temperatura).

A continuació es va dur a terme el procés de rehidratació dels llevats per poder ser inoculats. En cada mostra s'hi van afegir 0,105 g de llevats secs actius, que van ser rehidratats en 2mL durant 30 minuts a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ amb l'objectiu d'acabar obtenint una població final de $3 \cdot 10^6\text{ cel/mL}$.

A partir d'aquí, tots aquests matrassos es van guardar en un fermentador a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ amb l'objectiu de poder mantenir la temperatura controlada durant tot el procés fermentatiu ($20,0 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Tan bon punt es van tenir totes les mostres preparades perquè comencessin les fermentacions, es va començar a realitzar un seguiment de la densitat i del pH, dues vegades al dia, per tal de controlar el progrés del procés. La densitat es va mesurar amb l'ajuda del densímetre electrònic portàtil Densito2Go (Mettler Toledo, EUA) i el pH amb el pHmetre pH 7+DHS equipat amb un elèctrode portàtil 201 T (XS Instruments, Itàlia).

Pel que fa a les tres mostres amb desviació de temperatura, es va esperar a que haguessin passat 48 hores des de l'inici de la fermentació i, havent transcorregut aquest temps, es va procedir a provocar, voluntàriament, un augment de temperatura. Durant 12 hores seguides es va anar augmentant aproximadament 1 °C/hora, arribant així a una temperatura de 34 °C (ja que en algunes hores, augmentava 1 °C i escaig). Aquest augment es va dur a terme submergeint els matrassos Erlenmeyer en un bany d'aigua a temperatura controlada. A més, per poder monitoritzar bé què succeïa, es van realitzar anàlisis de densitat i pH de les mostres a cada hora que passava dins d'aquest període de 12 hores. Quan es va arribar a la hora 12, es van deixar reposar les tres fermentacions a 34 °C durant una hora més i, posteriorment, es van tornar a desar les mostres dins del fermentador a 20 °C.

Anàlisi Infraroig

Abans de realitzar l'anàlisi de cada micro-fermentació, es van dur a terme un seguit de passos amb l'objectiu d'evitar possibles desviacions causades per la presència de microorganismes en el most. En primer lloc, es van agafar 1,5 mL de cada fermentació i es van dipositar en un microtub de plàstic de 2,0 mL de capacitat. Posteriorment es van centrifugar conjuntament totes les preses de cada mostra a 1000 rpm durant 10 minuts. Tan bon punt es va acabar la centrifugació es va recollir el líquid de cada microtub i es va traspasar cap a un microtub nou intentant no agafar gens de pòsit o pellet del fons. Aquest procediment es va dur a terme per a cada anàlisi feta durant els dies que va durar tot el procés fermentatiu. L'anàlisi infraroja de cada rèplica de cada mostra es va realitzar de manera diària i cada 4 hores (exceptuant les nits). Així doncs es realitzaven quatre anàlisis diaris, l'una a les 8 del matí, la següent a les 12 del migdia, la següent a les 4 de la tarda i l'última a les 8 del vespre.

Les anàlisis dels espectres infrarojos mitjans per Transformada de Fourier es van dur a terme mitjançant l'instrument portàtil 4100 ExoScan FTIR (Agilent, California, EUA), el qual a més compta amb una interfície de mostreig ATR esfèrica intercanviable que consisteix en una finestreta de diamant. Els espectres de les mostres es van mesurar en el rang comprès entre 3999 i 649 cm^{-1} amb una resolució de 8 cm^{-1} i duent a terme 32 escombrats/escanejats a temperatura controlada ($63,0 \pm 1,0$ °C). Com que, tant la humitat de l'espai, com el CO_2 de

l'ambient poden causar interferències en les lectures de l'instrument, es van anar mesurant blancs d'aire durant tot el procediment de l'anàlisi.

Finalment, per la realització de la mesura, es col·locava una gota de mostra damunt del cristall i s'obtenien els resultats dels espectres gairebé al mateix moment. Abans d'analitzar cada mostra es realitzava un blanc de l'aire i, posteriorment, s'examinava cada micro-fermentació per triplicat. Prèviament a cada anàlisi, es netejava el vidre amb aigua destil·lada i tovallons de paper per evitar interferències de la mesura anterior.

Recopilació dels espectres i anàlisi multivariant

La recopilació de tots els espectres, el control de l'instrument i la manipulació dels arxius previs al tractament de dades, es van dur a terme amb el software per a ordinador Microlab (Agilent, Califòrnia, EUA) i les dades en qüestió eren guardades com arxius .spc.

Els càlculs per al tractament de les dades es van realitzar utilitzant la mitjana dels espectres dels triplicats de cada mostra, a cada punt de mostreig, fent servir rutines pròpies recollides a Matlab v.8.6 R2015b (Mathworks, MA, USA) i el software PLS Toolbox v.6.2 (Eigenvector Research, Manson, WA, EUA). Després d'un anàlisi previ amb PCA, es van desenvolupar els models de regressió PLS per poder predir paràmetres relacionats amb el procés fermentatiu.

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

Quan parlem del vi, els paràmetres que s'analitzen de manera sistemàtica en bodegues i cellers són la densitat i el pH. És per això, que amb les dades extretes dels controls clàssics s'ha pogut realitzar un seguiment de la cinètica fermentativa, el qual es basa en la relació entre la densitat i el temps (**Figura 1**). La densitat ens aporta informació de la concentració de sucres reductors durant tota la fermentació i, com es pot veure, totes tres han acabat el procés amb èxit ja que han arribat a una concentració de sucres inferior a $0,05 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

