

M.Pe. 52158



8357

UNIVERSITE PARIS VAL DE MARNE PARIS XII.  
Avenue du Général De Gaulle 94010 CRETEIL.

INSTITUT D'ELEVAGE ET DE MEDECINE VETERINAIRE.  
10 rue Pierre Curie 94700 MAISONS-ALFORT.

Diplôme d'Etudes Supérieures Spécialisées de  
Productions Agropastorales et Technologie Agro-alimentaire  
en Régions Chaudes.

RAPPORT DE STAGE.

Contribution à l'étude organoleptique des Rhums.

par Gilles BAZIR

Octobre 1983

Réalisé à la station de Biotechnologie  
des fruits et des légumes du  
C.R.A.A.G.  
Mr PARFAIT A. Directeur.

Le présent rapport est le compte rendu d'un stage effectué au sein de la station de Biotechnologie des fruits et des légumes du Centre de Recherches Agronomiques des Antilles et de la Guyane (C.R.A.A.G.), dépendant de l'Institut National de la Recherche Agronomique (I.N.R.A.). Ce stage représente la partie pratique du D.E.S.S. de productions agropastorales et technologies agro-alimentaires en régions chaudes de l'Université Paris XII. Sa durée a été de 4 mois.

Je tiens à remercier toute l'équipe de la station pour l'aide qu'elle a pu m'apporter, et la gentillesse avec laquelle elle l'a fait.

## PLAN

Présentation de la station

Chapitre I : Utilisation de microorganismes en industrie.

I) Généralités

II) Critères de sélection de levures pour la production d'alcools

Chapitre II : Fabrication du rhum

I) Botanique et agriculture de la canne à sucre

1) Anatomie

2) Sélection variétale

3) Prédateurs et maladies

4) Techniques culturales

II) Technologie de fabrication du rhum

1) Préparation du moût

a) Mélasse

b) Jus de canne

c) Sirop

2) Fermentation

3) Distillation

III) Conclusion

Chapitre III : Caractérisation des levures de rhumerie en Guadeloupe

I) Flocculation

II) Tolérance à l'éthanol

III) Aptitude à la production d'éthanol

IV) Production de composés de saveurs

1) Composés phénoliques

2) Acides gras volatils

3) Esters

4) Alcools supérieurs

4-1) Influence de la composition du milieu

a) Complémentation azotée

b) Concentration en sucre

4-2) Influence de la conduite de la fermentation

a) Température

b) Vitesse de fermentation

c) pH

4-3) Influence du taux d'ensemencement

4-4) Influence du type de levure

5) Autres composés de flaveur

V) Stabilité et viabilité des souches de levures

1) Métabolisme du tréhalose

2) Métabolisme du glycogène

#### Chapitre IV : Expérimentation

I) Dosage des alcools supérieurs dans les moûts fermentés

II) Productions de levure à teneurs en sucres de réserves différentes

1) Dosage du tréhalose intracellulaire et du glycogène intracellulaire

2) Essai de réalisation de levures à différentes teneurs en sucres de réserves

III) Problèmes rencontrés

IV) Conclusion générale

Annexe 1

Annexe 2

Références bibliographiques

Avertissement : les numéros entre parenthèses renvoient aux références bibliographiques en fin d'ouvrage.

## I Présentation de la station

Cette station des Antilles fait partie du Département de Biotechnologie des fruits et des légumes qui dépend lui-même de la Direction des Sciences Agro-alimentaires de l'I.N.R.A.. Cette Direction comprend aussi:

- Département de Sciences des aliments.
- Département de Biotechnologie des Glucides et des Protéines.
- Département de Technologie des produits Animaux.

Le directeur actuel de la station est Mr PARFAIT A..

La recherche dans la station comporte actuellement deux grands programmes:

- Programme Méthanisation des déchets agricoles et agro-alimentaires.
- Programme Rhum comportant deux opérations principales:
  - Amélioration de la qualité des divers types de rhums.
  - Optimisation des procédés de fabrication du rhum.

L'amélioration de la qualité des divers types de rhums passe par l'inventaire de l'ensemble des constituants du rhum, l'étude du métabolisme de ces constituants, et enfin la corrélation éventuelle entre l'analyse organoleptique et l'analyse physico-chimique des constituants du rhum. La maîtrise de ces différents paramètres devrait permettre de mieux connaître les souches de levures, en vue d'améliorer la qualité du produit fini.

En parallèle à cette action sur les agents de fermentations, il convient de maîtriser la technologie de tous les ateliers de la fabrication afin d'obtenir de façon reproductible un produit de haute qualité. De plus, une bonne maîtrise des process de fabrication permettra d'adapter le matériel à l'évolution technologique et peut-être d'éviter des crises graves, comme celle que traverse actuellement la profession sucre-rhum aux Antilles Françaises.

Mon travail personnel touche à ces deux axes. Une première partie consiste à mettre au point un protocole expérimental pour le dosage des alcools supérieurs dans les mouts fermentés. Ceci permettra de faire le bilan d'une fermentation, mais aussi de définir l'effet d'une colonne à distiller sur la teneur du rhum en alcools supérieurs. La deuxième partie concerne la production de levures ayant des teneurs en sucres de réserves différents, ceci dans le but d'observer l'effet de ces constituants sur la fermentations en général, et la production d'alcools supérieurs en particulier.

Le but de ces études est à terme la mise en évidence de critères définissant une levure de rhum comme on peut actuellement définir une levure de boulangerie ou une levure de brasserie. L'ensemble de la partie pratique sera complété par une étude bibliographique de la fabrication du rhum et du métabolisme des alcools supérieurs et des sucres de réserves.

oooooooooooo

## I) Généralités

Sur les 100 000 espèces de microorganismes connus, seulement quelques centaines sont utilisées par l'homme de façon industrielle. On trouvera dans le tableau I les principaux produits industriels obtenus à l'aide de microorganismes. A ces productions assurées par des levures, des bactéries ou des moisissures, on peut ajouter les possibilités nouvelles offertes par les cellules animales ou végétales en culture pure sur milieu synthétique.

On distingue les bactéries des autres microorganismes par le fait que ce sont des procaryotes ne possédant qu'un seul chromosome, et n'ayant pas de noyau cellulaire individualisé. Les levures et les moisissures sont des eucaryotes avec un noyau cellulaire limité par une membrane. Les levures sont unicellulaires, alors que les moisissures sont des champignons pluricellulaires. La taille des cellules, identiques pour les deux organismes est de l'ordre d'une dizaine de micromètres, mais les moisissures forment des individus visibles à l'œil nu.

On peut aussi différencier les microorganismes par leur métabolisme énergétique:

- Certains tels les Streptomyces ne peuvent croître qu'en présence d'oxygène moléculaire. On les nomme aérobie strict.

- D'autres tels les Clostridium ne peuvent croître qu'en absence d'oxygène moléculaire, ils sont anaérobies stricts

- Enfin des organismes comme les levures peuvent croître soit de façon aérobie soit de façon anaérobie. C'est ce type de microorganismes qui sera l'objet de notre étude.

Les levures sont en général décrites comme des champignons microscopiques. Leur classification taxonomique est basée sur leur mode de reproduction sexuée:

- Ascomycètes: les cellules sexuelles sont connues dans des ascus
- Basidiomycètes: Les cellules sexuelles sont externes, portées par des basides.
- Deutéromycètes: Ces levures n'ont pas de mode de reproduction sexuée connu

La figure 1 représente schématiquement la reproduction d'une levure ascomycète qui sont les plus importantes industriellement. Parmi ces levures ce sont les Endomycétales dont on trouvera une classification sur la figure 2 qui revêtent la plus grande importance, avec en particulier le genre Saccharomyces. Une espèce de ce genre nous intéresse tout particulièrement, il s'agit de Saccharomyces cerevisiae qui intervient dans trois processus industriels très importants:

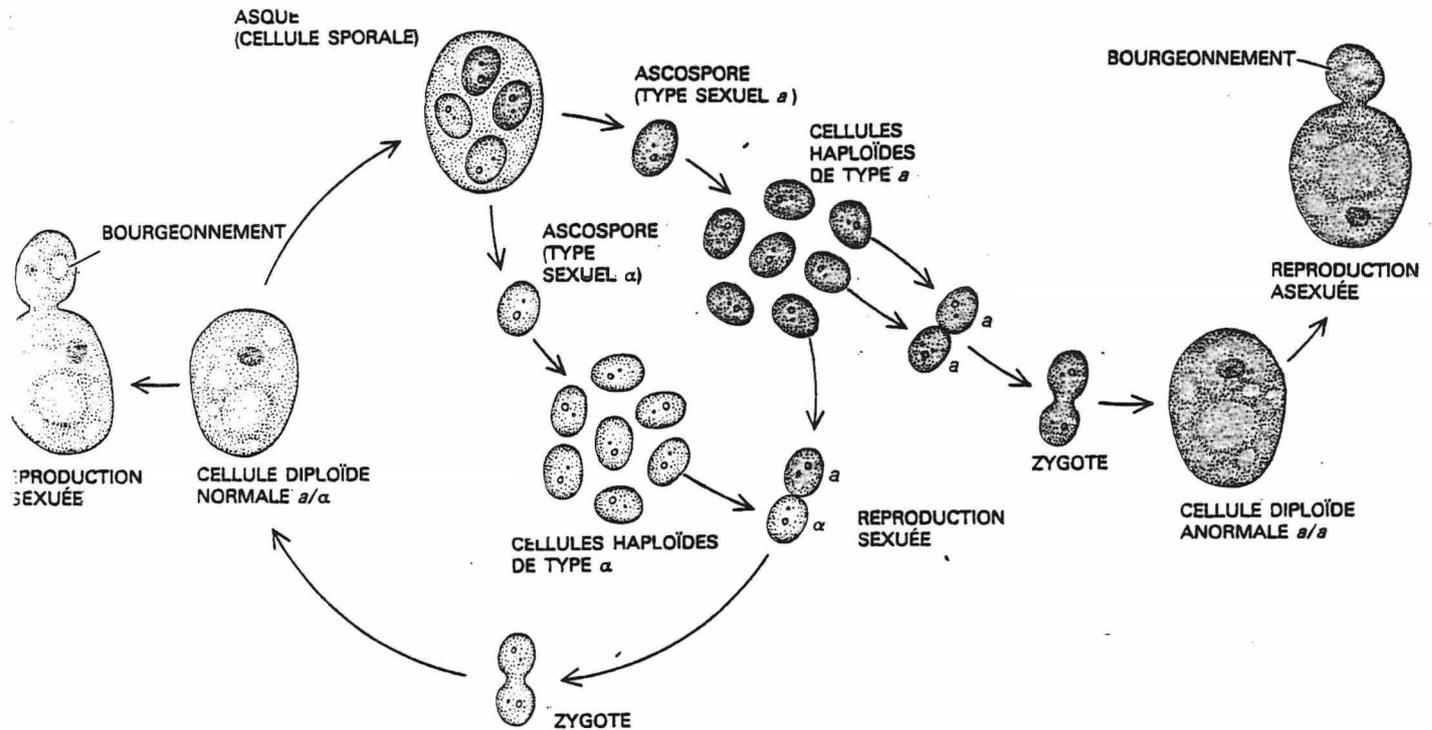
- La production de biomasse
- La production de pain
- La production d'alcool de bouche ou industriel

Si la production de biomasse présente peu d'intérêt sur le plan financier, il n'en est pas de même pour les deux autres types de production cités, en particulier pour la production d'alcool qui est un des plus grands secteurs des industries agro-alimentaires.

ORGANISME	TYPE	PRODUIT
ALIMENTS ET BOISSONS		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	LEVURE	PAIN, VIN, ALE, SAKÉ
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	LEVURE	BIÈRE BLONDE ALLEMANDE
<i>Saccharomyces rouxii</i>	LEVURE	SAUCE DE SOJA
<i>Candida milleri</i>	LEVURE	PAIN
<i>Lactobacillus sanfrancisco</i>	BACTÉRIE	PAIN
<i>Streptococcus thermophilus</i>	BACTÉRIE	YAOURT
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	BACTÉRIE	YAOURT
<i>Propionibacterium shermanii</i>	BACTÉRIE	TOMES
<i>Gluconobacter suboxidans</i>	BACTÉRIE	VINAIGRE
<i>Penicillium roqueforti</i>	MOISSISSURE	FROMAGES À PÂTE PERSILLÉE
<i>Penicillium camembertii</i>	MOISSISSURE	CAMEMBERT ET BRIE
<i>Aspergillus oryzae</i>	MOISSISSURE	SAKÉ (HYDROLYSE DE L'AMIDON DE RIZ)
<i>Rhizopus</i>	MOISSISSURE	TEMPEH
<i>Mucor</i>	MOISSISSURE	SUFU (FERMENTATION DU SOJA)
<i>Monascus purpurea</i>	MOISSISSURE	ANG-KAK (VIN ROUGE)
PRODUITS CHIMIQUES INDUSTRIELS		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	LEVURE	ÉTHANOL (DU GLUCOSE)
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	LEVURE	ÉTHANOL (DU LACTOSE)
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	BACTÉRIE	ACÉTONE ET BUTANOL
<i>Aspergillus niger</i>	MOISSISSURE	ACIDE CITRIQUE
<i>Xanthomonas campestris</i>	BACTÉRIE	POLYSACCHARIDES
ACIDES AMINÉS ET NUCLÉOTIDES ACCENTUANT LES ARÔMES		
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	BACTÉRIE	L-LYSINE
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	BACTÉRIE	ACIDE 5'-INOSINIQUE ET ACIDE 5'-GUANYLIQUE
PROTEINES D'ORGANISMES UNICELLULAIRES		
<i>Candida utilis</i>	LEVURE	PROTÉINE MICROBIENNE DE DÉCHETS DE PÂTE À PAPIER
<i>Saccharomycopsis lipolytica</i>	LEVURE	PROTÉINE MICROBIENNE DES ALCANES DU PÉTROLE
<i>Methylophilus methylotrophus</i>	BACTÉRIE	PROTÉINE OBTENUE DE BACTÉRIES CULTIVÉES SUR MÉTHANE OU MÉTHANOL
VITAMINES		
<i>Eremothecium ashbyi</i>	LEVURE	RIBOFLAVINE
<i>Pseudomonas denitrificans</i>	BACTÉRIE	VITAMINE B <sub>12</sub>
<i>Propionibacterium</i>	BACTÉRIE	VITAMINE B <sub>12</sub>
ENZYMES		
<i>Aspergillus oryzae</i>	MOISSISSURE	AMYLASES
<i>Aspergillus niger</i>	MOISSISSURE	GLUCOAMYLASE
<i>Trichoderma reesii</i>	MOISSISSURE	CELLULASE
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	LEVURE	INVERTASE
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	LEVURE	LACTASE
<i>Saccharomycopsis lipolytica</i>	LEVURE	LIPASE
<i>Aspergillus</i>	MOISSISSURE	PECHNASES ET PROTÉASES
<i>Bacillus</i>	BACTÉRIE	PROTÉASES
<i>Endothia parasitica</i>	MOISSISSURE	RENNETE MICROBIEN
POLYSACCHARIDES		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	BACTÉRIE	DEXTRANE
<i>Xanthomonas campestris</i>	BACTÉRIE	GOMME XANTHIQUE
PRODUITS PHARMACEUTIQUES		
<i>Penicillium chrysogenum</i>	MOISSISSURE	PENICILLINES
<i>Cephalosporium acremonium</i>	MOISSISSURE	CÉPHALOSPORINES
<i>Streptomyces</i>	BACTÉRIE	AMPHOTÉRICINE B, KANAMYCINES, NÉOMYCINES, STREPTOMYCINE, TÉTRACYCLINES ET AUTRES
<i>Bacillus brevis</i>	BACTÉRIE	GRAMICIDINE S
<i>Bacillus subtilis</i>	BACTÉRIE	BACITRACINE
<i>Bacillus polymyxa</i>	BACTÉRIE	POLYMYXINE B
<i>Rhizopus nigricans</i>	MOISSISSURE	TRANSFORMATION DES STÉROÏDES
<i>Arthro bacter simplex</i>	BACTÉRIE	TRANSFORMATION DES STÉROÏDES
<i>Mycobacterium</i>	BACTÉRIE	TRANSFORMATION DES STÉROÏDES
HYBRIDOMES		
		IMMUNOGLOBULINES ET ANTICORPS MONOCLONAUX
CELLULES DE MAMMIFÈRES		
		INTERFÉRONS
<i>Escherichia coli</i> (via la technologie du génie génétique)	BACTÉRIE	INSULINE, HORMONE DE CROISSANCE HUMAINE, SOMATOSTATINE, INTERFÉRON
CAROTÉNOÏDES		
<i>Blakeslea trispora</i>	MOISSISSURE	BÉTA-CAROTÈNE
<i>Phaffia rhodozyma</i>	LEVURE	ASTAXANTHINE
BACTÉRIES ENTOMOPATHOGÈNES		
<i>Bacillus thuringiensis</i>	BACTÉRIE	BIO-INSECTICIDES
<i>Bacillus popilliae</i>	BACTÉRIE	BIO-INSECTICIDES

12. LES PRINCIPAUX PRODUITS industriels obtenus à l'aide des micro-organismes vont des plus anciennes fabrications (bière, fromage, levain) aux plus récentes créations de la technologie du génie génétique (insuline, hormone de croissance humaine). La technologie cellulaire a récemment élargi son domaine pour inclure la culture de cellules de mammifères, sources de nouveaux produits.