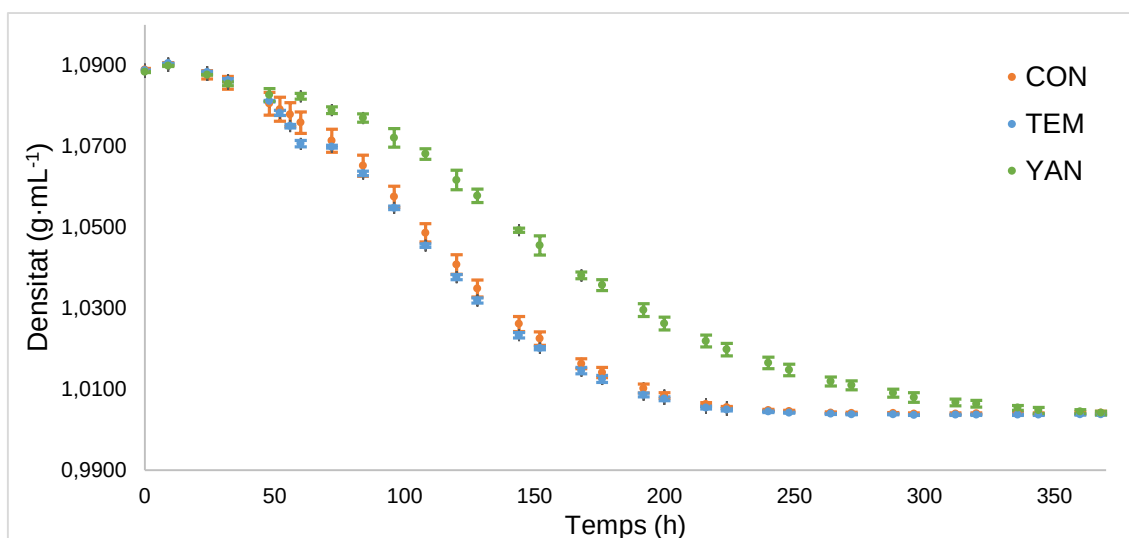


Figura 1: Perfils cinètics de la fermentació mitjançant la densitat on les CON són les fermentacions control, les TEM les fermentacions amb desviació de temperatura i les YAN les fermentacions amb dèficit de nitrogen.

Així doncs, observant la **Figura 1**, les tres classes de fermentació comencen amb una densitat gairebé idèntica ($1,089 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$) ja que totes elles parteixen del mateix most i, per tant, de la mateixa dilució. El fenomen més visible és que la mostra amb dèficit de nitrogen duu a terme la fermentació alcohòlica de manera molt més lenta, ja que el canvi final en la corba s'observa molt més tard que en els altres dos casos. Concretament, aquest canvi apareix a la hora 368 (15 dies i 8 hores) i, en canvi, les altres dues fermentacions les podem considerar acabades molt abans. La fermentació amb desviació de temperatura acaba a les 248 hores (10 dies i 8 hores) i la fermentació control a les 264 hores (11 dies). Això implica una diferència entre la primera respecte les altres dues d'uns 5 dies i escaig. Aquest fet és degut a la manca de nutrients amb la qual es troben els llevats en aquestes micro-fermentacions. Aquest dèficit de nutrients acaba implicant que els llevats no puguin realitzar les seves funcions vitals en condicions òptimes i això es veu reflectit en l'evolució del procés fermentatiu, malgrat acabin arribant al mateix punt les tres. Tot i que es pot constatar una petita variabilitat entre les rèpliques de cada tipus de micro-fermentació, fet que és totalment normal ja que es tracta d'un procés natural, és apreciable com

cada mostra (CON, YAN i TEM) segueix la seva pròpia cinètica fermentativa de manera gairebé idèntica, fet que posa de manifest la confiança en aquestes dades obtingudes.

Per altra banda, a la **Figura 2**, s'hi detalla l'evolució del pH de cada tipus de fermentació en vers el temps. Observant el gràfic, es pot comprovar que la fermentació control i la fermentació amb desviació de temperatura parteixen d'un pH força més alt (4,08 i 4,09 respectivament) que no pas la fermentació amb dèficit de nitrogen, que comença amb un pH de 3,66. Aquest fenomen pot deure's al fet que a aquest últim tipus de mostra, no només no se li ha afegit compostos nitrogenats, sinó que tampoc se li ha subministrat cap tipus d'activador de la fermentació. Aquests complements nitrogenats consten d'una gran concentració d'amoni, el qual es tracta d'una base forta, fet que explica que els dos primers tipus de fermentació parteixin d'un pH més elevat. A més, també s'hi pot veure com els dos primers tipus de fermentació segueixen una evolució gairebé calcada, finalitzant el procés al mateix pH de 3,67 i, en canvi, la tercera fermentació es manté en valors inferiors durant tot el procés, finalitzant a un valor de pH de 3,52. En tots tres casos, però, es pot observar com el pH disminueix considerablement respecte el pH inicial. Això passa perquè existeixen diferents rutes metabòliques secundàries dels llevats, com ara la fermentació gliceropirúvica, que generen una sèrie d'àcids, com poden ser l'àcid pirúvic, l'àcid succínic o l'àcid acètic, que fan que s'acidifiqui encara més el medi, donant lloc a pH més baixos [1].

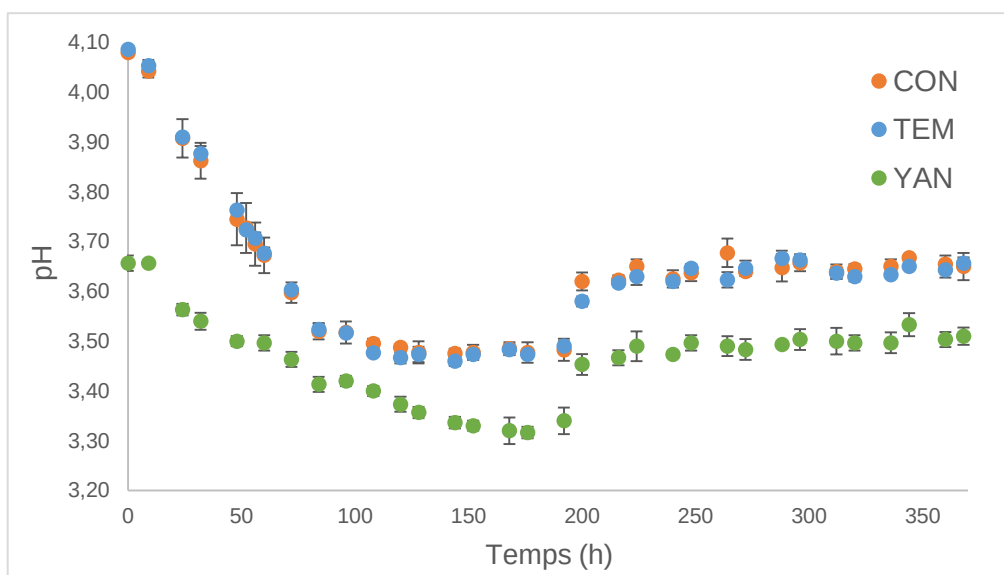


Figura 2: Perfils cinètics de la fermentació mitjançant el pH on les CON són les fermentacions control, les TEM les fermentacions amb desviació de temperatura i les YAN les fermentacions amb dèficit de nitrogen.