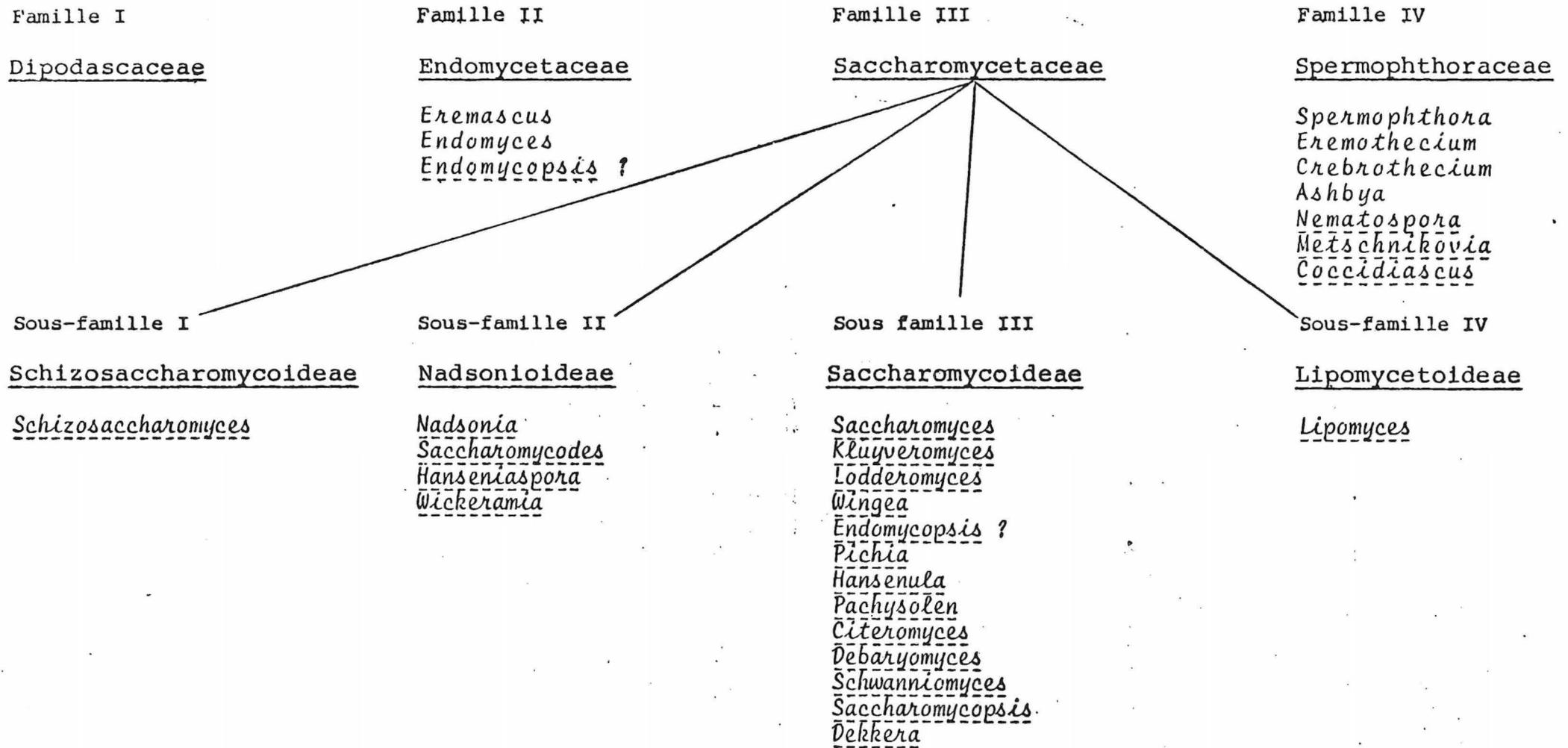
Tableau I (24)



LA REPRODUCTION D'UNE LEVURE est normalement asexuée : elle se fait par bourgeonnement à la surface de la cellule ; la reproduction sexuée toutefois peut être induite dans des conditions particulières. Dans le cycle sexuel, une cellule diploïde normale donne naissance à des asques, ou cellules sporales, qui contiennent quatre ascospores haploïdes. Les ascospores sont de deux sexes sexuels : a ou α. Chacun de ces types peut se développer par

bourgeonnement en cellules haploïdes. L'accouplement d'une cellule haploïde a avec une cellule haploïde α donne naissance à une cellule diploïde normale aα. Des cellules haploïdes du même sexe peuvent aussi s'accoupler occasionnellement pour former des cellules diploïdes anormales (a/a ou α/α) qui ne pourront se reproduire que de façon asexuée par bourgeonnement. Les levures industrielles se reproduisent principalement par bourgeonnement.

Figure 1 (24)



Les noms soulignés en pointillé correspondent aux genres de levures

FIGURE 2 : Les Endomycétales ( 4 )

(selon LODDER, 1971 (8))

## II) Critères de selection des levures pour la production d'alcools

La production d'alcools fait appel à des procédés variés et est source d'innovations techniques permanentes, notamment en brasserie, qui est le secteur industriel de pointe dans ce domaine. La profession s'est attachée à définir les propriétés requises par les souches de Saccharomycès cerevisiae utilisées pour la production d'alcool de bouche ou industriel.

Ces propriétés, énumérées par A.H. ROSE(27) sont les suivantes:

### -Aptitude à la production d'éthanol

Le besoin de cette qualité est évident mais on n'y attache généralement que peu de considération. Or tous les microorganismes susceptibles d'être utilisés ne possèdent pas cette aptitude au même degré. Le degré d'alcool produit n'est pas la seule chose à prendre en considération. En effet, il faut tenir compte des conditions dans lesquelles a lieu cette production. THORNE(32) a mis en évidence la notion de vitesse de fermentation qui caractérise la fermentation d'un substrat standard par une souche de levure. L'unité choisie est : mg de CO<sub>2</sub> produit/g de levure x heures. La mesure de cette vitesse sur substrat standard permet de mieux comparer les souches entre elles. Toutefois la fermentation alcoolique étant un processus enzymatique, l'activité de synthèse protéique influence la vitesse de fermentation. La concentration en azote intracellulaire donne une idée de cette activité de synthèse. THORNE (33), a défini l'efficacité fermentaire comme le rapport de la vitesse de fermentation sur la concentration d'azote intracellulaire. C'est encore à l'heure actuelle le meilleur moyen de caractériser l'aptitude à produire de l'éthanol d'une souche de levure.

### -Production de composés de flaveur

Bien que l'éthanol soit le produit principal de la fermentation alcoolique, il n'a que peu d'importance sur le plan organoleptique. Le goût des boissons alcoolisées vient en général de composés présents à faible concentration et qui sont des produits secondaires du métabolisme levurien. Il est souvent difficile d'identifier tous les composés intervenant dans la flaveur d'une boisson tant leur nombre est grand. L'aptitude de la souche à excréter les produits de son métabolisme intervient elle aussi, bien qu'une sélection sur cette base ne soit pas pour l'instant envisageable.

### -Stabilité et Viabilité des souches

La stabilité des souches de levure a été peu étudié jusqu'à maintenant car la plupart des souches utilisées le sont depuis des années sans évolution notable de la souche. De ce fait les souches sont considérées comme stables et font l'objet de peu de recherches sur ce plan. Une difficulté supplémentaire dans l'étude de la stabilité des souches est la mauvaise connaissance du génôme de Saccharomycès cerevisiae.

La viabilité d'une souche de levure est caractérisée par son aptitude à réinitier un cycle de croissance. Cela est lié à la teneur en ATP intracellulaire, qui est la principale source d'énergie métabolique. Une perte de viabilité est toujours causée par une diminution de synthèse de l'ATP, sa dégradation étant continue. Les autres nucléotide -phosphate influent aussi par leur concentration sur la viabilité de la levure. En fonction des concentrations des divers nucléotide -phosphate on définit la charge en énergie de la souche considérée, dans les conditions de manipulations utilisées.

$$\text{Charge en énergie} = \frac{0,5(\text{ADP})+(\text{ATP})}{(\text{AMP})+(\text{ADP})+(\text{ATP})} \quad (28)$$

La perte de viabilité se fait pour des valeurs très basses de cette charge en énergie (0,15 chez Sacch. cerevisiae). La production d'ATP se fait à partir de trois sources d'énergie principales :

- Les sucres de réserves (glycogène et tréhalose)
- Les lipides (triacylglycérol, stérol, ester)
- Le RNA

L'utilisation des lipides et du RNA ne se faisant qu'après dégradation totale des sucres de réserves, c'est la teneur en ces sucres qui représentera le mieux la viabilité d'une souche.

#### -Flocculation

Suivant le stade de la fermentation où l'on se trouve cette propriété des levures peut être désirable ou indésirable. Elle réduit l'utilisation des sucres du milieu, mais permet une filtration du moût fermenté plus aisée. L'étude de la flocculation est rendue malaisée par l'influence importante de la forme de la vaisselle utilisée pour conduire la fermentation. Les processus physico-chimique ayant lieu lors de la flocculation n'ont été élucidés que récemment. La compréhension de ces mécanismes permettra de mieux maîtriser ce facteur.

#### - Tolérance à l'éthanol.

L'éthanol, bien que produit par les levures leur est toxique à trop forte concentration. La tolérance à l'éthanol est devenu un facteur limitant pour les fermentations à haute gravité en brasserie, où on parvient à des titres en alcool de 14° à 16° GL. La difficulté est tournée en sélectionnant des souches résistantes à l'éthanol. Dans les fermentations moins élaborées, la tolérance à l'éthanol est un problème moins crucial, mais dont il convient tout de même de se préoccuper, la toxicité de l'éthanol provoquant un ralentissement de l'utilisation des sucres par les levures en fin de fermentation.

Dans la fabrication du rhum, les levures ne sont pas caractérisées selon ces critères. La station de biotechnologie des fruits et légumes du C.R.A.A.G. s'est donc fixé comme un de ses buts dans son programme rhum, la caractérisation des levures de rhumerie selon les critères qu'on vient de définir. Cette action devrait permettre aux industriels de mieux choisir leurs souches de levures et, à terme, d'améliorer la qualité de leur produits. Il est capital d'avoir à l'esprit que tous les critères cités interagissent entre eux et que seule une étude de la dynamique de ces interactions sera efficace. C'est dans ce cadre que se situe la partie pratique de mon stage. Pour mieux appréhender les problèmes, une connaissance des processus de fabrication du rhum s'impose.

Chapitre II : Fabrication du rhum

I) Botanique et agriculture de la canne à sucre

La canne à sucre est une plante graminée de la tribu des andropogonées. L'espèce la plus couramment utilisée est Saccharum officinarum. L'origine de la canne à sucre serait la Nouvelle Guinée. De là, sa propagation aurait eu lieu en plusieurs temps jusqu'en Espagne, d'où C. COLOMB l'emmena vers le nouveau monde en 1493. L'espèce d'origine serait Saccharum robustum.

L'exploitation industrielle de la canne à sucre ne commença que tardivement aux Antilles Françaises, puisque ce n'est qu'en 1644 que débuta la fabrication du sucre en Guadeloupe. La Martinique suivit deux ans plus tard.

La situation des Antilles est idéale pour la culture de la canne, puisque cette plante herbacée annuelle se plaît dans les régions tropicales et subtropicales chaudes et humides. Sa zone culturale s'étend de 35° de latitude Nord à 30° de latitude Sud. Cette plante ne peut pousser en altitude et la température minimale requise pour sa croissance est de 20°C.

1) Anatomie

La partie aérienne de la canne à sucre est une tige pouvant atteindre 4 mètres de hauteur, formée de nœuds et d'entre nœuds. Chaque nœud est pourvu d'un bourgeon permettant la multiplication végétative de la plante. L'ensemble de la tige est recouvert d'une écorce dure. Les feuilles, portées par la tige, s'insèrent au niveau des nœuds et sont dures et coupantes. Une représentation est donnée par la figure 3 (8).

Les cannes poussent en touffe de 5 à 40 tiges. Lors de la maturité sexuelle, on voit apparaître au sommet de chaque tige une fleur bisexuée, verticale. La floraison, provoquée par un ensemble de facteurs bioclimatiques (durée du jour, T°, % d'humidité du sol), annonce la récolte.

2) Sélection variétale

Cette sélection est principalement effectuée hors des Antilles Françaises. Toutefois les Centres Techniques de la Canne et du Sucre (C.T.C.S.) de Guadeloupe et de Martinique interviennent dans un programme de sélection en utilisant les critères suivant :

- Rendement à l'hectare
- Richesse en sucre
- Epailage naturel
- Tenue verticale des tiges
- Tolérance au charbon

Les résultats obtenus au C.T.C.S. montrent que la variété de canne influe sur la qualité de la fermentation(5)

3) Prédateurs et maladies

Les principaux prédateurs de la canne sont le rat (Ratus norvegicus) et le borer (Diatraea saccharalis) qui est un insecte foreur. La canne est aussi sujette à trois maladies pouvant être graves. Il s'agit du charbon, causé par un champignon, l'échaudement des feuilles causé par une bactérie et le rabougrissement des repousses causé par un virus.

#### 4) Techniques culturales

La canne à sucre est une plante pérenne. Il n'y a donc pas lieu des replantations tous les ans. En général la replantation est faite tous les cinq ans. Une telle technique nécessite une bonne préparation du sol. La répartition du coût de cette préparation sur les cinq années de repousse permet un équilibre financier de l'opération.

La culture peut se faire suivant deux cycles différents: -La petite culture qui impose la plantation en début de saison des pluies (Avril-Mai) et la récolte 12 mois plus tard.

-la grande culture, qui impose la plantation en milieu de saison des pluies (Septembre-Octobre) et la récolte 15 à 16 mois après.

Si la petite culture est plus logique d'un point de vue physiologique, les grandes exploitations, pour des raisons de rendement et socio-économiques, préfèrent la grande culture. La plantation a lieu elle aussi, suivant deux modes: -la plantation piquée, où des plants de têtes prélevés sur des cannes mûres sont piqués verticalement en terre.

-la plantation couchée, en canne entière, qui est pratiquée en raison des difficultés de transport des boutures. Les cannes nécessitent une fumure à base d'azote, de phosphate et de potassium.

La récolte se fait soit à la main, soit par machine automatique. Dans les Antilles Françaises elle est généralement précédée d'un brûlage du champ. Ce brûlage est considéré comme néfaste pour les récoltes suivantes.

La culture de la canne s'est développée principalement autour de l'industrie sucrière, le rhum étant resté un sous-produit jusqu'au 19<sup>e</sup> siècle malgré une apparition quasi simultanée à celle du sucre. Ce n'est qu'après cette date qu'il s'est élevé au rang de produit industriel.

### II) Technologie de fabrication du rhum

Entre la matière première canne à sucre et le produit fini rhum bien des transformations ont lieu (fig. 4). Le rhum s'étant développé en tant que sous-produit ce sont les mélasses et les écumes de défécations qui ont tout d'abord servies de substrat de fermentations. Par la suite, on a utilisé les jus de canne et les sirops. La technologie d'extraction du jus est la même en distillerie qu'en sucrerie. Les mélasses et les sirops sont achetés directement aux usines de fabrication du sucre.

Le premier atelier de la fabrication du rhum est celui de la préparation du moût. Ensuite ce moût estensemencé par un agent de fermentation approprié. Enfin, après cette fermentation, le vin obtenu est distillé pour obtenir le rhum ou de l'alcool de canne industriel.

#### 1) Préparation du moût

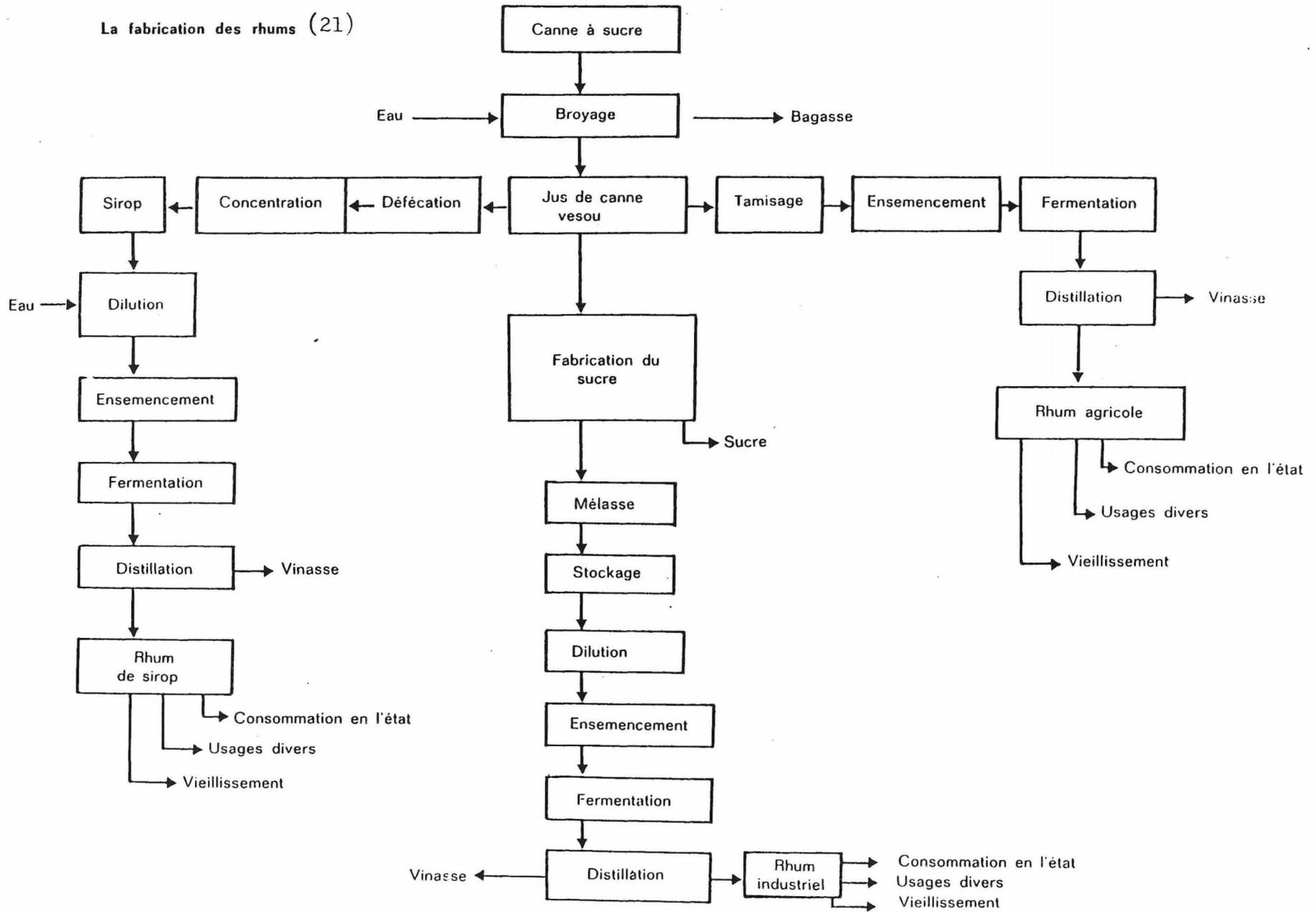
Selon la définition légale le rhum ne peut être préparé qu'à partir des produits ou sous-produits de la canne à sucre. Tous les substrats utilisés seront donc des dérivés de l'industrie sucrière.

##### a) Les mélasses

Il s'agit du sous produit terminal de la fabrication du sucre. Elles contiennent encore de forte concentration en sucre mais celui-ci n'étant plus cristallisable

Figure 4

La fabrication des rhums (21)



elles sont inutilisables pour l'industrie sucrière. Les mélasses sont à l'origine du rhum industriel. Le rhum agricole est lui, fabriqué à partir des jus de canne. La composition des mélasses est très complexe car en plus des impuretés du jus brut on y retrouve des composés provenant de la dégradation d'autres composés en présence des réactifs d'épuration ainsi que des produits de l'altération des sucres par la chaleur et la chaux. Les tableaux II et IIbis donnent la composition générale des mélasses de canne.

% Mélasses			Autres carbohydrates		
17-25	20	Eau	Gomme solubles		
30-40	35	saccharose	Amidon		0.72
4-9	7	Glucose	Inositol		0.20
5-12	9	Fructose	Phytine		0.18
1-5	3	autres sucres réducteurs	D-Mannitol		0.50
2-5	4	autres carbohydrates	Méthoxyl		1.80
7-15	12	cendres	Cendres carbonatés		
2-6	4.5	Composés azotés	Bases	% des cendres	
0.1-2	0.4	cires, stérols-phospholipides	K <sub>2</sub> O	30-50	4.8
-	-	pigments	CaO	7-15	1.2
-	-	vitamines	MgO	2-14	0.98
			Na <sub>2</sub> O	0.3-9.0	0.10
			Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.4-2.5	0.12
			Acides		
			SO <sub>3</sub>	7-27	1.8
			Cl	12-20	1.8
			P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	1-10	0.6
			SiO <sub>2</sub> et insolubles	1-7	0.6

Tableau II : Composition des mélasses (8)

Composés azotés		
Protéine	2.5-4.5	4.0
acides aminés	0.3-0.5	0.5
24 acides présent, dont		
	mg/g de mélasse	
alanine	0.20-0.22	
aminotutyrique	0.06-0.22	
Acide aspartique	0.90-1.65	
Acide glutamique	1.02-1.04	
glycine	0.06-0.07	
lysine	0.05-0.07	
Sérine	0.39-0.80	
Thréonine	0.30-0.90	
Valine	0.11-0.20	
Acides et bases nucléiques		
Xanthine		
Guanine		
Hypoxantine		
5-Méthylcytosine		

Tableau IIbis : Composition des mélasses (8)

Acides non-azotés		
Aconitique	1.6	3.0
citrique		
malique		
<u>mesaconique</u>	<u>1-2.5</u>	<u>2.0</u>
succinique		
etc...		