L'ús de l'ATR-FTMIR pel control de les fermentacions és molt complex ja que implica un procés evolutiu en el temps que genera una matriu de dades de tres dimensions (Cub de la **Figura 3**). Aquestes dimensions les constitueixen les diferents mostres o rèpliques ($I = 10$), les longituds

d'ona de l'espectre IR ($J = 3150$) i el número de punts de temps recollits durant el procés fermentatiu ($K = 70$). Així doncs, per tal de poder realitzar el tractament d'aquesta multitud de dades recollides i poder-les visualitzar en dues dimensions, cal realitzar un desdoblament de la matriu. En aquest cas, s'ha realitzat un desdoblament en el temps, de manera que cada rèplica té el seu espectre ordenat en els diferents punts de temps (com es mostra a la segona part de la **Figura 3**). Finalment tots aquests espectres es compacten i s'ajunten de tal manera que es pugui obtenir un gràfic en dues dimensions en el qual s'hi mostrin els espectres de totes les rèpliques i la variació d'aquests espectres durant el procés fermentatiu, tal com reflecteix la **Figura 4**. Per altra banda, aquest fet posa en constància la immensa quantitat de dades que es generen utilitzant l'ATR-FTMIR per controlar un a fermentació alcohòlica d'un vi.

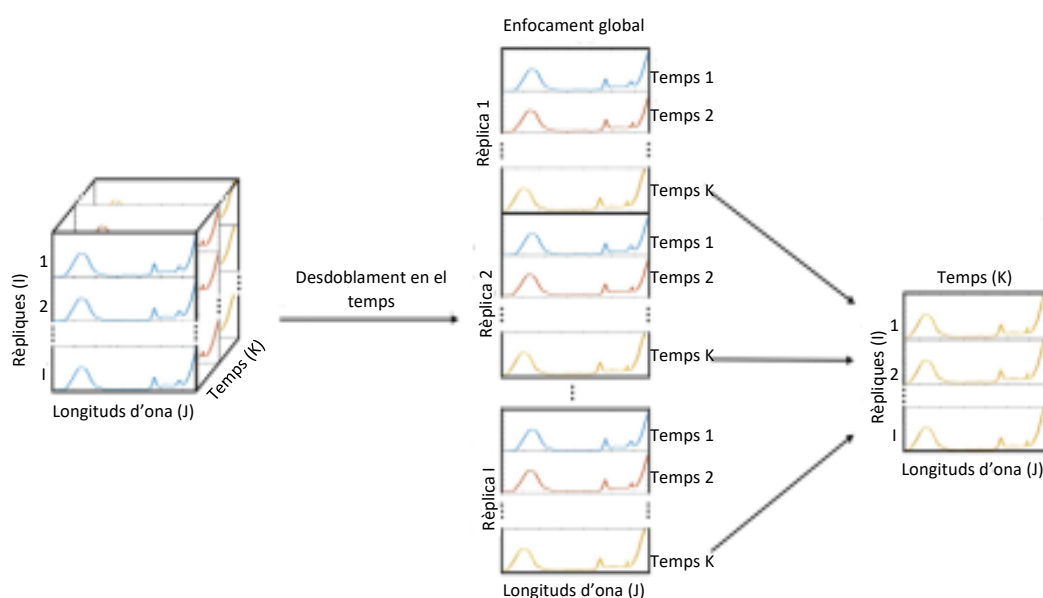


Figura 3: Esquema de la disposició de les dades per cadascun dels enfocaments aplicats a l'estructura de tres vies.

Els diferents pics que es presenten en la **Figura 4**, mostren la vibració de diferents enllaços de la multitud de molècules que es troben en el most i el vi. L'inconvenient és que aquest medi és una mescla complexa que conté moltes molècules i compostos molt similars amb els mateixos grups funcionals, la qual cosa fa que sigui impossible poder assignar un pic a un compost en concret. Malgrat això, en el most i el vi hi trobem una sèrie de components principals, com l'aigua, l'etanol, els àcids orgànics i els sucres (quan encara no ha fermentat) que fan que sigui raonable que es puguin atribuir els pics més grans a les vibracions dels enllaços químics d'aquests components o molècules.

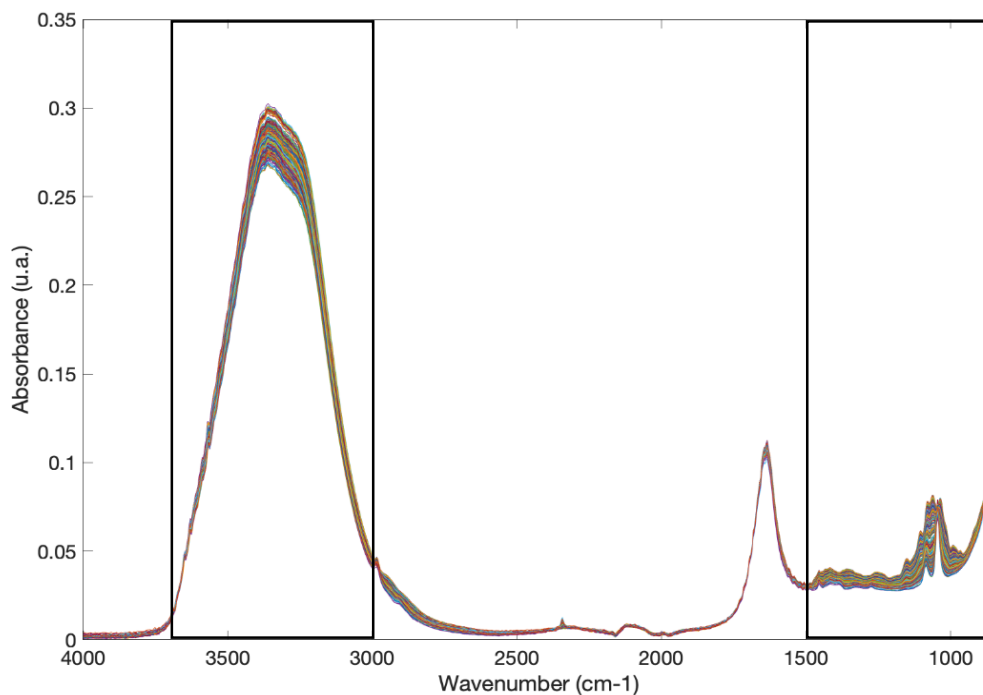


Figura 4: Evolució dels espectres MIR de totes les mostres durant tot el procés fermentatiu. Entre les línies hi ha marcades les àrees que mostren més variabilitat durant la el procés.

Les dues regions que presenten més variació són les que es troben entre 950 i 1500 cm^{-1} i entre 3000 i 3700 cm^{-1} . Tal com s'explica a Cavaglia et al. (2020) [3], la primera regió esmentada correspon a les absorptions de les vibracions dels enllaços H-C-H, C-C-H, H-C-O, C-C, C-O i C-H i la segona regió correspon als enllaços O-H, la qual cosa explica la grandària d'aquest pic, ja que aquest tipus d'enllaç es troba bàsicament en l'aigua i l'etanol. L'aigua no canvia durant la fermentació alcohòlica, per tant, la variació que es presenta en la **Figura 4** és deguda a l'augment de la concentració de l'etanol a causa de la fermentació alcohòlica. Pel que fa a la regió entre 950 i 1500 cm^{-1} , aquesta la podem dividir en dues sub-regions. La primera, entre 950 i 1200 cm^{-1} correspon als enllaços C-C i C-O i la segona, entre 1200 i 1500 cm^{-1} correspon als enllaços C-H, H-C-H, C-C-H i H-C-O. Així doncs, es pot determinar que aquesta zona ens proporciona informació principalment dels sucres (glucosa i fructosa) i dels àcids orgànics [11]. Per tant, la variació que presenta aquesta zona, és deguda a la transformació bioquímica dels sucres pel procés fermentatiu que es duu a terme.

Un cop obtingudes les dades del FT-MIR s'ha realitzat un anàlisi preliminar utilitzant el PCA. D'aquesta manera es pot comprovar la repetibilitat de les mesures i, així, detectar els valors atípics, que han sigut discriminats degut a la poca concordança amb la resta de dades. Tan bon punt s'han eliminat aquests resultats no concordants, s'ha procedit a descriure el Component

Principal 1 (PC1), el qual conté un 96,18% de la variància total, en vers el temps (**Figura 5**). És important fer èmfasi en l'elevat percentatge de la variància total que presenta la PC1 del present estudi respecte el que presenta l'estudi Cavaglia et al. (2019) [11], qual tan sols compta amb un 65,44 %. Aquest fet pot deure's a que en l'estudi esmentat no es va dur a terme un control de la temperatura de l'equip FTIR, mentre que en l'estudi actual es va controlar en tot moment com variable la temperatura pròpia de l'equip. La temperatura de l'equip pot ser un factor determinant a l'hora de registrar els resultats, ja que pot produir biaixos importants en la vibració dels enllaços moleculars, donant lloc resultats no desitjats. Com que a l'estudi esmentat no es va controlar la temperatura, la distribució dels punts en l'espai no va ser tan bona com en el present estudi i per això el PC1 compta amb un percentatge inferior.

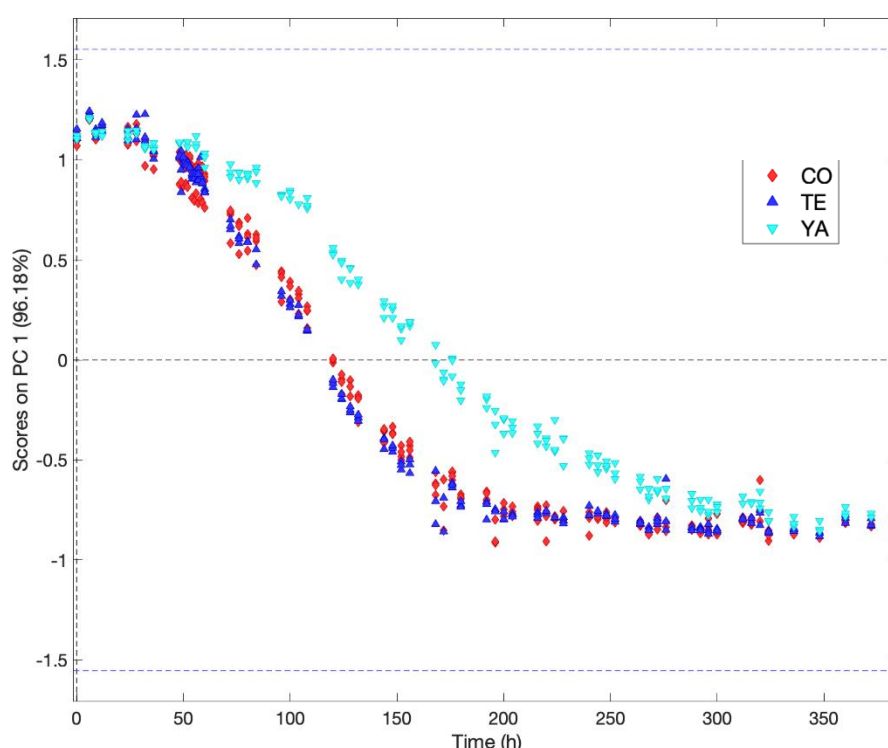


Figura 5: Gràfic de puntuació obtingut a partir dels espectres MIR en la zona definida pel PC1 en vers el temps on CO són les fermentacions control, TE les fermentacions amb desviació de temperatura i YA les fermentacions amb dèficit de nitrogen.

Tal com es reflecteix a la **Figura 5**, les dades obtingudes de la PC1 mostren una tendència molt similar a l'evolució de la densitat en vers el temps del procés fermentatiu. Aquest fet posa de manifest que aquest PC1 explica la fermentació alcohòlica bàsicament com la disminució de concentració de sucres en el medi. A més, com a la **Figura 1**, es pot comprovar que la fermentació amb dèficit de nitrogen segueix un procés fermentatiu més lent que les altres dues. Per altra banda també s'observa que la fermentació a la qual se li va aplicar un augment de temperatura es desenvolupa una mica més ràpida que la fermentació control. El fet que aquest PC relacioni la màxima variabilitat del procés fermentatiu amb l'evolució de la concentració de

sucre, s'explica amb la **Figura 6**, on es mostra la importància de la regió compresa entre 1500 i 950 cm^{-1} , la qual està relacionada amb els principals enllaços de l'etanol i els sucres. La **Figura 6** explica les regions en les quals es detecta més variabilitat tant per la PC1 com per la PC2, és a dir, les regions que aporten més informació sobre el PC en qüestió.

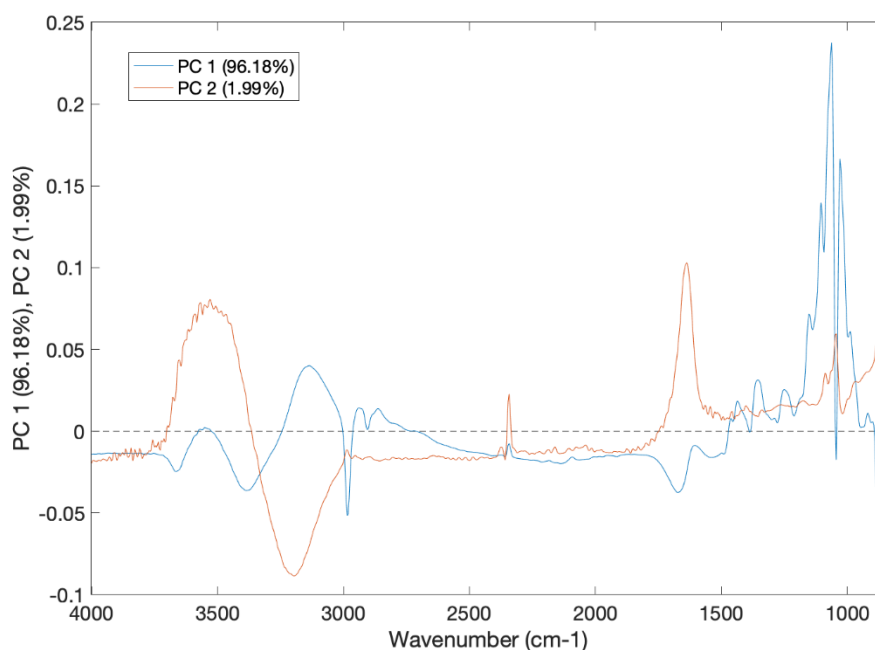


Figura 6: Expressió de la màxima variabilitat de la PC1 i la PC2.