C	Cires et stérols	
1 - Triacontanol		
Phytostérol		
Stigmastérol		

Pigments	
chorophylle	
tannins	
anthocyanins	

Vitamines	µg/G
biotines (H)	1-3
choline (B <sub>4</sub> )	880
acide folique (B complexe)	0.3-0.4
niacine (B complexe)	17-30
acide panthothenique (B complexe)	20-60
riboflavine (B <sub>2</sub> )	2-3
pyridoxine (B <sub>6</sub> )	1-7
thiamine (B <sub>1</sub> )	1.6-1.0

b) Les jus de canne ou vesous

Les jus sont obtenus par broyage de la canne et sont ensuite filtrés. La composition moyenne des vesous est donné par le tableau III. Les rhums fabriqués à partir de jus reçoivent le qualificatif de rhum agricole.

TIGE DE LA CANNE	CANNE (%)
Eau	73 - 76
Extrait sec	24 - 27
Partie soluble	10 - 16
Fibre (sec)	11 - 16
Constituants du jus	% extrait sec soluble
Sucre	75 - 92
. saccharose	70 - 88
. glucose	2 - 4
. fructose	2 - 4
Sels	3.0 - 4.5
. acides minéraux	1.5 - 4.5
. acides organiques	1.0 - 3.0
Acides organiques	1.5 - 5.5
. acides carboxyliques	1.1 - 3.0
. acides aminées	0.5 - 2.5
Autres non-sucre	
. protéine	0.5 - 0.6
. amidon	0.001 - 0.050
. Gomme	0.30 - 0.60
. cires - lipides - phosphatides	0.30 - 0.15
Autres	3.0 - 5.0
Concentrations minérales constituants :	
Potassium (K <sub>2</sub> O)	1.31
Sulfate (SO <sub>3</sub> )	0.52
Chlorure (Cl)	-
Calcium (CaO)	0.29
Magnésium (MgO)	0.28
Silicate (SiO <sub>2</sub> )	0.71
Phosphate (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	0.40
Oxyde de fer (Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	-
Cendre sulfates	-
Cendres carbonates	3.64

### c) Les sirops

Ils sont obtenus par concentration d'un jus ayant subi une défécation. Leur caractéristiques sont donc proches de celles des jus. On nomme "gros sirops" des mélasses peu épuisées. Ces gros sirops servent parfois à la fabrication du rhum.

Qu'il s'agisse de mélasse, de vesou ou de sirop, la matière première est trop concentrée en sucre pour être utilisable par des levures. On dilue donc avec de l'eau de manière à obtenir la concentration souhaitée. Cette concentration est évaluée par densimétrie. Pour une mélasse la densité initiale du moût doit être de 1050 à 1060 kg/m<sup>3</sup>. Pour les jus de canne on travaille avec une densité légèrement inférieure de l'ordre de 1030 à 1040 kg/m<sup>3</sup>. La dilution de la matière première est particulièrement importante puisque la teneur en sucre détermine non seulement le titre en alcool du vin obtenu mais aussi sa concentration en composés de saveur et donc les qualités organoleptiques de la boisson préparée. Ces composés de saveur peuvent aussi se montrer toxiques pour les levures (1). On assiste donc à deux effets antagonistes d'un même composé le sucre, qui ralentit les fermentations par sa toxicité pour les levures; mais qui en tant que source principale d'énergie accélère les mêmes fermentations. La concentration du moût en sucre est donc à déterminer avec soin.

Le sucre n'est pas le seul élément nutritif qui doit être présent dans le moût. En effet, les levures utilisées ont des besoins en azote qui ne sont pas couverts par les teneurs en azote des mélasses ou des jus. Il est donc nécessaire de compléter le moût. Aux Antilles Françaises on utilise le plus souvent le sulfate d'ammonium ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) dans des quantités de l'ordre de 3kg pour 100 Hl de moût.

Dans la préparation du moût, une protection contre les attaques bactériennes s'avère indispensable. Elle peut être assurée par des antibiotiques tels que la pénicilline (20) ou par une stérilisation partielle ou totale des moûts. A ces techniques, on préfère aux Antilles Françaises une acidification du milieu par de l'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Les quantités d'acide utiles sont de l'ordre de 2 l d'acide pur pour 100 Hl de moût, ce qui permet d'avoir un pH de début de fermentation situé entre 4 et 5.

### 2) Atelier de fermentation

Après préparation le moût peut être ensemencé. Le choix de l'agent de fermentation conditionne la qualité du rhum à produire. La levure la plus fréquemment rencontrée actuellement est Saccharomyces cerevisiae, bien que quelques distilleries travaillent encore avec Schizosaccharomyces pombe qui était très utilisée au 19<sup>e</sup> siècle. D'autres levures du genre Saccharomyces comme Sacch. chevalieri ou Sacch. rouxii peuvent être rencontrées occasionnellement. L'influence de l'agent de fermentation se fait sentir à deux niveaux:

- sur la production de composés de saveur
- sur la durée de fermentation

Des critères de rentabilité économique ont amené les industriels à préférer Sacch. cerevisiae, plus rapide en fermentation, à Schizosacch. pombe, considérée comme produisant des rhums de meilleure qualité organoleptique. Le taux d'ensemencement choisi jouera aussi sur la durée de fermentation et sur la production de composés de saveur; mais il semble qu'en ajustant correctement la complémentarité du moût, l'effet de ce facteur soit limité (1).

Les caractéristiques générales d'une fermentation sont données dans le tableau IV.

**TABLEAU IV (22)**

**Quelques données sur les fermentations aux Antilles Françaises**

Données	Rhum agricole	Rhum industriel
Densité initiale .....	1,03 à 1,04	1,04 à 1,05
Densité finale .....	0,919 à 1	1,011 à 1,024
Sucres réducteurs initiaux .....	80 à 90 g/l	90 à 100 g/l
Sucres réducteurs finaux .....	0,7 à 1,2 g/l	3,9 à 11 g/l
pH initial .....	4,1 à 4,5	4,3 à 4,5
pH final .....	3 à 3,3	3,5 à 3,7
Sulfate de NH <sub>4</sub> ajouté .....	29 g/hl	20 à 30 g/hl
Degré du vin .....	4 à 5°GL	4 à 4,5°GL
Alcool dans les vinasses .....	0,03 à 0,1°GL	0,03 à 0,5°GL
Rendement .....	50 à 60 l d'AP par tonne de canne	200 à 250 l d'AP par tonne de mélasse
Volume des cuves .....	200 à 1.000 hl	200 à 1.000 hl
Température dans les cuves .....	30 à 37°C	30 à 37°C
Durée de la fermentation .....	36 à 48 heures	36 à 48 heures
Population initiale en levures .....	100 × 10 <sup>6</sup> /ml	100 × 10 <sup>6</sup> /ml

L'ensemencement des cuves peut se faire selon trois procédés principaux. Aux Antilles Françaises quelque soit le procédé choisi l'ensemencement sera non stérile.

-Ensemencement par cuve-mère. Les levures proviennent d'une cuve en phase active de croissance aérobie.

-Ensemencement par coupage. Les levures proviennent d'une cuve en pleine fermentation (croissance anaérobie)

-Ensemencement "caca grappe". Les levures proviennent d'une cuve en fin de fermentation; juste avant distillation.

Les trois procédés sont utilisés en Guadeloupe, et il arrive même qu'au sein d'une même usine plusieurs soient utilisés.

Pour la bonne marche de la fermentation il ne faut pas remplir complètement les cuves avant ensemencement. Deux techniques de remplissage sont employées en Guadeloupe.

-Remplissage fractionné. La cuve est remplie à moitié puis on procède à l'ensemencement; comme si la cuve était totalement remplie. Après un délai d'environ 5 H on remplit la moitié du volume restant et on termine le remplissage 10 H après le début de la fermentation. La durée totale de la fermentation suivant cette technique est de 24 H à 36 H.

-Remplissage progressif. Les levures sont présentes dans la cuve de fermentation dès le début du remplissage. Ce dernier se fait en 4 H environ, de manière continue. Cette technique présente le gros inconvénient, en particulier sous les tropiques, de provoquer un échauffement important des cuves. Or la température de fermentation influe sur la production de composés de flaveur, le stockage des graisses et celui des sucres. Les hautes températures favorisent aussi les infections bactériennes. Compte tenu des difficultés de refroidissement rencontrées en Guadeloupe, ce mode de remplissage est très pénalisant.

Les caractéristiques physico-chimique des vins obtenus en fin de fermentation sont données dans le tableau IV.

### 3) Atelier de distillation

Un seul type de distillation est employé en Guadeloupe, la distillation continue en colonne. Le principe en est donné dans la figure 5.

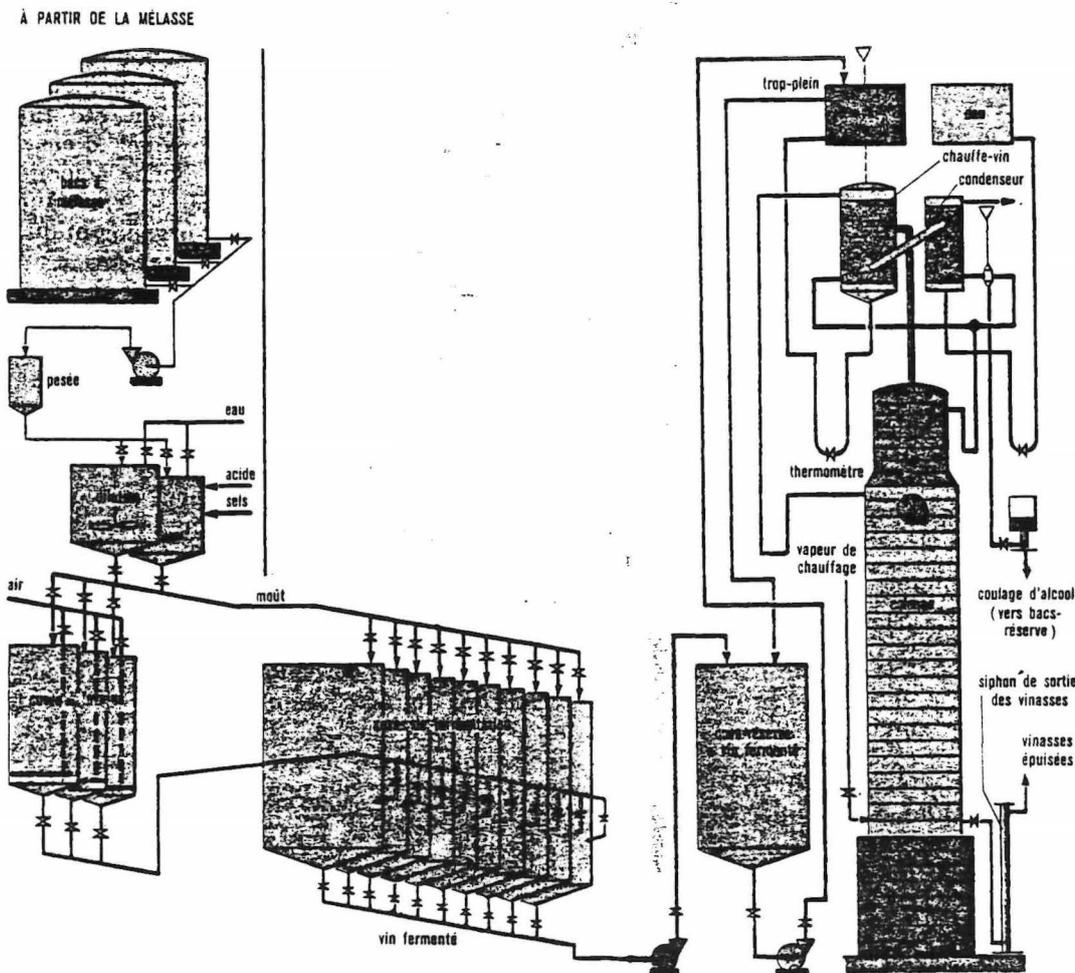


Schéma de principe d'une distillerie d'alcool.

Figure 5 : Schéma de principe d'une distillerie d'alcool. (14).

Cette distillation en colonne s'oppose à la distillation discontinue en alambic qui était pratiquée initialement aux Antilles Françaises. Cette dernière, bien que produisant des eaux de vie de meilleure qualité (13) a été abandonnée pour des motifs économiques.

Les colonnes ont été modifiées par rapport au schéma de principe précédent, de manière à leur permettre de couler un rhum à 70°GL à partir de vin ne titrant pas plus de 4 à 5°GL. La rectification a été limitée, pour que le rhum produit conserve des qualités organoleptiques satisfaisantes. Ces colonnes modifiées ont reçu l'appellation de colonne créole.

L'alimentation en vapeur des colonnes est assurée par brûlage de la bagasse, résidu cellulosique du broyage des cannes. Le nombre de plateaux de concentrations varie de trois à cinq, alors qu'on compte en général vingt plateaux d'épuisement. Ces nombres de plateaux sont assez proches des minima théoriques, et les colonnes réclament un chauffage important pour un bon fonctionnement. La bagasse étant un sous-produit sans autre utilisation que la combustion et étant disponible en grande quantité, la dépense en chauffage est très faible. Par contre, le faible nombre de plateaux nuit à la qualité du rhum car le temps de séjour dans la colonne est court ce qui ne permet pas à de nombreuses réactions d'estérification de se produire(13). Les eaux de vie produites en colonne continue seront donc de moindre valeur organoleptique que celles produites en alambics où le temps de séjour est bien supérieur. Il demeure toutefois possible d'améliorer de façon sensible la qualité des rhums distillés en continu par quelques modifications des colonnes visant à augmenter le temps de séjour du moût dans la colonne. Une action au niveau de la dimension des colonnes, du type de plateaux utilisés ou de l'intensité du flux d'écoulement ont hélas un effet négatif sur le rendement financier de la distillation et les industriels hésitent à intervenir sur ces paramètres. Quelques améliorations simples peuvent quand même être mises en oeuvre sans diminution du rendement. Par exemple un coulage sur les plateaux titrant 45 à 50°GL où s'accumule l'alcool amylique et le recyclage de ce coulage permettrait l'estérification de cet alcool, augmentant la formation de composés aromatiques de qualité. Le chambrage du moût à 98°C pendant 30 minutes favorise aussi la formation d'esters et est donc facteur d'amélioration de la qualité(13).

### III) Conclusion

Grâce à cette étude succincte de la fabrication du rhum, on peut cerner un peu mieux les facteurs influençant la qualité du rhum. Par suite il est possible de définir à quel niveau les actions doivent être entreprises et par qui. Ainsi une action sur les colonnes à distiller, si elle est envisageable et même souhaitable, n'est pas du ressort d'un laboratoire de recherche. Par contre les améliorations possibles des souches de levures ou du type de complémentations azotées font partie du programme de recherche de la station. En fonction de la connaissance acquise des procédés de fabrication du rhum on peut chercher à affiner les critères de sélection tels qu'ils ont été définis par A.H. ROFF (27), en vue d'une production spécifique de rhum.

## Chapitre III : Caractérisation des levures de rhumerie en Guadeloupe

Il est proposé dans ce chapitre de faire l'inventaire des données disponibles sur les levures de rhumerie, en fonction des critères définis précédemment. Dans la mesure du possible on cherchera à préciser les actions à mener pour améliorer la connaissance physiologique de ces levures.

### I) Flocculation

Il n'existe aucune donnée concernant la flocculation des levures de rhum. Cela n'a que peu d'importance, les fermentations étant conduites sans agitation avec des levures basses et dans des cuves ouvertes à l'air libre. Tant qu'aucune modification n'aura été apportée à ce procédé de fabrication il n'y a pas lieu de s'intéresser à la flocculation des souches employées.

### II) Tolérance à l'éthanol

Les fermentations sont généralement conduites aux Antilles Française avec Sacch. cerevisiae. Ces levures supportent sans dommage des degrés d'alcool pouvant dépasser 10°GL. Or pour des raisons diverses les moûts ne titrent pas plus de 4 à 5°GL après fermentation. On est donc très loin du seuil de tolérance et il est inutile pour l'instant, et sous réserve de modification des procédés de fabrication, de sélectionner les levures sur leur tolérance à l'éthanol.

### III) Aptitude à la production d'éthanol

Cette aptitude se mesure, comme on l'a vu, par l'efficacité fermentaire de la souche étudiée. Les seules études faites sur levures de rhum ne concernaient pas la vitesse de fermentation telle qu'on a pu la définir au chapitre I mais la vitesse d'utilisation d'un substrat variable par sa concentration en sucre, à des taux d'ensemencement variables (21). PARFAIT lors de cette étude arrive à la conclusion que l'augmentation du taux d'ensemencement et de la concentration en sucre favorisent l'utilisation du substrat. Il ne caractérise pas ses souches par une vitesse de fermentation sur un substrat standard et n'étudie pas systématiquement l'effet des variations apportées au milieu sur la production de composés aromatiques. Seule une étude au niveau des alcools supérieurs est menée.

Tout le travail de caractérisation des souches susceptibles d'être utilisées en rhumerie reste donc à faire en ce qui concerne la vitesse de fermentation. La définition du substrat standard n'est pas faite.

La caractérisation systématique des souches par leur teneur en azote intracellulaire n'a pas été entreprise, bien que la méthode de dosage de cet azote semble au point à la station. La méthode utilisée est celle de KJELDAHL décrite en annexe 1 (p.1)

### IV) Production de composés de flaveur

Ce sont ces composés qui déterminent le goût caractéristique d'une eau de vie. On rencontre généralement les mêmes d'une eau de vie à l'autre mais en

des proportions variables, spécifiques pour une boisson. Ces composés sont des produits secondaires du métabolisme fermentaire ou résultent de la dégradation d'autres éléments lors de la distillation. L'étude de leur métabolisme doit permettre de créer les conditions optimales à la production d'une fraction aromatique de bonne qualité. Plus de 400 composés ont été dénombrés qu'on peut rassembler en quelques grands groupes :

- les composés phénoliques
- les acides gras volatils
- les esters
- les alcools supérieurs

Une idée des diverses teneurs rencontrées dans les rhums est donnée dans le tableau V

**TABLEAU V (21)**

**Analyse de différents échantillons de rhum. Pour le rhum agricole, les chiffres représentent la moyenne de 30 analyses, pour le rhum de mélasse : 6 analyses. Les méthodes de dosages employées correspondent à ceux de la méthode officielle française**

Dosage	Unité	Rhum agricole		Rhum de mélasse		Rhum « grand arôme »	Rhum de sirop	Rhum léger
		Moyenne	Valeurs extrêmes	Moyenne	Valeurs extrêmes			
Acides totaux	g. a acétique par hl d'AP	25,40	5,50 à 50,37	33,65	12,35 à 50,00	317,30	72,00	15
Aldéhydes	g. acétaldéhyde par hl d'AP	11,22	2,00 à 40,80	5,33	3,10 à 8,80	15,00	11,20	12
Esters	g. acétate d'éthyle par hl d'AP	27,91	8,09 à 42,24	28,03	11,26 à 46,11	313,28	47,52	32
Alcools supérieurs	g. isobutanol par hl d'AP	310,64	220 à 625	236,91	190 à 275	38,00	228,00	39
Furfural	g. par hl d'AP	—	—	—	—	0,50	1,30	—
Total du non- alcool		375,17	230 à 721,1	303,92	251 à 379	684,08	360,02	100

On appelle rhum "grand arôme" un rhum produit grâce à Schizosacch. pombe et des souches comme agents de fermentations. Le rhum léger est un rhum ayant subi une rectification poussée lors de la distillation.

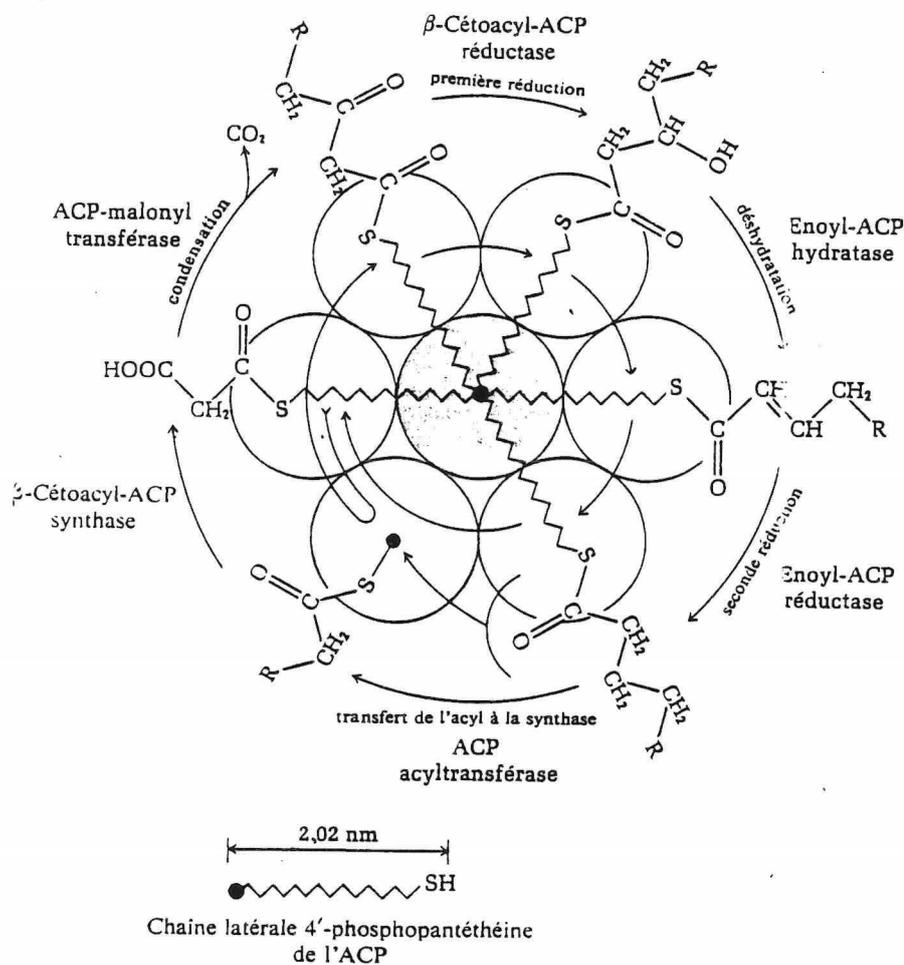
De ce tableau il ressort que les alcools supérieurs sont les composés les plus importants quantitativement. Ils seront donc l'objet d'une étude un peu plus approfondie.

#### 1) Composés phénoliques

On les rencontre dans la fraction aromatique des eaux de vie vieilles en fût. Ils ne sont pas formés au cours de la fermentation mais proviennent de la dégradation de la lignine du bois. Les composés trouvés semblent dépendre de la nature du bois employé. Une étude sur le vieillissement des rhums doit être entreprise en 1984 par la station de biotechnologie des fruits et des légumes du C.R.A.A.G. en collaboration avec les C.T.C.S. de Guadeloupe et de Martinique.

## 2) Acides gras volatils

Ces composés sont produits en très faibles quantités par les levures. Malgré cela ils sont les seconds en importance quantitative. Leur seuil de perception organoleptique étant lui aussi très faible, ils interviennent de façon non négligeable dans l'arôme. Leur origine métabolique, encore controversée, semble être les acides  $\alpha$ -cétoniques (16). Une autre voie probable pour leur biosynthèse serait un décrochage prématuré de l'hélice de LYNNEN qui est la voie de biosynthèse des acides gras à longue chaîne (fig. 6)



Représentation schématique du complexe acide gras synthétase. La protéine centrale est l'ACP. Sa longue chaîne latérale phosphopantéthéine sert d'appareil mobile qui déplace le groupe acyl d'une molécule d'enzyme à une autre, pour effectuer les six étapes nécessaires à l'addition de chaque unité à deux carbones.

Figure 6 : Hélice de LYNNEN (10)

Selon TAYLOR et KIRSOP (31) les acides gras volatils, dont on trouvera la liste des principaux dans le tableau VI, ne proviennent pas de la dégradation oxydative des acides gras à longue chaîne.

Ces acides sont de bons indicateurs d'accidents de fermentation car si les levures en produisent peu, des contaminations par des bactéries du type Clostridia, Acétobacter ou Lactobacillus provoqueront une sensible augmentation de l'acidité volatile du vin produit (3). La station met actuellement au point une méthode fiable et reproductible de dosage de ces acides dans les rhums et les noûts.

Nom Usuel	Synonymes	Formule	Poids Moléculaire	Solubilité dans		Densité
				Eau	Ethanol	
Acétique	éthanoïque Zoonique	$\text{CH}_3\text{-CO}_2\text{H}$	60.05	i	i	1.049
Propionique	propanoïque méthyl lacétique	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CO}_2\text{H}$	74.08	i	i	0.992
Acrylique	Propénoïque	$\text{CH}_2\text{=CH-CO}_2\text{H}$	72.06	i	i	1.0511
Isobutyrique	Méthylpropanoïque	$(\text{CH}_3)_2\text{CH-CO}_2\text{H}$	88.11	V	V	0.950
Butyrique	Butanoïque Ethacétique	$\text{CH}_3\text{-(CH}_2)_2\text{-CO}_2\text{H}$	88.10	i	i	0.964
$\alpha$ -Méthylbutyrique	valérianique actif	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-(CH)CH}_3$ $\text{CO}_2\text{H}$	102.13	f	i	0.941
Isovalérique	Isovalérique	$(\text{CH}_3)_2\text{CH-CH}_2\text{-}$ $\text{CO}_2\text{H}$	102.13	S	i	0.937
Valérique	Valérianique propylacétique pentanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{-CO}_2\text{H}$	102.13	S	S	0.936
$\alpha$ -Méthylvalérique	Méthylpropylacétique	$\text{CH}_3\text{-(CH}_2)_2\text{-CH}_2$ $(\text{CH}_3)\text{-CO}_2\text{H}$	116.16	S	S	0.923
Isocaproïque	isobutylacétique	$(\text{CH}_3)_2\text{CH-(CH}_2)_2\text{-}$ $\text{CO}_2\text{H}$	116.16	f	S	0.922
Caproïque	n-hexylique n-hexanoïque	$\text{CH}_3\text{-(CH}_2)_4\text{-CO}_2\text{H}$	116.16	f	S	0.927

S: soluble  
V: très soluble  
i: infiniment soluble  
f: faiblement soluble

Tableau VI : Principaux acides gras volatils des rhums (8)

### 3) Esters

Les esters sont souvent considérés comme la fraction aromatique la plus importante des eaux de vie (18). Cela est également vrai pour les rhums et ce sont les esters lourds d'acides gras supérieurs qui semble influencer le plus sur l'arôme des rhums (18). D'autres esters jouent un rôle positif dans l'arôme des rhums comme les esters éthyliques d'acides gras courts ou les esters non éthyliques de ces mêmes acides (11).

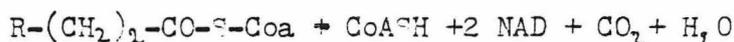
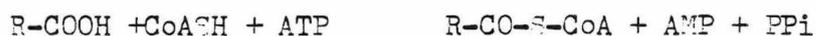
La formation d'esters lors d'une fermentation est plus abondante que ne l'on laisse supposer l'équilibre :



NORDSTRÖM (18) explique cette formation par l'alkoolyse d'acyl-CoA selon la réaction :



Les acyls-CoA provenant de trois sources différentes :



bien que la deuxième réaction semble improbable (16).

Le choix de l'agent de fermentation est capital pour la production d'esters. Les levures lentes telles que Schizosacch. pombe en produisant plus que les levures rapides comme Sacch. cerevisiae. Dans une même espèce le choix de la souche influe beaucoup sur la production (18). PAFFAIT et ses collaborateurs ont entamé un travail de caractérisation des souches utilisées en rhumerie, qu'il serait profitable de systématiser.

Une amélioration sensible de la quantité d'esters peut être obtenue par action sur la distillation (13), mais les industriels n'ont pas l'air de vouloir s'en préoccuper.

### 4) Alcools supérieurs.

Les alcools supérieurs sont la fraction aromatique la plus importante pondéralement, même si les quantités présentes dans les rhums sont plus faibles que dans d'autres eaux de vie (30). Malgré leur importance, ils ne sont pas considérés comme un facteur de qualité et leur diminution représente une amélioration du produit (23). Le tableau VII donne la liste des principaux alcools supérieurs dans le rhum.

En plus de ces alcools primaires, on rencontre dans le rhum des alcools secondaires comme le propanol-2 le butanol-2 ou le n-pentanol-2. Ces alcools ne paraissent pas avoir de propriétés odorantes particulières (7). Ils proviendraient de 2,3 diols ou de 1,2 hydroxycétones sous l'action de microorganismes tels Lactobacillus brevis, L. casei ou Clonidium acetylbutyricum (34).

La formation des alcools primaires est beaucoup mieux connue. SHREICH (23) dès 1906 commençait à élucider la chaîne de biosynthèse en remarquant l'analogie de structure entre les alcools supérieurs et les acides aminés. Des travaux successifs aboutirent à l'établissement par WEBB et INGRAHAM d'un schéma résumant la biosynthèse de ces composés (fig. 7) (23).

Nom Usuel	synonymes	Formule	Poids moléculaire	Solubilité dans		Densité
				Eau	Ethanol	
Ethanol	.alcool éthylique	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{OH}$	46.07	i	i	0.789
Propanol	.alcool n-propylique	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$	60.09	V	V	0.779
Butanol-1	.alcool n-butylique	$\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-CH}_2\text{OH}$	74.12	S	i	0.809
Méthyl-2 propanol-1	.alcool isobutylique isobutanol	$(\text{CH}_3)_2\text{CH-CH}_2\text{OH}$	74.12	S	i	0.8
Méthyl-2 butanol-1	.alcool amylique actif	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OH}$	88.15	S	i	0.818
Méthyl-3 butanol-1	.alcool isamylique	$(\text{CH}_3)_2\text{-CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{OH}$	88.15	f	i	0.811

Tableau VII : Principaux alcools supérieurs des rhums (3)

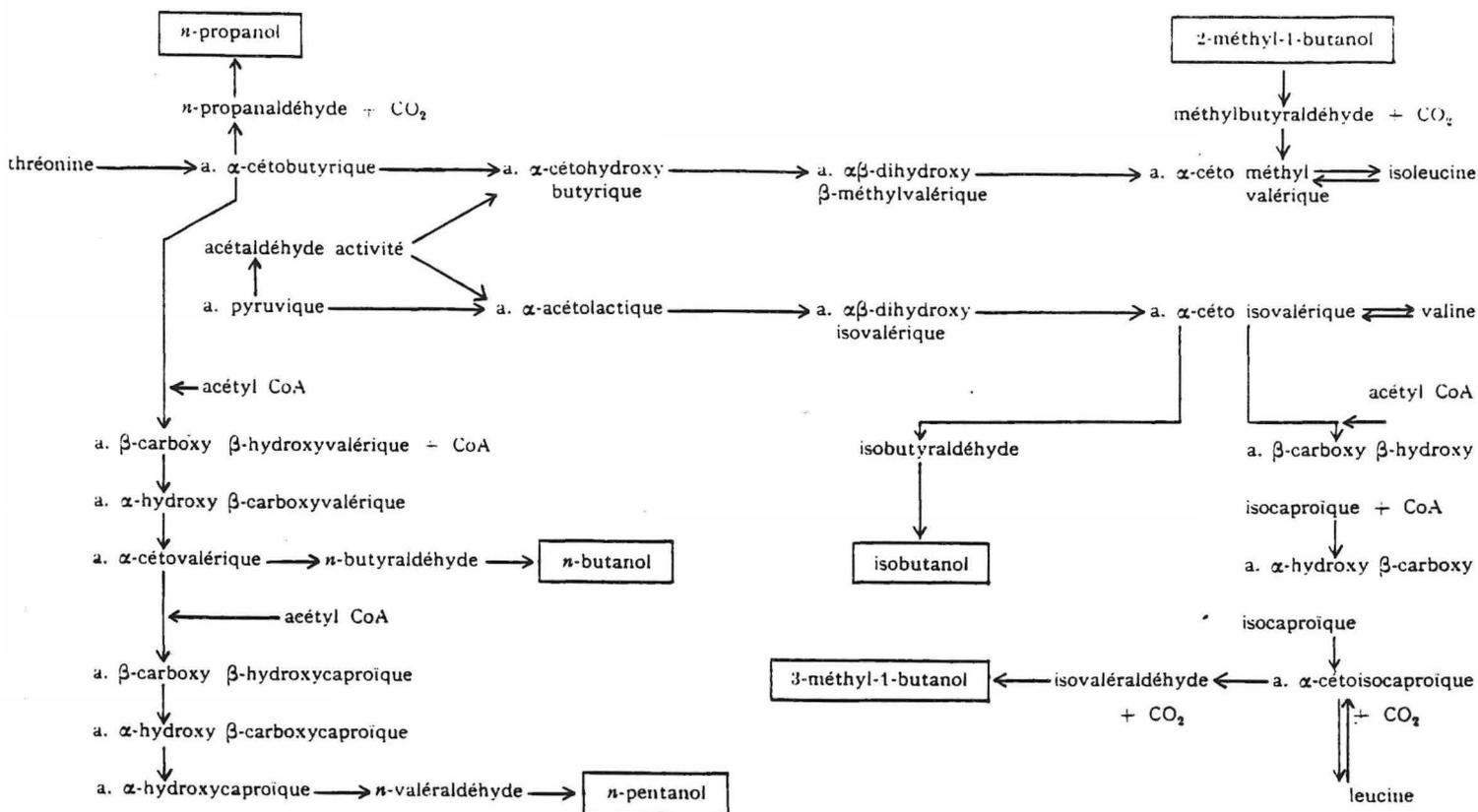


Fig. 7 — Formation des alcools supérieurs (d'après WEBB et INGRAHAM, 1963) (23)

D'après ce schéma, il apparaît que les acides  $\alpha$ -cétoniques sont les précurseurs des alcools supérieurs. Ils proviennent soit de la désamination des acides aminés soit du métabolisme des sucres par l'intermédiaire de l'acide pyruvique (15). Suivant que l'aldéhyde intermédiaire est réduit ou oxydé, on obtiendra donc soit un alcool supérieur soit un acide gras volatil, à partir d'un même acide  $\alpha$ -cétonique précurseur. La production d'éthanol et d'acide pyruvique ne sont qu'un cas particulier de ce même phénomène.

C'est la quantité des alcools présents beaucoup plus que la qualité qui différencie les eaux de vie entre elles. La production par une souche de levure sera influencée par des facteurs tels que la composition du milieu en sucre, la complémentation azotée ou le taux d'ensemencement.

#### 4-1) Influence de la composition du milieu

##### a) Complémentation azotée

Cette complémentation influe beaucoup sur la production d'alcools supérieurs (2). S'il existe dans le moût une source d'azote directement assimilable par les levures, la production de ces composés sera faible. Par contre, en absence d'azote assimilable la production de tous les alcools augmente sauf celle du n-propanol (23). L'explication généralement avancée est que le manque d'azote pour la biosynthèse des acides aminés est comblé par une transamination de l'acide  $\alpha$ -céto-glutarique au dépens du pool d'acides aminés inutiles de la cellule. Le radical  $-NH_2$  ainsi peut être réutilisé par la cellule et l'acide  $\alpha$ -cétonique produit donnera naissance par le mécanisme de WEBB à un alcool supérieur. Les termes d'azote assimilable ont été employés. Toutes les sources d'azote ne le sont pas de manière équivalentes et on peut faire intervenir pour la complémentation la notion de qualité de source d'azote (23). PAFPAIT a comparé l'effet de diverses sources d'azote sur la production d'alcools supérieurs par une souche de levure. Les résultats sont donnés dans la figure 8.

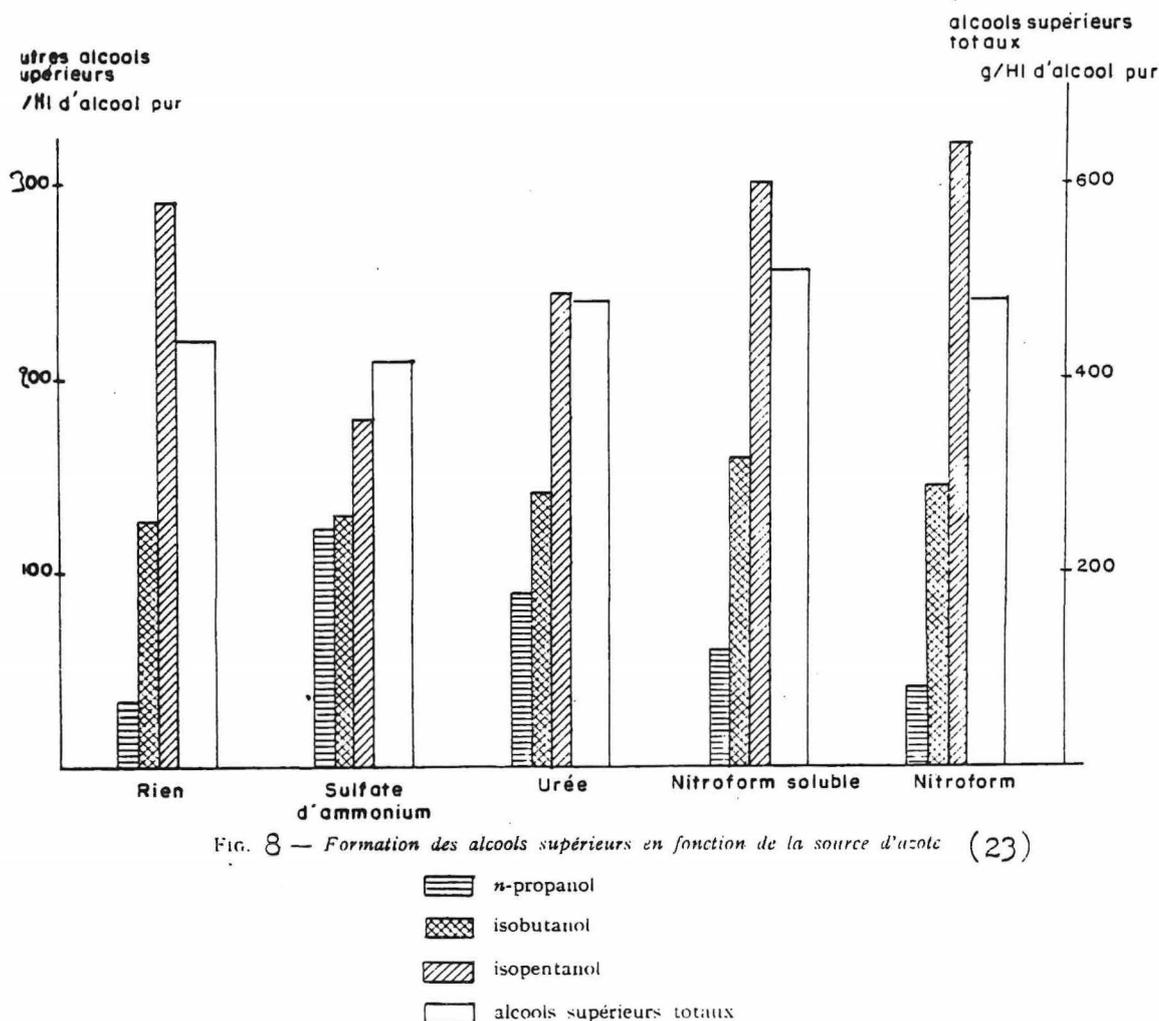


Fig. 8 — Formation des alcools supérieurs en fonction de la source d'azote (23)

Ce sont l'urée et le sulfate d'ammonium qui provoquent les plus fortes diminutions, alors que le nitroform, qui est constitué de polymères de l'urée et du formaldéhyde, n'induit pas de variations. Si on définit la qualité d'une source d'azote par sa vitesse d'assimilation durant les premières heures de la fermentation, le nitroform n'est pas une bonne source alors que l'urée et le sulfate d'ammonium sont des sources convenables d'azote. Il serait souhaitable de compléter l'étude de PARFAIT en déterminant l'effet de la complémentarité azotée sur diverses souches ou espèces de levures, et en corrélant cette complémentarité à d'autres caractères physiologiques des levures.