Així doncs, també s'observa com la PC2 tan sols compta amb l'1,99% de la informació de tot l'espectre que, comparat amb el percentatge que representa el PC1 (96,18%) és pràcticament negligible. Això pot ser degut a que aquesta variabilitat expressada en la PC2 pot ser causada per petites variacions provocades pels equips de mesura o bé per la pròpia variabilitat del procés fermentatiu en sí afectant diferents compostos del medi ja que mai existiran dues fermentacions control idèntiques donat que es tracta de processos naturals que impliquen una certa variabilitat ja des de l'inici.

Regressió per Mínims Quadrats Parcial (Partial Least Squares Regression o PLS)

Amb l'objectiu d'extreure la màxima informació útil de les dades, s'aplica un anàlisi multivariant. En aquest cas s'han construït dos models de calibratge multivariants diferents entre els espectres FT-MIR i els valors de referència de densitat i pH. Per poder elaborar aquests dos models s'ha utilitzat el mètode PLS, el qual requereix d'un pre-processament espectral que s'ha avaluat en funció del menor error quadràtic mitjà de validació creuada (*Root Mean Square of Cross Validation* o RMSECV) dels models, sent optimitzats per a cada paràmetre. El RMSECV és

un valor absolut que té les mateixes unitats que els valors predits, de forma semblant a la desviació estàndard univariant. Per calcular aquest error esmentat, les mostres han sigut dividides en quinze parts aleatòries, i el model s'ha construït eliminant-ne una i utilitzant les 14 restants. A continuació, el model obtingut amb aquestes 14 s'ha utilitzat per predir les mostres restants. Aquest procediment s'ha repetit fins a 15 vegades, és a dir, fins a excloure tots els grups. Finalment, s'ha repetit el mateix procediment amb deu noves divisions de les mostres per aconseguir obtenir un model encara millor, i la mitjana entre els deu models s'ha utilitzat com a model final. El número òptim variables latents (Latent Variables o LV) ha sigut el que ha proporcionat una menor RMSECV. Les variables latents utilitzen la informació dels paràmetres fisicoquímics de les mostres analitzades (en aquest cas, densitat i pH). D'aquesta manera, es poden construir variables ortogonals que expliquin millor la variació dels espectres i que, alhora, es correlacionen amb una propietat mesurada. Com s'ha comprovat anteriorment, amb l'anàlisi de components principals s'ha pogut concloure que es pot explicar la fermentació, bàsicament, com la disminució de la densitat. És per això que a l'hora de correlacionar la densitat predita amb la densitat mesurada s'obté un model molt robust (**Figura 7a**) on CO són les fermentacions control, TE són les fermentacions amb desviació de temperatura i YA són les fermentacions amb dèficit de nitrogen. Aquest model es pot explicar amb una sola variable latent que conté el 99,45 % de la informació (**Figura 7b**). El fet que el percentatge de la variable latent no coincideixi amb el percentatge del PC1 es deu a que la tècnica per trobar el primer valor és una tècnica supervisada i, en canvi, per trobar el valor del PC1 s'usa una tècnica no-supervisada. Una tècnica supervisada és aquella que correlaciona la variabilitat dels espectres amb informació prèvia que, en aquest cas, serien els paràmetres fisicoquímics ja determinats, en canvi, una tècnica no-supervisada és una tècnica que consisteix en reduir la dimensionalitat de tot el conjunt de dades de l'espectre per tal de poder explicar la major part de la informació continguda en les dades, sense utilitzar cap mesura determinada de referència. Així doncs, els rangs que proporcionen la màxima informació de la variable latent són entre 967 i 1175 cm^{-1} i entre 1483 i 1771 cm^{-1} , tal com es determina a l'article Cavaglia et al. (2020) [3]. Com s'ha explicat anteriorment, el primer rang citat (967 – 1175 cm^{-1}), que és en el qual s'hi pot observar més variància, proporciona informació sobre la vibració dels enllaços C-C, C-O, de tal manera que es poden relacionar amb l'evolució dels sucres en el medi i l'augment de la concentració d'etanol. Per aquest motiu, el model de l'anàlisi PLS pel paràmetre de la densitat és tan robust, amb un RMSECV de tan sols 0,0015 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ i una correlació entre les dades predites i les determinades molt propera a 1 (R^2 (CV) = 0,998). Així doncs, amb aquestes dades es pot concloure que el FTIR portàtil utilitzat

permet monitoritzar, de manera molt segura, la fermentació alcohòlica amb la possibilitat de saber en quin moment del procés es troba.

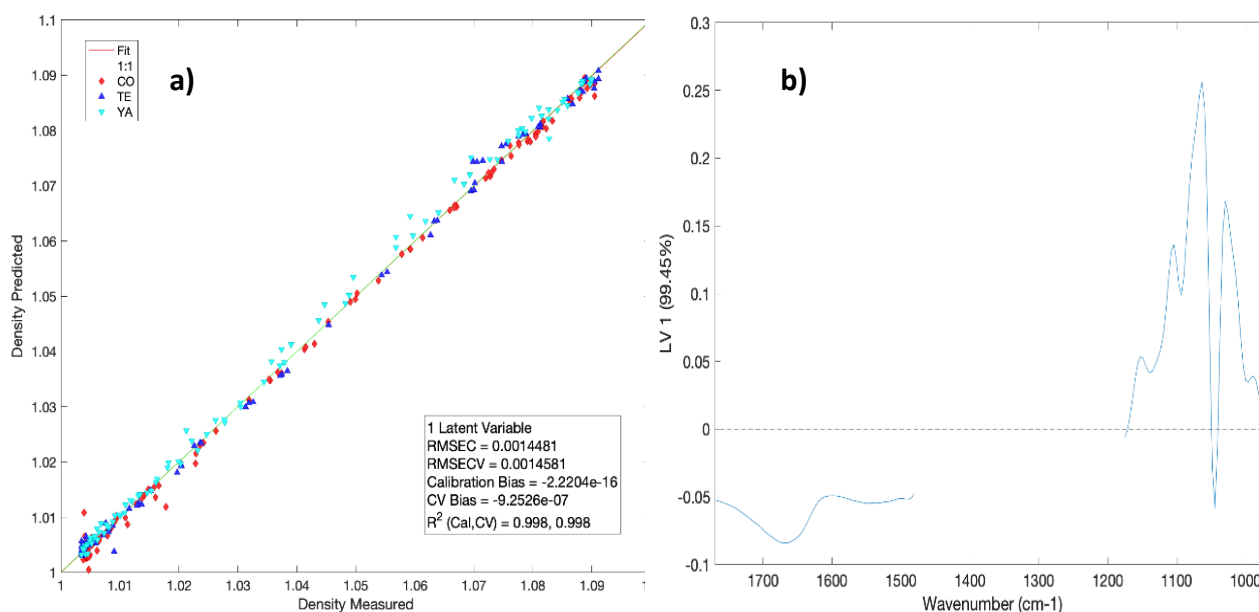


Figura 7: Gràfic de dispersió de les mesures de referència en front a les predites per la densitat (a) i expressió de la màxima variabilitat de la LV1 (b).