#### b) Concentration en sucre.

Elle influe sur la production d'alcools supérieurs mais compte tenu de l'action sur le métabolisme général de la levure de cette concentration en sucre, il est difficile de certifier qu'elle est la seule responsable des variations observées. PARFAIT (19) note qu'une augmentation semble provoquer une diminution du taux d'alcools supérieurs.

### 4-2) Influence de la conduite de la fermentation

#### a) Température

Il existe une température optimale pour chaque alcool mais les contraintes industrielles empêchent d'exploiter ce résultat (15).

#### b) Vitesse de fermentation

Selon EPHLICH, toute augmentation de la durée de la fermentation provoque une augmentation de la teneur finale du rhum en alcools supérieurs (15).

### c) pH

Comme pour la température il existe des valeurs optimales de pH inutilisables du fait des contraintes de la production industrielle.

#### 4-3) Influence du taux d'ensemencement

Les résultats vont dans le même sens que ceux obtenus pour la vitesse de fermentation. Une augmentation du taux d'ensemencement, raccourcissant la durée de fermentation diminue le taux global d'alcools, chez la levure Sacch. cerevisiae. L'isobutanol a un comportement différent, puisque sa concentration augmente dans les mêmes conditions (19). Le rôle du taux d'ensemencement sur la production de composés aromatiques est controversé (23) même si certains auteurs le tiennent pour prépondérant (8).

#### 4-4) Influence de la levure

L'espèce de levure choisie pour conduire la fermentation fixe la production des alcools. En effet, Schizosacch. pombe bien que beaucoup plus lente en fermentation que Sacch. cerevisiae produit moins d'alcools au profit d'esters lourds. Ces souches sont les deux seules sur lesquelles on possède quelques renseignements. Des souches sauvages comme Sacch. chevalieri n'ont fait l'objet d'aucune étude. La station possédant une collection de levures de rhumerie, il serait intéressant de caractériser leur production d'alcools supérieurs dans les conditions de fermentation industrielle.

#### 4-5) Influence de la distillation

Si il est possible d'améliorer les colonnes pour abaisser la teneur des rhums en alcools supérieurs (13), la distillation ne semble pas pouvoir résoudre facilement le problème de l'élimination d'une partie importante des alcools supérieurs sans une élimination parallèle des esters lourds (23).

### 5) Autres composés de flaveur

Certains composés sont particulièrement néfastes à l'arôme. Parmi eux on peut mentionner l'acroléine qui proviendrait de la dégradation du glycérol par des bactéries, avec formation simultanée d'alcool allylique. Il semble que le seul facteur déterminé influençant la production de glycérol soit la concentration en sucre (19).

Parmi les composés aromatiques du rhum, un seul a spécifiquement l'odeur de rhum. Il s'agit d'un isomère de la  $\beta$ -damascénone trans (6). Seule la forte concentration en ce composé isolé par extraction au pentane et chromatographie en phase vapeur est caractéristique du rhum, puisqu'il a été mis en évidence dans le Cognac. Les très fortes concentrations rencontrées dans les rhums "grand arôme" laissent supposer qu'il s'agit d'un produit de fermentation qu'il est peut être possible d'identifier à l'huile de rhum dont parle AFROYD (1).

### V) Stabilité et viabilité des souches de levures

Les levures de rhumerie n'ont pas été étudiées sur le plan de la stabilité, mais aucune étude n'est pour l'instant envisagée. La viabilité de ces levures est un sujet de préoccupation plus important dans l'immédiat. Cette viabilité est reliée à la concentration en sucre de réserves or ces sucres n'ont fait l'objet d'aucune investigation en rhumerie. Toutes les données disponibles ne concernent que les levures de boulangerie ou de brasserie. La similitude des résultats chez ces deux variétés de l'espèce Sacch. cerevisiae a permis d'extrapoler ces données aux levures de rhum mais une

confirmation est nécessaire. Les principaux sucres de réserves du métabolisme levurien sont le tréhalose et le glycogène.

### 1) Métabolisme du tréhalose

Le tréhalose est un dimère du glucose dont les deux résidus glucosyl sont liés par une liaison glycosidique 1-1 (fig. 9).

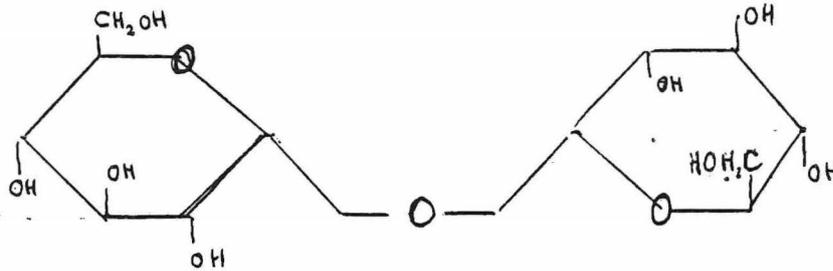


Figure 9 : Structure du tréhalose. (12).

TRVELYAN pensait ce sucre spécifique des levures de boulangeries (12), mais CHESTER a pu le mettre en évidence chez des levures de brasserie (12). Il est donc raisonnable de supposer son existence chez les levures de rhums. Le tableau VIII donne les teneurs relatives des principaux sucres de réserves chez diverses souches de levures.

*The Carbohydrate Composition of Some Strains of Saccharomyces cerevisiae*  
(Data adapted from Chester, 1963, 1964)

Carbohydrate	Carbohydrate content as proportion of total carbohydrate (%) <sup>a</sup>				
	Baking strain 77	Brewing strains			
		4236	4236 <sup>b</sup>	7000	7001
Trehalose	5	8	1	5	6
Glycogen	62	76	38	71	52
Mannan	16	7	36	12	24
β-Glucan	16	9	26	12	19

<sup>a</sup> Percentage expressed to nearest whole number.

<sup>b</sup> Yeast grown aerobically. All other yeasts were grown anaerobically at 25° and harvested at 48 h.

Tableau VIII : Composition en sucre de quelques souches de *Sacch. cerevisiae* (12).

On peut voir dans ce tableau que le pourcentage de tréhalose est faible et qu'il varie dans des proportions importantes suivant que la croissance a lieu en aérobiose ou en anaérobiose. Le schéma général de la biosynthèse est donné par la figure 10. PANEK souligne la ressemblance des voies de biosynthèse chez les levures de boulangerie et de brasserie. Il paraît donc possible d'étendre ce schéma aux levures de rhum, dans la mesure où ce sucre sera mis en évidence chez ces organismes.

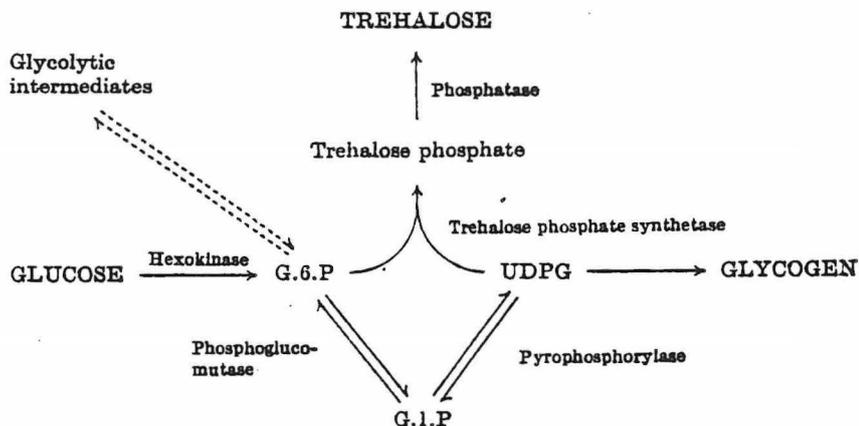
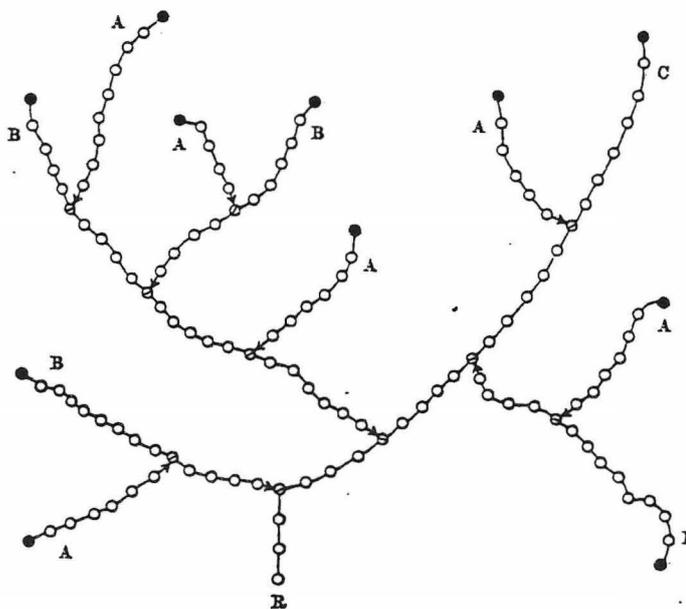


Figure 10 : Voies de biosynthèse du tréhalose (12).

La connaissance du métabolisme des levures permet d'expliquer la formation préférentielle du tréhalose en anaérobiose par l'utilisation du Glucose 6P à d'autres fins lors de la croissance active en aérobiose. On peut donc prévoir une meilleure viabilité des cellules prélevées en fin de cycle de croissance aérobie ou pendant un cycle de croissance anaérobie. La régulation de la synthèse du tréhalose par le glucose serait allostérique (17). Le tréhalose remplirait la double fonction de source d'énergie pour la division cellulaire (12,17) et pour la conservation des cellules en absence de source de carbone (12 17 29).

## 2) Métabolisme du glycogène

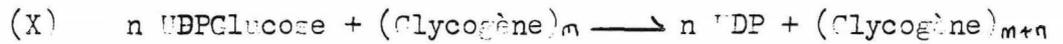
Le glycogène est un polymère ramifié du glucose. Le squelette principal est constitué d'une chaîne de résidus glucosyl liés en  $\alpha$ 1-4, sur laquelle d'autres chaînes du même type viennent se brancher en  $\alpha$ 1-6 (fig. 11).



●, indicates a non-reducing end-group (which gives rise to tetra-*O*-methyl *D*-glucose on methylation, and to formic acid on periodate oxidation); ○—, an  $\alpha$ -1,4-linked *D*-glucose residue; ○←, an  $\alpha$ -1,6-linked *D*-glucose residue; R, free reducing group; A, B, C, types of chain (see p. 428).

Figure 11 : Structure moléculaire du glycogène (12) .

La structure varie légèrement d'une souche à l'autre, notamment en ce qui concerne la longueur moyenne des chaînes qui est de 11 à 12 résidus pour les levures de boulangerie et de 13 résidus pour les levures de brasserie. Les étapes de biosynthèse du glycogène et de sa dégradation, ainsi que la régulation de ces deux phénomènes sont les mêmes dans tout le règne animal. Seuls les enzymes assurant le passage d'une étape à l'autre diffèrent. La réaction de biosynthèse est la suivante :



Elle est catalysée par la glycogène synthétase dont l'activité est régulée selon le schéma suivant :

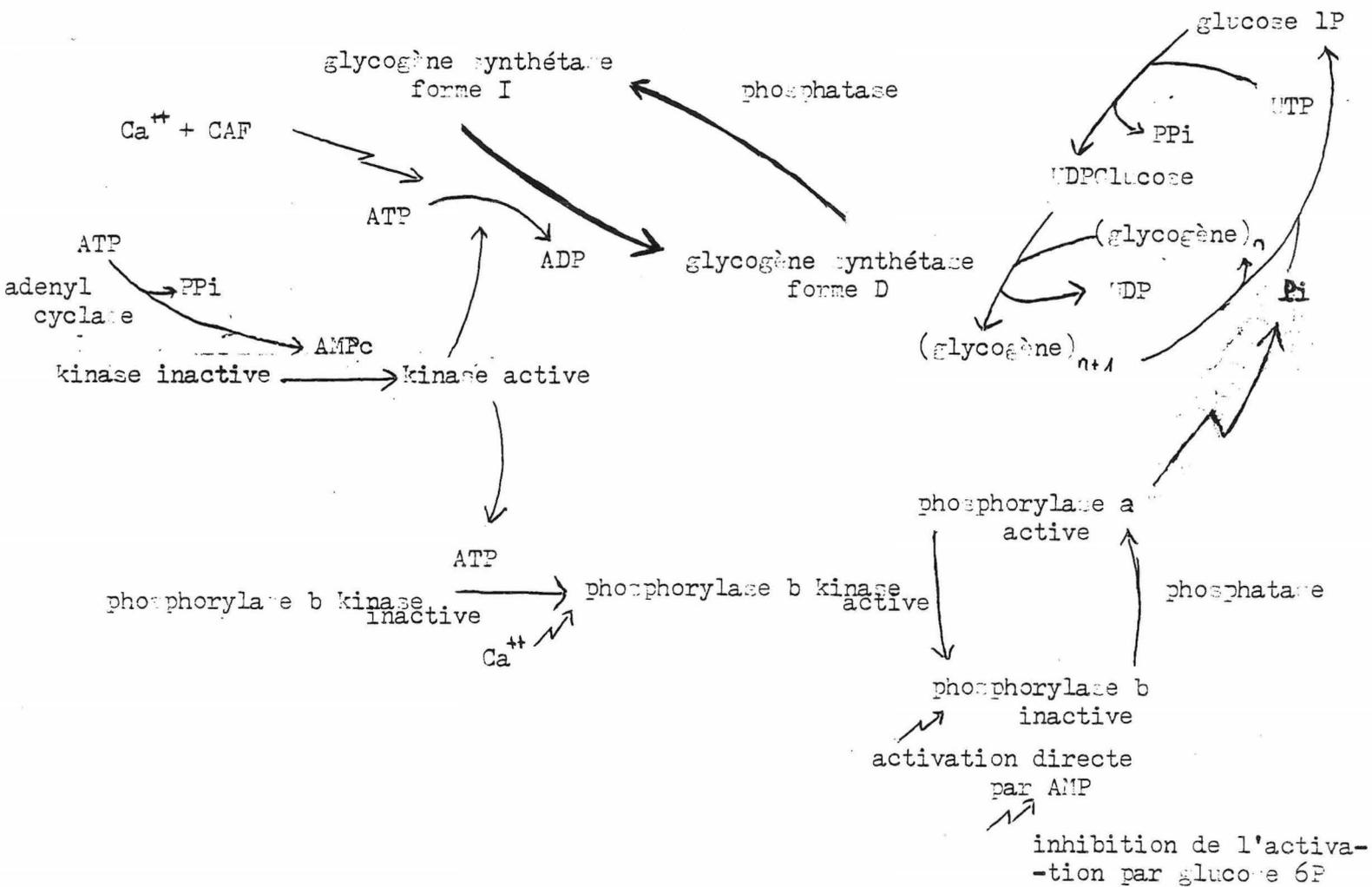


Figure 12 : Régulation du métabolisme du glycogène .

La réaction (X) ne permet que la synthèse des chaînes linéaires  $\alpha 1-4$ . Les chaînes adjacentes sont reliées à la chaîne principale par un enzyme branchant spécifique des liaisons  $\alpha 1-6$ . Le schéma ci-dessus explicite comment la charge en énergie peut représenter la viabilité d'une souche cellulaire. Mais la régulation du métabolisme du glycogène n'est pas sous la seule dépendance des nucléotides phosphate présents. La concentration en Glucose 6P

revêt une importance non négligeable. Cela amène d'ailleurs PANEK à conclure à une inhibition alternative de la synthèse du tréhalose et de celle du glycogène (17). MANNERS a un point de vue différent puisqu'il pense que ces deux sucres ont des mécanismes de synthèse parallèles et non compétitifs (12).

Le glycogène se présente sous deux formes dans la cellule :

- une forme soluble dans les solutions alcalines qui représente 5% du poids sec de la levure
- une forme soluble dans les solutions acides qui représente 6 à 40 % du poids sec de la levure suivant le stade physiologique des cellules (25) .

La fraction soluble dans les acides diminue fortement pendant les deux premières heures de la fermentation sans qu'on puisse noter en parallèle une diminution de la concentration en sucre du milieu. Pendant ces deux heures on a pu mettre en évidence une synthèse nette de lipides nécessaires à la croissance de la levure. La teneur en glycogène pourrait donc influencer sur le déroulement de la phase de latence d'une fermentation (26).

PATEL et INGLEDEW suggère une inhibition de la synthèse du glycogène par l'azote assimilable présent dans le milieu (25). Or la complémentation azotée des moûts est calculée pour que l'azote assimilable ne soit jamais un facteur limitant . Une étude sur plusieurs fermentations successives par des mêmes levures devra être menée pour s'assurer que la diminution de la teneur en alcools supérieurs obtenues grâce à une complémentation azotée ne porte pas préjudice aux fermentations suivantes. Cela est important dans le cas de l'ensemencement des cuves par coupage en industrie.

A la lumière de cette étude bibliographique et de travaux précédents, l'étude de l'influence des concentrations intracellulaires en sucres de réserve sur la fermentation et en particulier sur la production d'alcools supérieurs <sup>est</sup> apparaît essentiel à la station. Elle a donc été entreprise et la première étape à atteindre est la réalisation de levures ayant des teneurs différentes en tréhalose et en glycogène tout en possédant des caractéristiques physiologiques semblables.

## Chapitre IV : Expérimentation

### I) Dosage des alcools supérieurs dans les moûts fermentés

Le problème du dosage des alcools supérieurs est très différent dans les rhums et les moûts fermentés. Les rhums sont des solutions distillées et donc exemptes de toutes particules en suspension. On peut donc les analyser en chromatographie en phase vapeur sans prendre le risque de salir et donc d'abîmer la colonne d'analyse. Les moûts fermentés ne peuvent eux par être soumis directement à l'analyse. Ils doivent subir un traitement préalable qui les débarrasse de toutes les impuretés en suspension. Il n'y a pas de méthode référencée en possession de la station. La mise au point d'un protocole expérimental fiable et aisément reproductible fait donc l'objet de la première partie pratique de ce stage.

La détermination de la teneur en alcools supérieurs des moûts fermentés a deux buts principaux. L'un est de mieux caractériser l'étape de fermentation du processus de fabrication du rhum. L'autre est de déterminer l'effet des colonnes à distiller sur la concentration finale des alcools supérieurs dans les rhums.

Le dosage des alcools supérieurs dans les rhums est fait selon la méthode officielle présentée en annexe 1(p.3). Cette méthode prévoit l'utilisation d'un étalon interne dont il convient d'expliquer le principe. L'étalon interne est un composé proche par sa structure chimique, ses propriétés physiques et sa concentration, des composés à doser dans l'échantillon. Son comportement doit être le même que celui de ces composés quelque soit le traitement que l'on fait subir à l'échantillon. Il est introduit ainsi que tous les composés à doser dans une solution de référence où toutes les concentrations sont connues. Cette solution est injectée dans le chromatographe qui relié à un enregistreur donne des pics en réponse. En rapportant la surface des pics correspondant à chaque composés à doser à celle du pic de l'étalon interne on calcule le coefficient de réponse de l'appareil pour chaque alcool. Lors de l'injection de l'échantillon auquel a été ajouté l'étalon interne il suffit de multiplier le rapport de surface du pic du composé à doser sur celle du pic de l'étalon interne par le coefficient de réponse calculé pour avoir directement la concentration de ce composé dans l'échantillon. L'étalon interne choisi pour le dosage des alcools supérieurs est le Methyl-4 pentanol-2 en solution à 5 g/l.

Diverses méthodes de traitement des échantillons ont été testées à la station :

- la filtration avant injection directe
- la distillation au 7/10
- l'extraction liquide liquide
- l'entraînement à la vapeur

La filtration et la distillation au 7/10 ont été testées antérieurement à ce stage. La filtration était effectuée sur des filtres millipore de  $0.42\mu$  de diamètre. Le manipulateur a considéré ces résultats comme satisfaisant. Il n'a pas été donné de suite à cet essai. La distillation au 7/10 est la technique qui était initialement utilisée dans le laboratoire. Elle consiste à faire subir une rectification au moût fermenté, après ajout de l'étalon interne jusqu'à obtenir les 7/10 du volume initial. Le temps

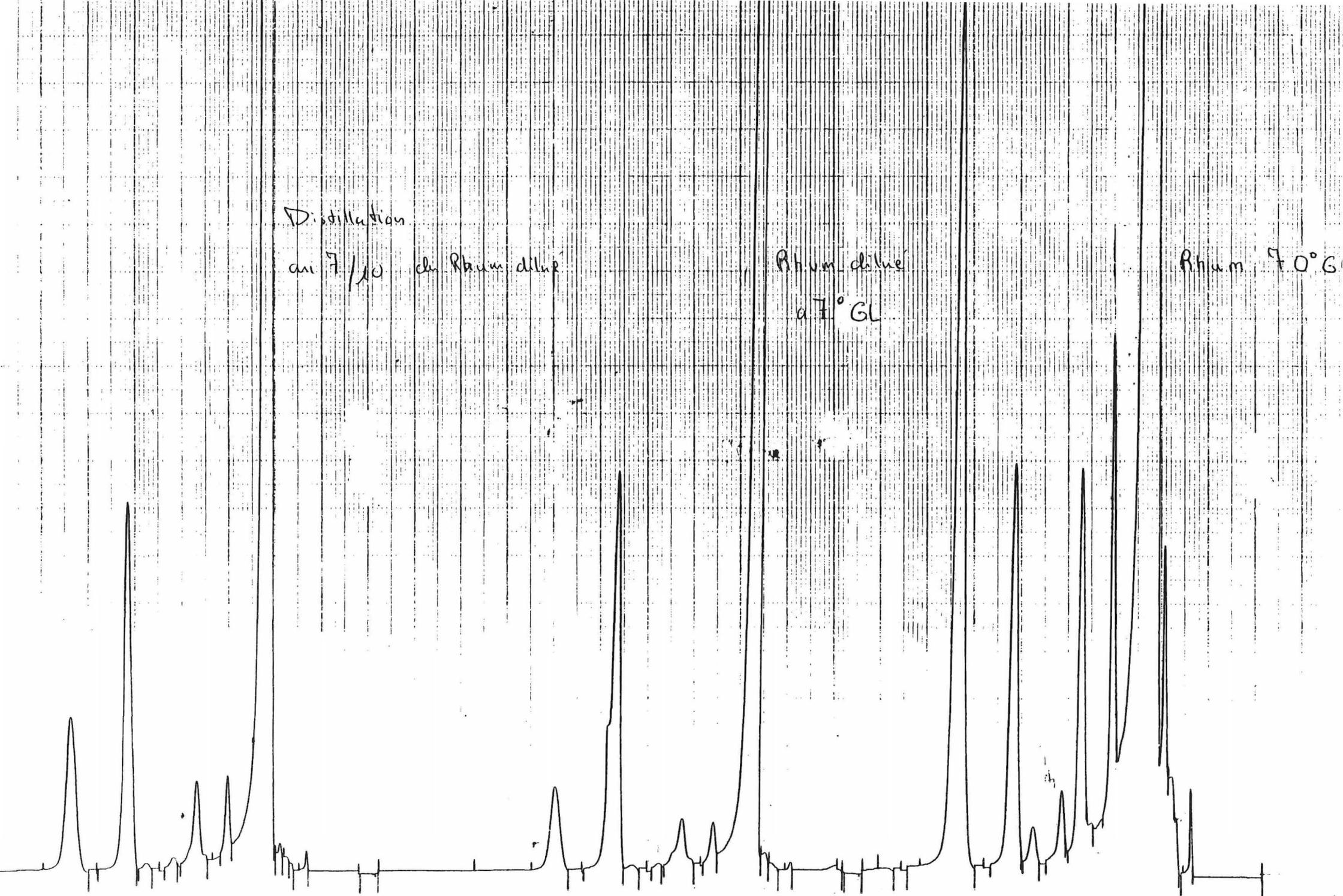


Figure 13.: Chromatogramme de l'essai de distillation au 7/10 .



nécessaire à l'opération est long. Comme on peut le voir sur les calculs d'intégration correspondant au chromatogramme de la page 35 (fig.13) la fiabilité de la méthode n'est pas bonne et il a été cherché une méthode de remplacement.

#### -l'extraction liquide liquide

Les alcools supérieurs sont des composés organiques. A ce titre ils sont plus solubles dans des solvants comme l'éther ou le pentane que dans l'eau. Cette différence de solubilité devrait permettre une extraction aisée de ces alcools à partir des moûts fermentés. Considérant qu'il n'est pas possible d'avoir un élément de comparaison si on réalise l'extraction sur des moûts, l'essai a été mené sur des rhums dilués qui sont directement injectables dans le chromatographe. Ainsi l'efficacité de l'extraction peut être mesurée. Le premier essai utilise l'éther éthylique comme solvant. A 25ml de rhum dilué on ajoute 25ml d'éther et 2,5ml d'étalon interne. Après agitation énergique on laisse décanter 1 mn. La phase aqueuse et la phase étherée sont recueillies séparément. On injecte ensuite dans le chromatographe la solution de référence (annexe 1 p.3), le rhum dilué, la phase étherée et la phase aqueuse. Les résultats sont présentés à partir de la page 37.

On constate l'apparition d'un pic important ayant un temps de rétention de 173 sec. dans la phase étherée. Ce pic qu'on retrouve aussi dans la phase aqueuse est accompagné de deux pics plus petits. L'ensemble de ces pics est sans doute dû à l'éther utilisé et aux impuretés qu'il contient. Pour tester cette hypothèse l'éther a été injecté seul et le résultat la confirme. Les chromatogrammes obtenus sont inexploitable et il faudrait pour qu'ils le deviennent redistiller l'éther. Cela alourdirait considérablement la manipulation et ferait perdre l'avantage du gain de temps par rapport à la distillation au 7/10.

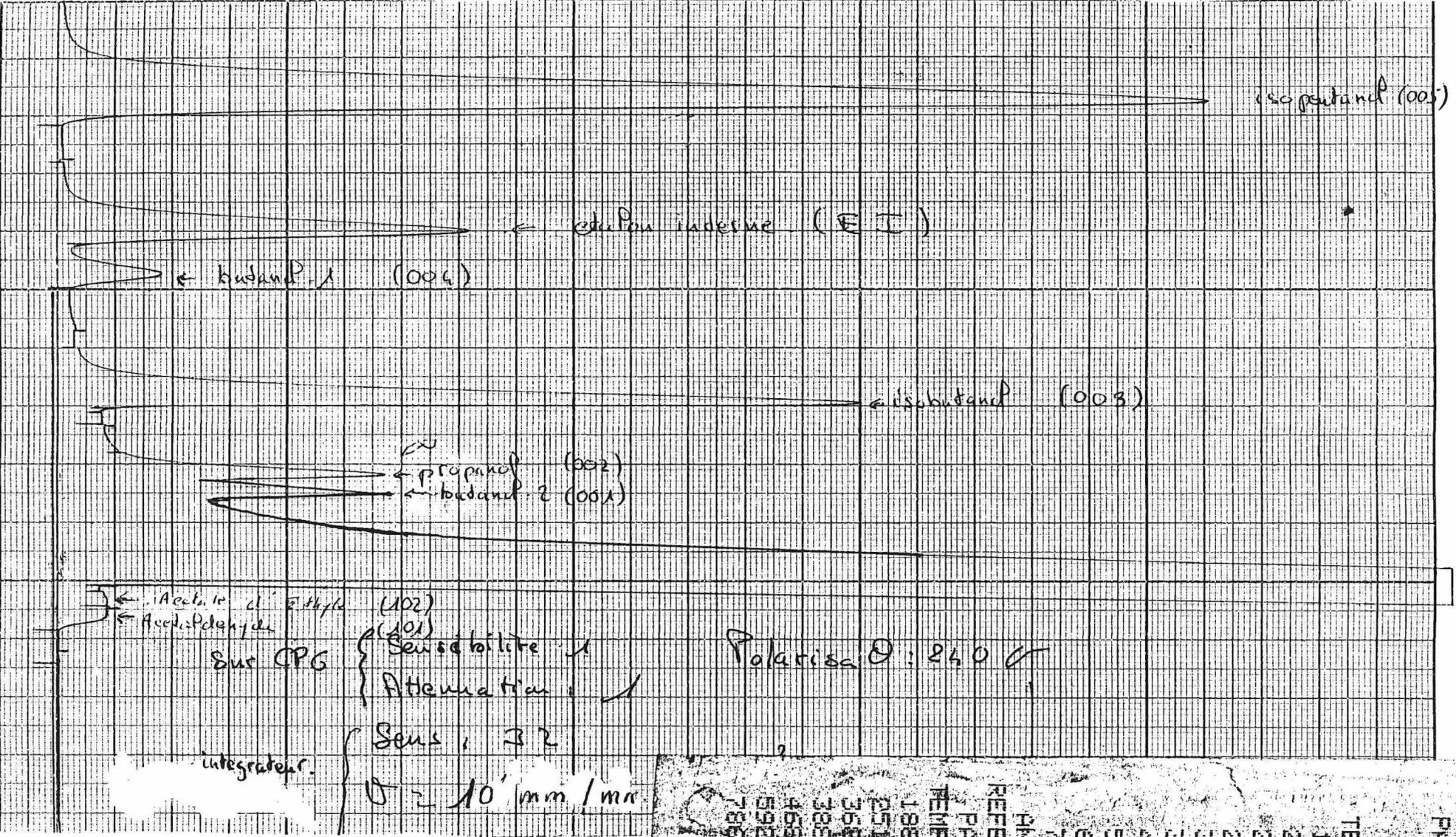
Un essai avec le pentane comme solvant a ensuite été envisagé mais le même problème qu'avec l'éther s'est posé rendant la distillation du solvant nécessaire.

L'extraction des alcools supérieurs par des solvants organiques s'avèrent donc difficile. Ces résultats confirment l'extraction non quantitative des alcools supérieurs par un mélange éther pentane trouvée par SUOMALAINEN (30).

#### -l'entraînement à la vapeur

Le principe de ce traitement est de volatiliser les alcools par chauffage à la vapeur d'eau, puis de le recondenser de manière à obtenir une solution limpide de ces alcools. L'appareil utilisé pour cette manipulation est du type Buchy. L'ajout d'étalon interne se fait avant l'entraînement. Le volume initial est de 100 ml (+10 ml d'étalon interne). Le volume recueilli est de 100 ml. La condensation des vapeurs est assurée par une colonne réfrigérée. Le temps mis pour distiller un échantillon est de l'ordre de 10 mn. Comme pour l'extraction liquide liquide l'expérience a été réalisée sur des rhums dilués, de façon à pouvoir mesurer l'efficacité du traitement. Les résultats d'un essai préliminaire sont présentés à partir de la page 42.

Figure 14 : Analyse de la solution de référence.



Polarisa  $\theta$  : 240  $\checkmark$

Sur CPG { Sensibilité  $\checkmark$   
Atténuation  $\checkmark$   
Sens : 32  
Intégrateur :  $\theta = 10$  mm/min

TEMP	CONC	NO
188	38	7052
251	91	9232
308	1171	8207
309	1182	1462
468	4897	9493
592	639	7422
786	12506	3128
	20629	2005

ANALYSE ECHANT 01  
REFERENCE 642  
PARAM CALCUL 3  
TEMP SURFACE CB  
188 504 21  
237 720 21  
251 1059 11  
292 22640998 50  
368 39744 11  
388 50646 11  
468 270800 11  
592 38430 21  
642 196885 22  
786 723144 21

ICAP 12 DELST  
PARAM INTER 3  
0313  
0606

1005 7° GL

ICAR 10 DIELSE  
PARAM INTEG 3  
0320  
0606  
TEMPS SURFACE CB  
188 4148 Z1  
253 2001 Z1  
283 10106335 Z1  
387 8748 T1  
466 19710 T1  
591 1518 T1  
639 205834 Z1  
784 41552 T1  
ANALYSE ECHANT 08  
REFERENCE 639  
PARAM CALCUL 3  
TEMPS CONC NO  
188 84 4023 3101  
253 166 1391 3102  
387 196 1387 3002  
466 340 8944 3003  
591 24 0052 3004  
784 607 3721 3005  
7488 9515



Figure 15 : Analyse du rhum dilué .

*Étherée 1005*

```

ICAP 10 DELSI
PARAM INTEG 3
      0322
      0606
TEMPS SURFACE CB
 162    5870 Z1
 173 14716207 Z1
 221    8990 T1
 251    50003 T1
 280   3261122 T1
 384    4993 T1
 463    9833 T1
 584    1648 T1
 636 242697 Z1
 776   41719 Z1
ANALYSE ECHANT 10
REFERENCE 636
PARAM CALCUL 3
TEMPS CONC NO
 251 3521 0623 3102
 384 94 9442 3002
 463 144 2353 3003
 584 22 1026 3004
 776 585 3108 3005
      4367 6352
    
```

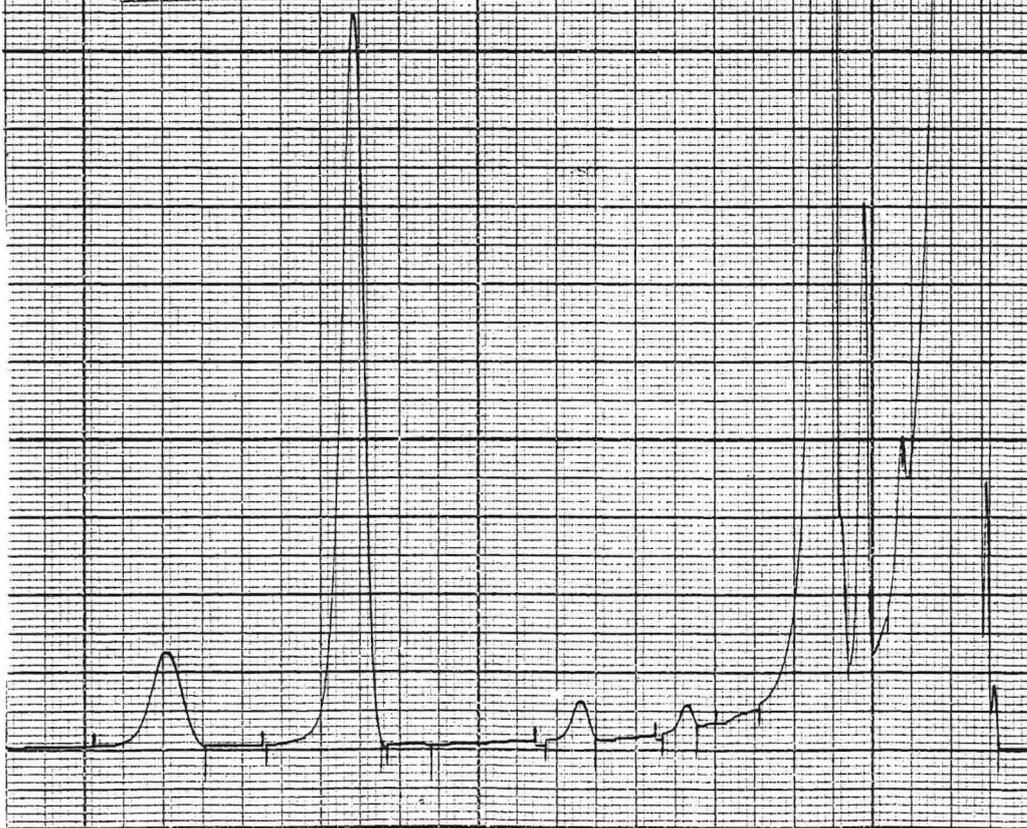


Figure 16 : Analyse de la phase étherée de l'extraction liquide liquide .

029 1005

```

ICAP 10 0ELSI
PARAM INTEG 3
      0325
      0605
TEMPS SURFACE CB
172 7606387 Z1
224 12094 T1
253 13763 Z1
282 9175300 T1
387 4974 T1
448 1267 T1
466 6769 T2
496 2668 T3
639 8026 Z1
784 3945 Z1
ANALYSE ECHANT 14
REFERENCE 639
PARAM CALCUL 3
TEMPS CONC NO
253 29305 9643 3002
387 2860 0809 3002
466 3002 4470 3003
784 1673 6512 3005
      36842 1434
    
```

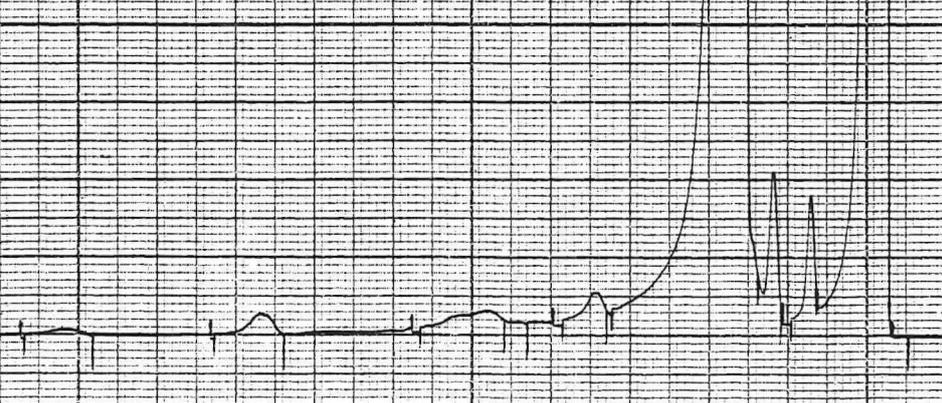


Figure 17 : Analyse de la phase aqueuse de l'extraction liquide liquide .