El segon model PLS que s'ha construït és el que correspon al paràmetre pH. Per elaborar aquest model, s'han seguit els mateixos passos de validació de les dades que per construir el model de la densitat. El número de LV òptim en funció del menor RMSEC, en aquest cas ha sigut de 6 variables latents. Per poder extreure informació de l'espectre sobre el paràmetre en qüestió, cal utilitzar totes les regions del rang espectromagnètic, tal com es determina a l'estudi Cavaglia et al. (2020) [3]. El pH és un paràmetre que varia en funció de la concentració de protons (H^+) en el medi. Així doncs, en el medi most/vi, existeixen multitud de molècules i compostos que fan que aquest paràmetre variï, com ara els àcids orgànics o els polifenols, però també les pròpies molècules d'aigua o d'etanol. És per aquest motiu que per poder donar una explicació sobre la variació del pH en el medi, el model ha necessitat utilitzar 6 variables latents que es manifesten al llarg de tot l'espectre electromagnètic, ja que s'ha hagut de correlacionar la variació dels valors de pH obtinguts experimentalment amb la vibració de molts enllaços que constitueixen moltes molècules diferents. Tot i això, com es pot observar a la **Figura 8b**), la LV1, que conté el 95,12 % de la informació, concentra gairebé tota la seva variabilitat entre 1100 i 1300 cm^{-1} . Com s'ha esmentat anteriorment, aquest rang conté la informació dels enllaços C-C, C-O, C-H, H-C-H, C-C-H i H-C-O, els quals els trobem molt presents en les molècules dels àcids orgànics. Així doncs, es pot deduir que la gran majoria d'informació que es fa servir per explicar la variació de pH, està estretament relacionada amb la variació dels àcids orgànics del medi. Pel que fa al model

de predicció obtingut (**Figura 8a**)), es mostren uns resultats no tan bons comparats amb els obtinguts per predir la densitat. En aquest cas, l'RMSECV és de 0,06 unitats de pH i la correlació entre els valors obtinguts per la mesura i els valors predits són de R^2 (CV) = 0,867. Aquest model dóna uns resultats un pèl pitjors per la complexitat que representa poder explicar la variació del pH en el medi, on s'hi interpel·len molts tipus de molècules diferents, a diferència de la densitat, que tan sols comptant amb la disminució de la concentració de sucres i l'augment de l'etanol en el medi ja es pot explicar com evoluciona aquest paràmetre. Malgrat això, cal remarcar que el model PLS obtingut per poder predir el pH és força robust i ens permetria igualment poder monitoritzar i predir de manera òptima els valors d'aquest paràmetre durant l'evolució d'un procés fermentatiu. Per millorar aquest model es podria augmentar el número de mesures pH preses durant el procés fermentatiu, per tal de millorar la correlació entre valors.

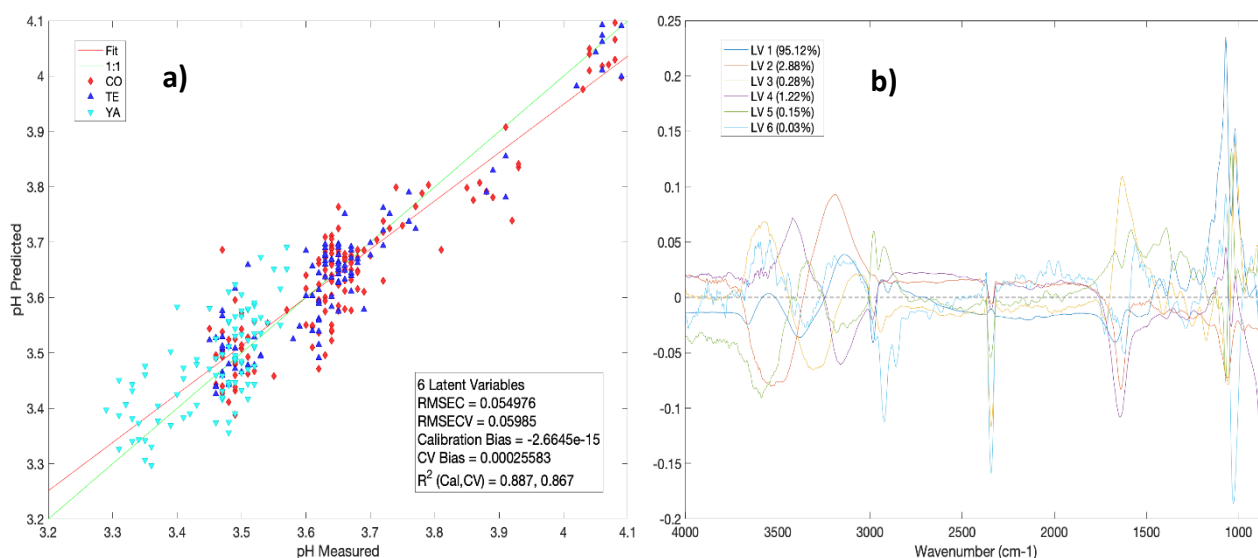


Figura 8: Gràfic de dispersió de les mesures de referència en front a les predites pel pH (a) i expressió de la màxima variabilitat de les 6 LV (b).

Observant la **Figura 8a**), es pot constatar una distribució dels punts molt poc uniforme, veient com en el centre del gràfic (entre els valors de 3,6 i 3,8 del pH mesurat) hi ha una gran acumulació de punts a diferència dels extrems. Aquest fet s'explica observant el gràfic de la cinètica del pH (**Figura 2**), on es pot veure que per la CON i la TEM, el pH baixa molt ràpidament dels valors més alts (al voltant de 4 unitats de pH) i s'estanca durant molt de temps al voltant de 3,6 unitats de pH, sense pràcticament variar. A més, també s'observa que l'única fermentació que baixa sota valors inferiors a 3,4 i s'acaba mantenint al voltant d'aquest valor esmentat és la YAN. Això pot raonar perquè a la **Figura 8a**) hi ha tan poca densitat de punts en els valors més baixos i que els pocs que hi ha, solament corresponguin a les YA. Per altra banda, passa el mateix

pels valors de pH més alts, on només hi apareixen les CO i les TE. Finalment, també es pot explicar la gran densitat de punts al centre del gràfic, ja que és on coincideixen, en algun moment o altre, les tres fermentacions.