*Ether*

ICAP 10 DELSE  
 PARAM INTEG 3  
 0059  
 0606  
 TEMPS SURFACE CB  
 100 2948 Z1  
 176 16875645 Z1  
 225 28882 T1  
 255 87488 Z1  
 284 2416733 T1  
 ANALYSE ECHANT 23  
 REFERENCE

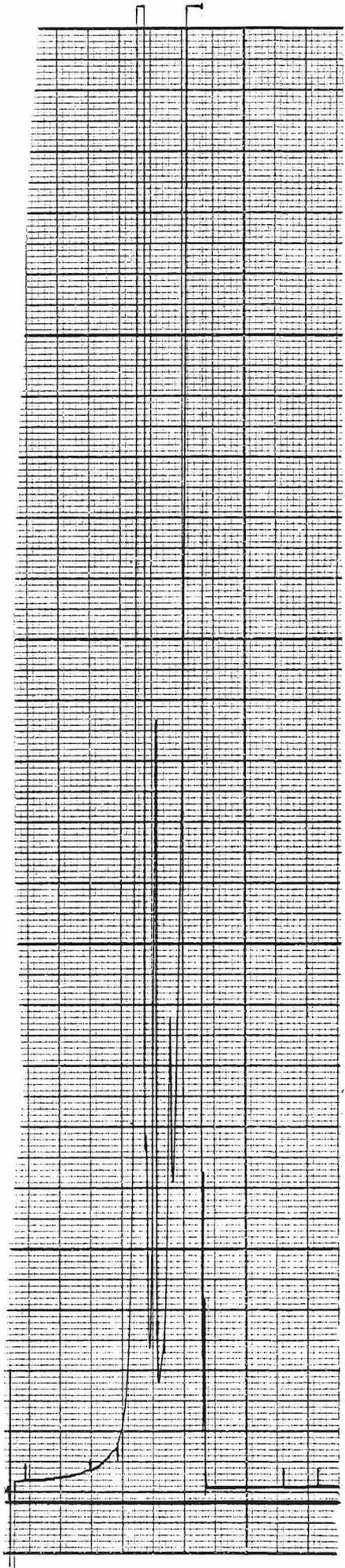


Figure 18 : Analyse de l'ether seul .

ICAP 10 DEL31		
PARAM INTEG 3		
	0355	
	0606	
TEMPS	SURFACE	CB
190	2218	T1
220	603	T1
256	2832	T1
284	11006512	SB
389	11093	T1
469	26631	T1
589	2266	T1
669	201911	Z1
784	50471	Z1
ANALYSE ECHANT 20		
REFERENCE 539		
PARAM CALCUL 3		
TEMPS	CONC	NO
190	166 0937	3101
256	239 7042	3102
389	253 3197	3002
469	469 5482	3003
589	36 5334	3004
784	986 0470	3005
	2151 2397	

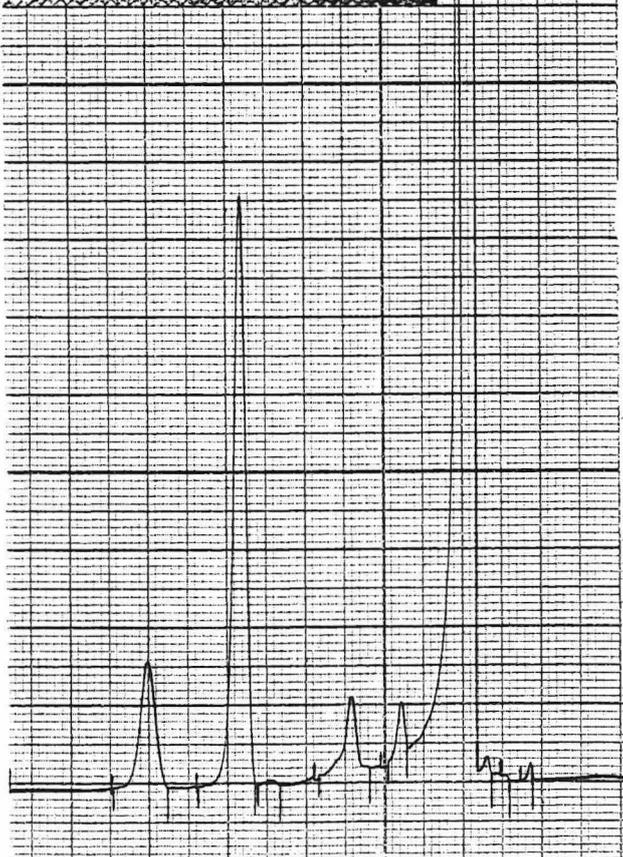


Figure 19 : Analyse du rhum dilué

ICAP 10 DEL31		
PARAM INTEG 3		
	0356	
	0606	
TEMPS	SURFACE	CB
191	1246	Z1
259	1209	Z1
286	10771771	SB
391	9526	T1
469	23763	T1
594	1775	T1
644	204359	Z1
789	46773	Z1
ANALYSE ECHANT 21		
REFERENCE 644		
PARAM CALCUL 3		
TEMPS	CONC	NO
191	92 1083	3101
259	101 1054	3102
391	215 1238	3002
469	413 9591	3003
594	23 2719	3004
789	779 3249	3005
	1629 9734	

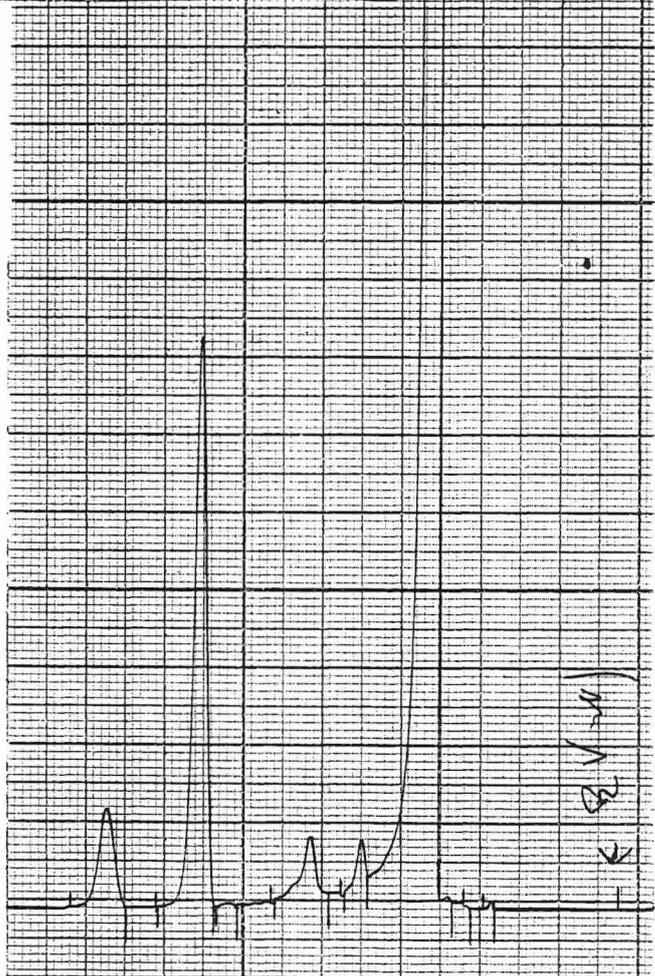


Figure 20 : Analyse de l'entrainement à la vapeur.

On ne constate pas de différence de comportement notable entre les alcools supérieurs, lors d'un entraînement à la vapeur. L'acétaldéhyde et l'acétate d'éthyle ne se retrouvent pas dans les concentrations initiales mais ces composés étant très volatils leur dosage n'est pas quantitatif. On considère donc le résultat obtenu comme satisfaisant et permettant de poursuivre l'étude jusqu'à la mise au point d'un protocole définitif. La répétabilité des résultats est l'objectif suivant.

Il a été décidé d'étudier la répétabilité des résultats au niveau de l'entraînement mais aussi au niveau du chromatographe. Pour ce faire, on a injecté deux fois de suite le même échantillon de rhum dilué. Ce même rhum a subi après l'ajout de l'étalon interne, deux entraînements à la vapeur. Les résultats sont présentés dans le tableau IX : les concentrations sont en 1/10 de ng/l

	R1	R2	R	EV1	EV2	R	% recueilli
101	182,14	173,98	178,06	164,88	163,84	164,36	92,3
102	82,31	64,27	73,29	85,47	34,75	85,12	116,1
002	255,94	240,13	248,03	262,11	261,72	261,91	105,5
003	475,77	508,21	491,99	552,99	540,04	546,51	111,01
004	34,62	29,14	31,88	31,76	35,17	33,46	104,9
005	932,54	883,73	911,13	937,70	938,80	938,34	102,0
Total	1763,35	1905,48	1934,41	2024,46	2035,93	2030,19	104,0

A la vue de ce tableau on constate une variation importante des résultats lors de l'injection d'un même échantillon et une augmentation de la concentration des alcools supérieurs. L'imprécision des résultats provient de plusieurs causes. En premier lieu, la quantité d'étalon interne introduite dans l'échantillon est sans aucun doute trop forte. Cette quantité a été calculée en fonction de la concentration en alcools supérieurs de rhum, or on travaille ici sur des solutions dix fois moins concentrées. Pour les mêmes raisons, la solution de référence de la méthode officielle de dosage des alcools supérieurs dans les eaux de vie ne convient pas au dosage de ces mêmes composés dans les rots fermentés. Enfin une étude statistique de traitement effectif permettra de savoir avec quelle précision sont obtenus les résultats.

- mise au point d'une nouvelle solution de référence :

- Solvant : Solution hydroalcoolique à 50°C 20/20 réalisée par den industrie
- Solutés :
  - butanol-2 25 ng/l
  - propanol-1 25 ng/l
  - isobutanol 50 ng/l
  - butanol-1 5 ng/l
  - méthyl-2 butanol-1 50 ng/l
  - méthyl-3 butanol-1 50 ng/l

A cette solution on ajoute l'étalon interne dans la proportion de 0,1 ml de la solution de méthyl-4 pentanol-2 à 5 ng/l pour 10 ml de la solution de référence. L'ensemble est injecté dans le chromatographe. Le chromatogramme obtenu (fig. 21) est difficilement exploitable et la précision des résultats est constatable à fait de l'importante

traînée du pic d'éthanol. Des changements de sensibilité sur le chromatographe et sur l'enregistreur n'ont pas permis d'améliorer ces résultats.

ICM 1000 DELTA  
 PARAM 000000  
 TEMPS 00  
 4670  
 5000 T1  
 5077 T1  
 5414 T1  
 476 50118 T2  
 504 4272 T1  
 504 10000 T1  
 504 48903 T1  
 ANALYSE ECHANT 03  
 REFERENCE 000  
 PARAM 000000  
 TEMPS CONC. NO  
 471 210.4312 3000  
 493 210.5490 3000  
 475 670.7010 3000  
 484 85.5025 3000  
 499 11040.7100 3000  
 499 670.7010 3000

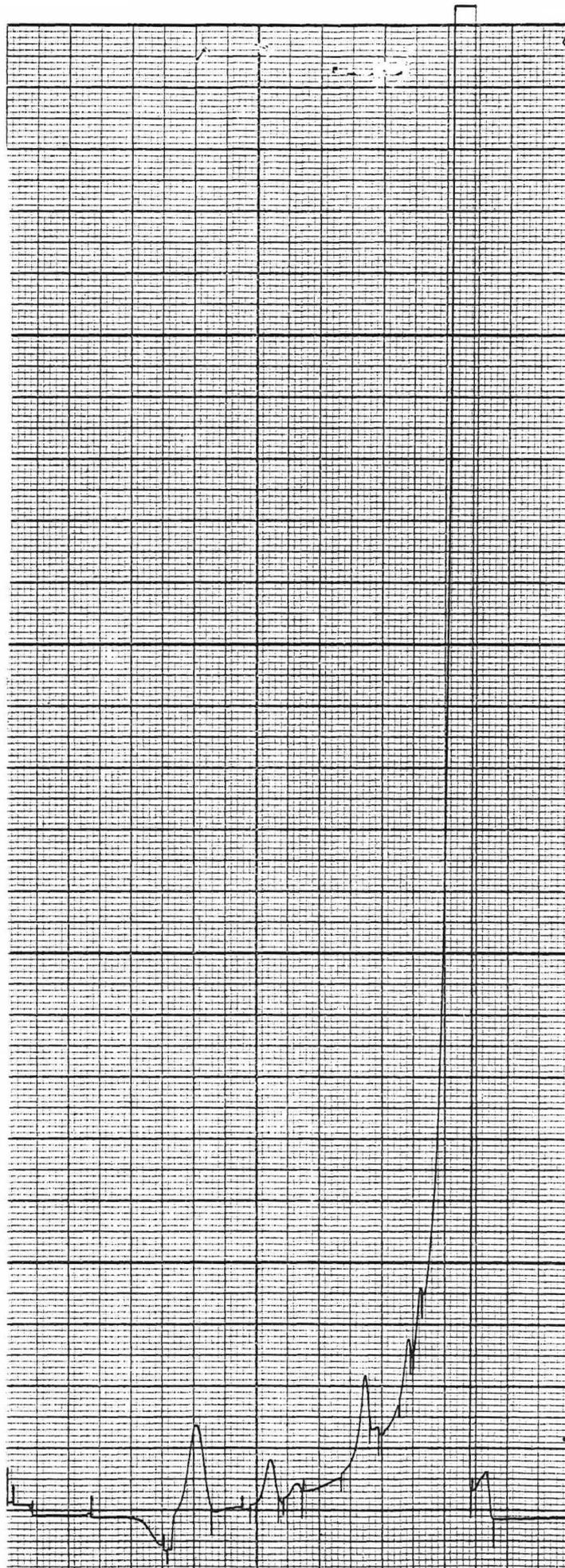


Figure 21 : Analyse de la nouvelle solution de référence.

Il a donc été décidé de réaliser la solution non plus dans de l'éthanol à 50°GL mais dans de l'éthanol à 7°GL. Cela devrait réduire la trainée due au pic d'éthanol et permettre une meilleure exploitation des chromatogrammes. Les concentrations des différents alcools restent les mêmes, ainsi que celle de l'étalon interne. Le chromatogramme obtenu est présenté figure 22.

PARAM INTÉGR 30

0000

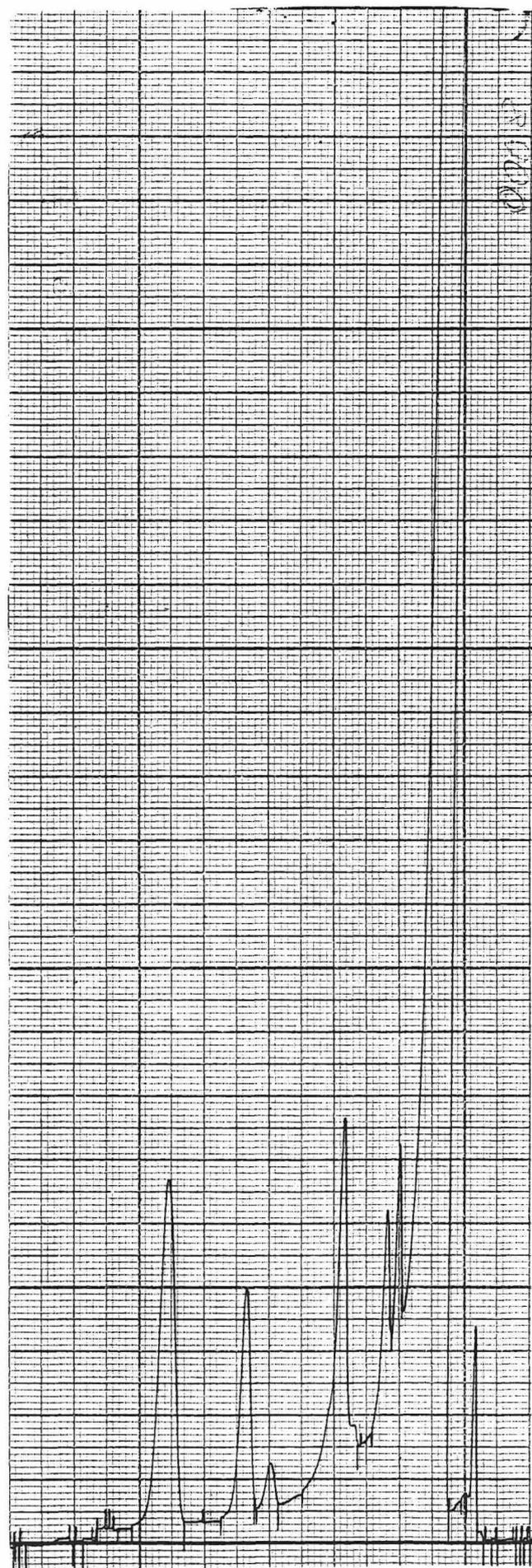
2200

NUMPS	SL	CB
000		T1
001	373498	S1
002	3250	T1
003	5928	T1
004	272182	T1
005	87464	T1
006	159778	T1
007	384837	T1

ANALYSE ELEMENT. 09

REFERENCE 1 A 658

NUMPS	SL	CB
001	124	3001
002	12	3002
003	55	3003
004	80	3004
005	1852	3005



La sensibilité du chromatographe a été multipliée par 10.  
 La vitesse de défilement est de 5mm/mn.

Figure 22 : Solution de référence dans l'éthanol à 7°GL.

Les concentrations obtenues lors des deux injections précédentes n'avaient pas de signification, les coefficients de réponses utilisés par l'intégrateur n'ayant pas été calculés pour ces solutions de références. Le chromatogramme étant satisfaisant on peut faire calculer ces coefficients par l'intégrateur, selon la méthode décrite en annexe 1 (p.3). Les résultats sont dans le tableau X. Les coefficients sont dans la colonne KC.

PARAM CALCUL 3

	NC	TC	KC	QC
butanol-2-----	001	365	1658	250
propanol-n-----	002	385	1211	250
isobutanol-----	003	465	486	500
butanol-1-----	004	590	515	50
alcools supérieurs-----	005	780	740	1000
acétaldéhyde-----	101	185		150
acétate d'éthyle-----	102	250	17306	1000
alcool allylique-----	201	540		

X

Tableau X : Coefficient de réponse des alcools supérieurs

Il a ensuite été réalisée une solution d'acétate d'éthyle pour déterminer le KC de ce constituant. Le KC obtenu est :  $KC = 2420$ .

En relation avec les problèmes posés par la trainée du pic d'éthanol lors du premier essai, il a été supposé que les coefficients de réponses pouvaient varier si on mettait en présence tous les composants de la solution de référence (acétaldéhyde, acétate d'éthyle, alcools supérieurs, étalon interne). Cette hypothèse s'est vérifiée comme on peut le voir dans le tableau XI.

PARAM CALCUL 3

	NC	TC	KC	QC
001	365	1632	250	
002	385	1350	250	
003	465	561	500	
004	590	646	50	
005	780	915	1000	
101	185	2396	1000	
102	250	1350	2000	
201	540			

V

Tableau XI : Coefficients de réponses des constituants de la solution de référence.