Finalment, s'ha realitzat una PLS-DA amb l'objectiu de determinar si es poden discriminar i classificar, a nivell estadístic, les fermentacions control i les fermentacions amb desviacions. En el vector Y, els zeros s'atribueixen a les mostres de les fermentacions amb desviacions i els uns a les mostres de les fermentacions control, tal com es pot observar a les **Figures 9 i 10**.

La **figura 9** mostra la classificació entre fermentacions normals i deficientes de nitrogen. En aquest cas, s'han hagut de construir dos models PLS-DA per dos temps diferents del procés fermentatiu. En primer lloc, a l'hora 60 en la qual, com es pot veure en la **Figura 9a)**, les dues classes de fermentacions encara no estan ben separades ja que presenten solapaments entre elles donant lloc a una impossible discriminació entre els dos tipus de processos. La justificació d'aquest fet és fàcil de veure si s'observen les **Figures 1 i 4**, on ambdues mostren l'evolució de les tres classes de fermentacions en vers el temps. En aquests gràfics es constata que a l'hora 60 des de l'inici del procés fermentatiu, els tres tipus de fermentació encara segueixen una dinàmica molt similar ja que els diferents punts es mostren força solapats, la qual cosa dóna resposta a la incapacitat de la tècnica per poder discriminar entre fermentació control i fermentació amb dèficit de nitrogen.

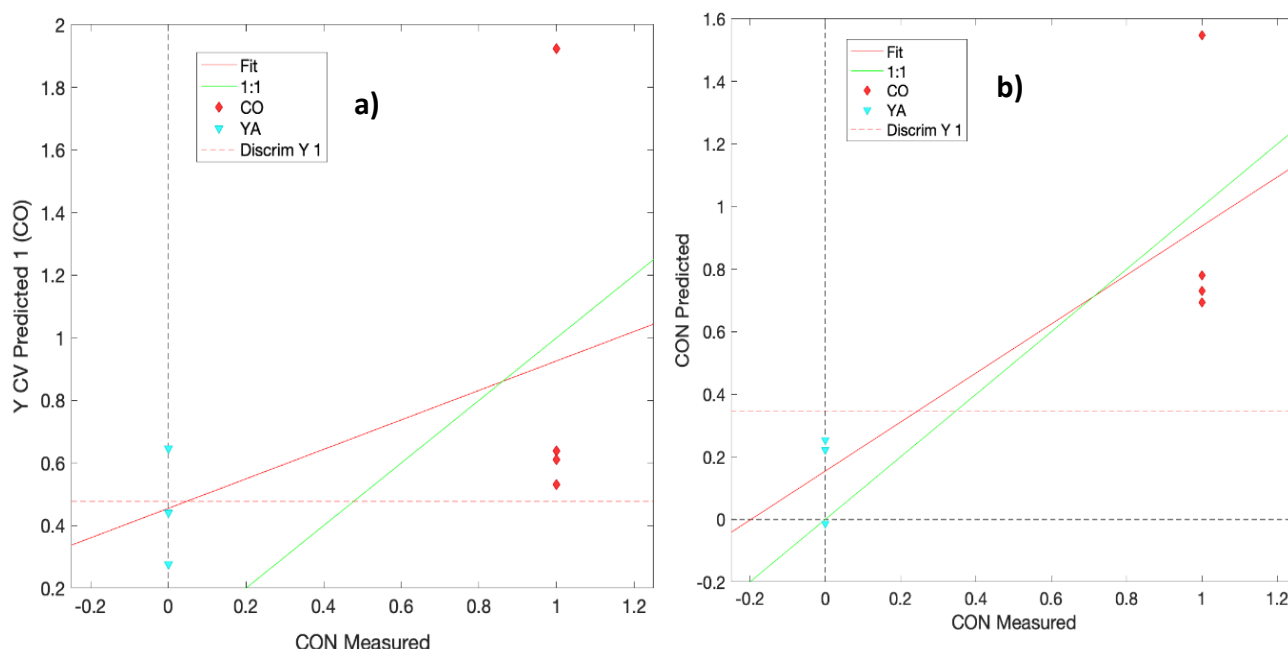


Figura 9: Model PLS-DA per les mostres control (CO) i de deficiència de nitrogen (YA) a l'hora 60 **(a)** i a l'hora 72 **(b)**.

Així doncs, per poder comprovar si és possible la classificació entre mostres, s'ha tornat a aplicar la mateixa tècnica a l'hora 72 (**Figura 9b**). Si es tornen a guaitar les figures 1 i 4, es pot veure com a l'hora 72 ja comencen a separar-se els punts de la fermentació amb dèficit de nitrogen respecte les altres dues. D'aquesta manera, el gràfic de la **Figura 9b**), el qual correspon a la PLS-DA aplicada a l'hora 72, presenta ben classificades les dues classes de fermentacions sense mostrar cap solapament entre elles. Aquests resultats són molt encoratjadors ja que tornen a demostrar la possibilitat de distingir diferents tipus de fermentacions tal i com també s'havia demostrat a l' Cavaglia et al. (2019) [11]. Cal remarcar que, a l'estudi esmentat, es va aconseguir classificar les mostres control i les mostres amb dèficit de nitrogen a l'hora 49, és a dir, de forma més prematura. Aquest fenomen pot ser explicat per diferents motius. En primer lloc, s'hi troba la diferència de mostres preparades entre els dos estudis. En l'article anomenat anteriorment es van preparar 20 controls i 3 YAN, mentre que en el treball actual s'han preparat 4 controls i 3 YAN, la qual cosa, podria haver permès trobar diferències entre les unes i les altres amb antelació degut a que hi ha més informació sobre el comportament de les fermentacions control. Per altra banda, també pot deure's a la soca de llevats utilitzada (diferents entre l'estudi que s'esmenta i l'estudi present). Pot donar-se el fet que la soca de llevats que s'ha utilitzat en aquest estudi té una mica més de tolerància al dèficit de nitrogen que no pas la soca de llevats utilitzada en l'estudi Cavaglia et al. (2019) [11].

Per altra banda, la **Figura 10** mostra la relació entre les fermentacions control i les fermentacions amb augment de temperatura. En aquest cas, la PLS-DA tan sols s'ha aplicat a l'hora 60 ja que és just el moment posterior després d'haver provocat l'escalfament progressiu de les mostres. El gràfic ens mostra la total incapacitat de la tècnica per poder discriminar i classificar les dues classes de fermentacions, ja que ambdues es solapen al voltant del valor $Y = 1$. Si es torna altre cop a les figures on es mostra la cinètica fermentativa, es pot comprovar com, tant les fermentacions control com les fermentacions amb augment de temperatura, segueixen una tendència quasi idèntica en tot moment. Aquest succés pot explicar el motiu pel qual ha sigut impossible poder discriminar entre aquestes dues classes de fermentacions utilitzant la tècnica PLS-DA. L'explicació d'aquest fenomen pot deure's a dos motius. En primer lloc, podem trobar-nos amb una soca de llevats que sigui prou resistent als augments de temperatura. Per altra banda, pot ser degut a que aquesta desviació de la temperatura, arriba a un valor màxim en el qual, tal com s'explica a la introducció, els llevats encara tenen capacitat per sobreviure de manera totalment òptima, ja que tan sols s'arriba fins a 34 °C. A més s'hi pot sumar el fet que aquest augment s'ha dut a terme amb massa lentitud, donant espai a que els llevats s'aclimatin de manera correcta a cada punt d'augment de la temperatura. El resultat d'aquest estudi podria

millorar aplicant una desviació de la temperatura de forma més brusca i arribant a valors una mica més elevats (és a dir, amb menys temps caldria arribar per sobre dels 34 °C).

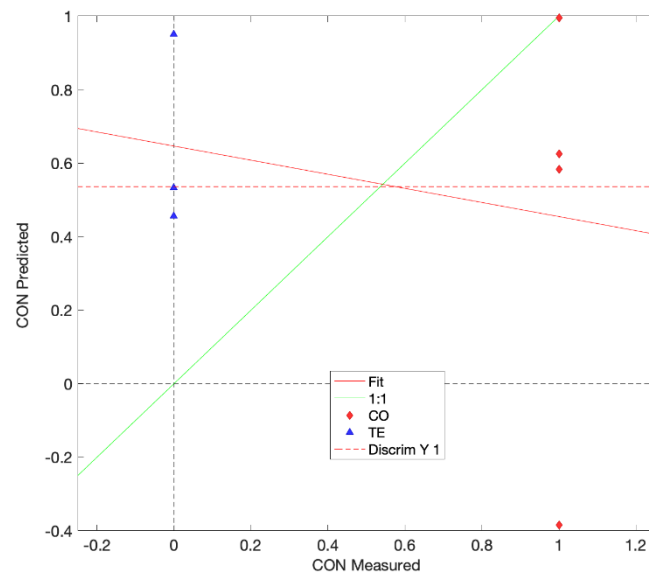


Figura 10: Model PLS-DA per les mostres control (CO) i d'augment de temperatura (TE).

5. CONCLUSIONS

Aquest estudi es basa en l'ús d'un dispositiu portàtil ATR-FTMIR portàtil juntament amb l'anàlisi multivariant per tal d'usar-lo com una nova estratègia molt més ràpida, econòmica i fàcil de fer servir per monitoritzar diferents paràmetres del procés fermentatiu i poder detectar possibles desviacions. Així doncs, les conclusions que se'n poden extreure són:

- Es tracta d'un aparell amb molt de potencial per disminuir els anàlisis de rutina i poder realitzar seguiments de la fermentació de manera molt acurada ja que, havent utilitzat una soca de llevats diferent respecte als altres estudis bibliogràfics i havent utilitzat menys mostres, s'han obtingut resultats igual d'esperançadors pel que fa a la monitorització i la predicció de la densitat i del pH i la capacitat de classificar entre una fermentació control i una fermentació amb una desviació causada per deficiència de nitrogen.
- El model PLS-DA no és capaç de poder distingir entre una fermentació control i una fermentació amb augment de temperatura de la manera com s'ha provocat aquesta desviació en aquest estudi. Caldria canviar el procediment d'aplicació d'aquesta desviació per poder obtenir variacions detectables per l'aparell, com ara un augment més sobtat i més elevat de la temperatura.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Hidalgo Togores, J. (2011). *Tratado de Enología Tomo I*. (2a ed.). Ediciones Mundi-Prensa.
2. Hernández, G., León, R., Urtubia A. (2016). Detection of abnormal processes of wine fermentation by support vector machines. *Cluster Comput*, 19, 1219-1225.
3. Cavaglia, J., Schorn-García, D., Giussani, B., Ferré, J., Busto, O., Aceña, L., Mestres, M., Boqué, R. (2020). ATR-MIR spectroscopy and multivariate analysis in alcoholic fermentation monitoring and lactic acid bacteria spoilage detection. *Food Control*, 109, 106947.
4. Guidance for Industry PAT – A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance, FDA Off. Doc., 2004, p. 16.
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070305.pdf>.
5. Buratti, S., Ballabio, D., Giovanelli, G., Zuluanga Dominguez, C.M., Moles, A., Benedetti, S., Sinelli, N. (2011). Monitoring of alcoholic fermentation using near infrared and mid infrared spectroscopies combined with electronic nose and electronic tongue. *Analytica Chimica Acta*, 697, 67-74.
6. Roychoudhury P., Harvey, L.M., McNeil, B. (2006). The potential of mid infrared spectroscopy (MIRS) for real time bioprocess monitoring. *Analytica Chimica Acta*, 571, 159-166.
7. Shah, N., Cynkar, W., Smith, P., Cozzolino, D. (2010). Use of Attenuated Total Reflectance Midinfrared for Rapid and Real-Time Analysis of Compositional Parameters in Commercial White Grape Juice. *J. Agric. Food Chem*, 58, 3279-3283.

8. Borràs Iglesias, E. (2016). *Instrumental and Chemometric Methodologies to asses Sensory Quality of Mediterranean Food* (Tesi doctoral). Universitat Rovira i Virgili Departament de Química Analítica i Química Orgànica.
9. Di Egidio, V., Sinelli, N., Giovanelli, G., Moles, A., Casiraghi, E. (2010). NIR and MIR spectroscopy as rapid methods to monitor red wine fermentation. *Eur Food Res Technol*, 230, 947-955.
10. Munck, L., Moller, B. (2005). Principal Component Analysis of Near Infrared Spectra as a Tool of Endosperm Mutant Characterisation and in Barley Breeding for Quality. *Czech J. Genet. Plant Breed.*, 41 (3), 89-95.
11. Cavaglia, J., Giussani, B., Mestres, M., Puxeu, M., Busto, O., Ferré, J., Boqué, R. (2019). Early detection of undesirable deviations in must fermentation using a portable FTIR-ATR instrument and multivariate analysis. *Journal of Chemometrics*, 33, e3162.