Une conservation pendant deux semaines de la solution induit une détérioration non négligeable de celle-ci (figure 23). Les très faibles concentrations employées en sont

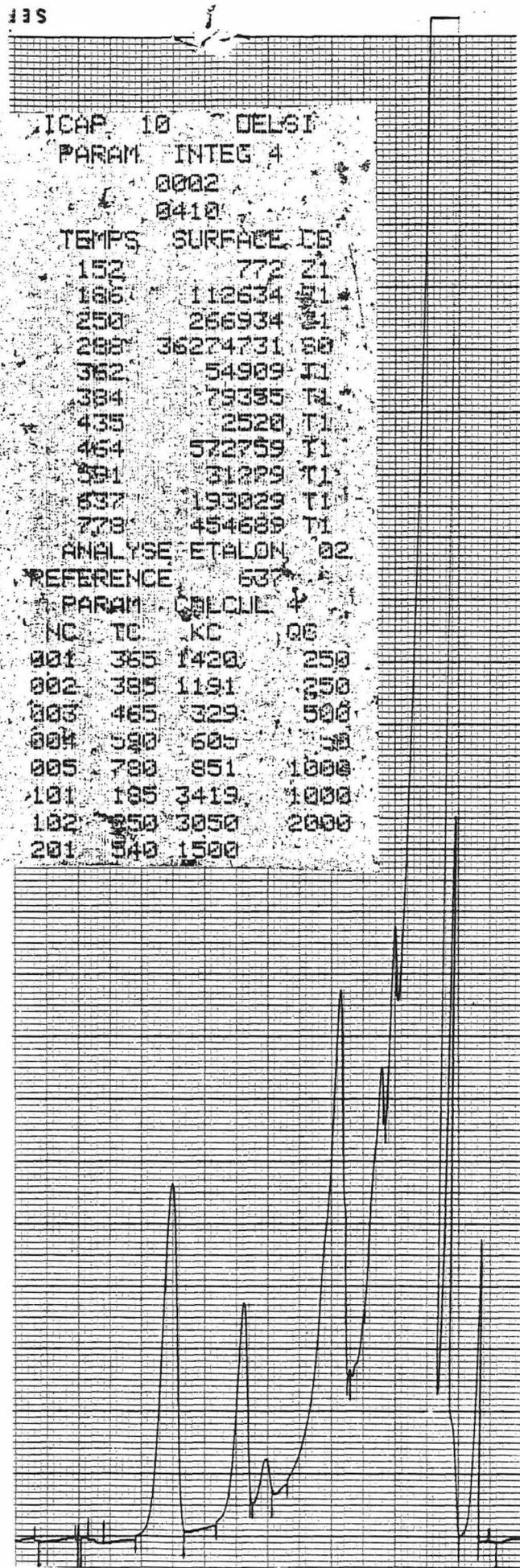


Figure 23 : Etude du vieillissement de la solution de référence.

sans doute responsables. La détérioration touche surtout l'acétaldéhyde et l'acétate d'éthyle dont on a vu que le dosage n'était jamais quantitatif. Malgré tout il reste souhaitable de réaliser une nouvelle solution de référence pour chaque série d'échantillon à doser.

Après la mise au point de cette solution de référence pour le dosage de l'alcool supérieur, la partie terminale de cette étude sera consacrée à la détermination statistique de la précision des résultats. Une étude selon la méthode donnée en annexe (p.13) (9), a été réalisée sur un échantillon de rhum dilué. On a d'abord cherché la précision de réponse du chromatographe, puis la précision de la technique de traitement des échantillons. Le nombre de mesure effectuées est de 11 pour le rhum dilué et de 10 pour les entraînements à la vapeur.

- $\bar{x}$  : moyenne des mesures effectuées en ng/l
- $\Delta^2$  : variance
- $\Delta$  : écart-type
- $\Delta_m$  : écart-type moyen
- $100 \times \frac{\Delta t}{\bar{x}}$  : précision d'une mesure
- $100 \times \frac{\Delta_m t}{\bar{x}}$  : précision de la méthode

	$\bar{x}$	$\Delta^2$	$\Delta$	$\Delta_m$	$100 \times \frac{\Delta t}{\bar{x}}$	$100 \times \frac{\Delta_m t}{\bar{x}}$
101	9,43	0,085	0,29	0,092	6,8%	2,1%
102	11,35	0,87	0,93	0,29	18%	5,6%
002	39,85	0,56	0,75	0,23	4,1%	1,3%
003	32,49	2,08	1,44	0,45	9,8%	3,1%
004	1,59	0,006	0,081	0,025	11,35%	3,5%
005	115,77	0,94	0,97	0,306	1,8%	0,6%
Total	210,51	6,0	2,45	0,806	2,6%	0,8%

Tableau XIII : Calcul d'erreur sur le chromatographe t=2,228

Il ressort de cette étude que la précision de chaque mesure du chromatographe est de l'ordre de 10%. Une seule exception est supérieure à cette valeur, il s'agit de l'acétate d'éthyle. Comme le dosage de ce composé n'est pas quantitatif, la précision obtenue n'a pas grande signification. L'erreur sur la méthode est de l'ordre de 3% ce qui est très satisfaisant.

Le tableau XIII donne le résultat de l'étude statistique du traitement de l'échantillon.

Tableau XIII : Calcul d'erreur sur le traitement de l'échantillon

	$\bar{x}$	$\Delta^2$	$\Delta$	$\Delta_m$	$\frac{\Delta t}{\bar{x}} \times 100$	$\frac{\Delta_m t}{\bar{x}} \times 100$	%recueil
101	9,11	0,042	0,205	0,068	5%	1,6%	96,6
102	10,53	0,008	0,31	0,103	6,6%	2,2%	92,7
002	41,14	0,95	0,97	0,323	5,0%	1,7%	103,2
003	33,42	1,65	1,28	0,426	8,6%	2,3%	102,8
004	1,63	0,003	0,057	0,019	5,0%	2,6%	102,5
005	116,66	0,27	0,52	0,373	1%	0,3%	100,7
Total	212,55	5,2	2,28	0,76	2,4%	0,8%	100,2

L'erreur sur une mesure est de 5 à 8 %, alors que l'erreur sur la méthode n'excède pas 3 %. Ces résultats sont très satisfaisants, puisqu'ils sont meilleurs que ceux obtenus lors de l'étude du chromatographe seul. La différence peut sans doute être attribuée à la qualité de l'injection qui va en s'améliorant au fil de la journée. Les pourcentages d'alcool recueilli sont curieusement supérieurs à 100 %. Cela peut peut-être s'expliquer par une petite différence de comportement entre l'étalon interne et les alcools supérieurs. Cette différence n'est guère gênante compte tenu de la bonne répétabilité de la manipulation et de la faiblesse de l'écart observé.

L'ensemble de la méthode de dosage des alcools supérieurs dans les moûts fermentés est donc au point. On recueille les alcools par entraînement à la vapeur et le distillat est ensuite passé dans le chromatographe selon la méthode décrite ci-dessus. La station utilisera cette méthode dans l'avenir. Elle est résumée en annexe 1 (p.9). On trouvera en annexe 2 les chromatogrammes et les fiches d'intégration correspondant aux études statistiques.

## II) Production de levures à teneurs en sucres de réserve différentes

La station de Biotechnologie des fruits et des légumes souhaite étudier dans un avenir proche, l'effet de la teneur en sucres de réserve des levures sur la fermentation, et en particulier sur la production de composés de saveur. Pour cela elle désire disposer de lots de levures dont la seule différence sera la teneur en sucres de réserve, principalement en glycogène et en tréhalose. Le stockage modifie la concentration intracellulaire de ces sucres, mais il modifie aussi l'ensemble des caractéristiques physiologiques de la souche. Q'AIN et ses collaborateurs ont mis au point une méthode permettant la réalisation des lots souhaités, mais sur levures de brasserie. Ils utilisent la propriété que les levures de bières sélectionnées fermentent préférentiellement le maltose plutôt qu'un autre sucre (26). Les recherches de la station se sont aussi orientées vers l'utilisation différentielle de plusieurs sucres. Les levures de rhum n'ayant pas subi de sélection préalable, elle n'ont pas de raison d'utiliser le maltose préférentiellement. L'étude des voies métaboliques montrent qu'il existe une étape supplémentaire dans la dégradation du fructose par rapport à celle du glucose (10). Cela peut influencer la biosynthèse des sucres de réserve. On cherchera à vérifier cette hypothèse. Au préalable, il faut mettre en évidence la présence de tréhalose dans les levures de rhum et se familiariser avec les techniques d'extraction du tréhalose et du glycogène. Les essais ont été menés sur deux souches de levures *Saccharomyces cerevisiae*, la souche 493 de la collection de la station et la souche industrielle IAF. Le milieu de culture utilisé est toujours le milieu Malt Wickerham décrit en annexe 1 (p.16). Les seules variations apportées à ce milieu concernent la nature et la concentration du ou des sucres présents.

### 1) Dosage du tréhalose et du glycogène intracellulaire.

Les premiers essais ont eu lieu avec la souche IAF plus rapide en croissance. Un pied de cuve est réalisé dans 10 ml de milieu Malt Wickerham (MW) contenant 10 g/l de glucose comme source de carbone. Ce pied de cuve sert ensuite à l'ensemencement stérile d'un erlen de 500 ml contenant 200 ml de milieu MW autoclavé

à 118°C pendant 20 mn et contenant 30 g/l de glucose. La croissance s'effectue à température ambiante sur une table agitante durant 12 H. Les cellules sont recueillies par centrifugation à 3000 rpm, lavées et reprises dans 25 ml d'eau physiologique. On dose la matière sèche par dessiccation au four à 105°C pendant 12 H sur une partie aliquote. Parallèlement on extrait le glycogène selon la méthode de BECKER (3) décrite en annexe 1 (p.17) et le tréhalose selon la méthode de TREVELYAN également décrite en annexe 1 (p.18). Après hydrolyse de ces deux sucres le glucose produit est dosé enzymatiquement grâce aux kits de dosages BOEHRINGER (annexe 1 p.19). Cette expérimentation n'a pas eu de résultat, les kits de dosage du glucose ayant été détériorés par un stockage non conforme. Cela est un problème interne à la station grave car à la suite de nombreuses pannes de courant, la conservation de nombreux produits stockés en chambre froide s'est trouvée compromise.

Une expérience identique a été refaite, mais en utilisant la souche 493 de la station. Le dosage du glucose a été fait avec un kit neuf. Deux erlens contenant 200 ml de milieu MW ont été ensemencés et un dosage de tréhalose et deux de glycogène réalisés sur chacun d'eux. Chaque dosage du glucose a été fait en double. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant, les données relatives aux tréhalose sont dans les colonnes T1 à T4, celles relatives au glycogène dans les colonnes G1 à G8.

	B	T1	T2	T3	T4	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
matière sèche	0	54,8	54,8	56,5	56,5	51,8	51,8	51,8	51,8	56,5	56,5	56,5	56,5
A1	0	0	0	0	0	0,01	0,01	0,01	0,015	0,01	0,015	0,015	0,025
A2	0	0,13	0,13	0,19	0,19	0,065	0,05	0,042	0,035	0,042	-	0,042	-
C 5/1	0	0,112	0,112	0,164	0,164	0,047	0,034	0,027	0,017	0,027	-	0,036	-
C 5/5 de levure	0	0,025	0,025	0,036	0,036	0,015	0,011	0,009	0,0056	0,009	-	0,013	-

Tableau XIV : Extraction de tréhalose et de glycogène.

Il semble que l'hydrolyse du glycogène ne soit mal déroulée, les concentrations trouvées étant bien inférieure à celles attendues. La concentration maximale trouvée est de 1,3% du poids sec de la levure, or la littérature donne des pourcentages minima de 6 à 10% environ (12,26). Il est possible que l'amyloglucosidase utilisée ait subi des dommages au stockage. Compte tenu des possibilités d'approvisionnement en Guadeloupe, il est impossible de s'en procurer d'autre dans de bref délai et elle sera réutilisée.

Cette expérience permet de mettre en évidence la présence de tréhalose dans les levures de rhumerie. La concentration en ce sucre est de l'ordre de 3% du poids sec de la levure ce qui concorde avec les données de la littérature pour les levures de bière (12).

Malgré ce test positif, il a été convenu d'abandonner le dosage enzymatique du glucose au profit d'un dosage chimique. Le dosage enzymatique est considéré comme trop coûteux et présentant des problèmes de stockage en Guadeloupe où la distribution de courant électrique n'est pas fiable. La méthode de dosage chimique choisie est la méthode

phénol-sulfurique (SMITH et Coll). Elle est décrite en annexe 1 (p.20). Une étude statistique de cette méthode a donnée les résultats suivants :

Nombre de mesures n :	20
Moyenne des mesures $\bar{x}$ :	0,172
Variance :	0,0001191
Ecart-type :	0,0109133
Ecart-type moyen :	0,00315
Précision d'un résultat :	13,96 %
Précision de la méthode :	4 %

Cette précision a été jugée suffisante pour poursuivre les essais d'extraction de sucres de réserves. Malgré les mauvais résultats obtenus pour le glycogène, la manipulation n'a pas été reprise, faute de temps, les problèmes d'électricité retardant beaucoup les manipulations.

## 2) Essai de réalisation de levures à différentes teneurs en sucres de réserves.

Comme précédemment des pieds de cuve ont été réalisés dans 10 ml de milieu MW à 10 g/l de glucose qui ont servis à ensemencer trois erlens de 200 ml de milieu MW à 30 g/l de glucose. Ces erlens ont été mis sur table agitante à température ambiante pendant 24 H. Les levures furent recueillies par centrifugation, lavées et reprises dans de l'eau physiologique. Les trois lots de levures ont été rassemblés dans un volume total de 50 ml. Un dosage de matière sèche, une extraction de tréhalose et de glycogène ont permis de définir l'état physiologique de ces levures qui vont servir à ensemencer 5 milieux MW à 100 g/l de glucose et 5 milieux à 90 g/l de fructose et 10 g/l de glucose. Les milieux glucose sont référencés G1 à G5 et les milieux fructose F1 à F5. Le taux d'ensemencement choisi est 10 cellules/ml, ce qui correspond à environ 1 ml de solution après comptage sur cellule de THOMA. Ces milieux, une fois ensemencés, ont été mis à l'étuve à 30°C sans agitation pendant 96 H. En fin de fermentation, déterminée par cliniter, les levures ont été récupérées suivant le protocole habituel, dans 25ml d'eau physiologique. On procède à un dosage de matière sèche et aux extractions de tréhalose et de glycogène. Un dosage d'azote intracellulaire est également réalisé. L'ensemble de résultats apparaît dans le tableau XV. Les colonnes PC correspondent aux dosages effectués sur les précultures agitées. La ligne "dilution" donne la dilution opérée sur l'hydrolysat de sucre pour effectuer le dosage. La ligne "C mg/l" donne la concentration en glucose de l'hydrolysat de sucre. La ligne "C initiale g/l" donne la concentration de la suspension de levure en glucose. La ligne "g/g de lev." donne la fraction pondérale que représente le sucre dosé dans la levure. Enfin, la ligne "N g/g de lev." donne la fraction pondérale que représente l'azote dans la levure.

	Pc				Pc				F1				F2				F3				F4				F5											
01.5	57,6				57,6				41,1				45,8				49,6				45,9				41,1											
	G		T		G		T		G		T		G		T		G		T		G		T		G		T									
Dilution	20	40	5	4	20	40	5	4	20	40	5	4	20	40	5	4	20	40	5	4	20	40	5	4	20	40	5	4	20	40	5	4	20	40	5	4
A.D.O	1,23	0,80	0,51	0,70	1,28	-	0,51	-	-	0,61	0,26	0,28	1,18	0,74	0,28	0,39	1,28	0,73	0,27	0,34	1,28	0,70	0,34	0,44	1,18	0,18	0,30	0,40	1,18	0,18	0,30	0,40				
Eng/P	1398	85,1	54,2	74,4	1391		59,4			64,9	276	297	1255	79,7	29,8	44,5	1362	77,6	28,7	36,2	1362	74,4	36,2	46,8	1255	59,4	31,9	42,5	1255	59,4	31,9	42,5				
C <sub>initial</sub> g/P	52,6		7,1		47,6		7,2		45,4		3,21		49,5		3,93		50,9		3,62		49,8		4,6		39,8		4,1									
g/g Per	0,91		0,12		0,82		0,12		1,10		0,08		1,08		0,09		1,02		0,07		1,08		0,10		0,96		0,10									
N <sub>2</sub> g/g Per	-		-		-		-		0,046		0,062		0,062		0,062		0,046		0,046		0,050		0,050		0,050		0,050									
	G <sub>1</sub>				G <sub>2</sub>				G <sub>3</sub>				G <sub>4</sub>																							
01.5	38,7				41,8				38,2				38,9																							
	G		T		G		T		G		T		G		T																					
Dilution	20	40	5	4	20	40	5	4	20	40	5	4	20	40	5	4																				
A.D.O	0,98	0,56	0,25	0,33	1,18	0,58	0,37	0,43	1,18	0,70	0,34	0,44	1,08	0,78	0,27	0,37																				
Eng/P	1242	59,6	26,6	35,1	1255	61,7	33,4	45,7	1255	74,4	36,2	46,8	1149	83,0	28,7	36,2																				
C <sub>initial</sub> g/P	33,1		3,41		43,5		4,74		48,0		4,6		49,1		3,6																					
g/g Per	1,01		0,09		1,04		0,11		1,25		0,12		1,26		0,09																					
M <sub>2</sub> g/g Per	0,052		0,047		0,047		0,047		0,048		0,048		0,053																							

Dans ce tableau, il apparaît clairement que les résultats concernant le glycogène sont tous erronés. Des teneurs cellulaires fantaisistes de plus de 100 % ont trouvées. Il semble donc que la technique d'extraction soit assez mal maîtrisée. Il se peut toutefois que ces résultats soient des artefacts dûs à des conditions de stockage des échantillons déplorables et à un temps de manipulation trop long. Faute de pouvoir l'affirmer la manipulation est à reprendre dans son ensemble en s'attachant à être particulièrement soigneux lors des dilutions ou autres pratiques propices à l'erreur. Il ne sera hélas pas possible dans le temps restant à passer à la station de reprendre l'expérience.

Le résultat concernant le tréhalose paraît plus plausible. Les concentrations observées sont de l'ordre de 10 % et proches de celles qu'on pouvait s'attendre à avoir après une croissance anaérobie. Si l'on accorde confiance à ces résultats on constate qu'aucune différence de synthèse du tréhalose n'est décelable que les levures poussent sur milieu glucosé ou sur milieu fructosé. A moins que la synthèse du glycogène ne soit fortement influencé par ces substrats, il faudra s'orienter vers d'autres sucres pour réaliser ces levures à différents niveaux de sucres de réserves. Le saccharose reste une possibilité bien que son utilisation préférentielle à celle du glucose paraisse douteuse. C'est peut être en s'orientant vers d'autres substrats que les sucres comme les acides aminés glucoformateurs qu'on trouvera la solution.

Les résultats du dosage d'azote donne comme teneur moyenne de ces levures, 5 % du poids sec de la levure en azote. Ces résultats concordent avec ceux de FAHRMANN (3) bien que PAFFAIT signale une teneur de 3,5 % du poids sec de la levure pour l'espèce Sacch. cerevisiae (19). La production de biomasse trouvée ici est de 5 g/l alors que FAHRMANN trouve pour la même souche une production de 7 g/l. La biomasse produite est légèrement plus faible sur milieu glucosé que sur milieu fructosé. La même quantité de sucre ayant été consommé dans le même temps on peut conclure à une meilleure activité métabolique de levure sur milieu glucosé.

L'accomplissement de l'objectif n'a donc pu être atteint, mais le bilan de la manipulation n'est pas négatif. On a pu mettre en évidence la présence de tréhalose dans les levures de rhubarbe et mettre à jour certaines carences de la station en matière de dosage, en particulier de dosage des sucres. Enfin, le fait qu'aucune différence de synthèse de tréhalose n'ait été obtenue entre le milieu glucosé et le milieu fructosé est un résultat intéressant.

### III) Problèmes rencontrés

Les problèmes rencontrés sont tous d'ordre matériel. Ils sont dus au fait que la station, lors de sa construction a subi un vice de fabrication au niveau du système électrique. De là, découlent les pannes qui ont affecté la station et provoqué l'interruption de la distribution de courant. Lors de l'arrivée des stagiaires le courant n'était pas rétabli officiellement même si quelques prises fonctionnaient. Tout le personnel de la station devait donc travailler sur ces quelques prises. Celle-ci étaient surchargées avec le inconvénient que cela comporte. De nombreux appareils ont tombé en panne, si bien que le travail a été très ralenti sur l'ensemble de la station.

Pour remédier à cet état de fait, la décision d'une réfection du système électrique a été prise. Durant les 15 jours des travaux tout travail était pratiquement impossible à cause des poussières et des fils traversant la station. Ces problèmes électriques n'ont pas eu que cette influence directe sur le travail de la station, ils ont aussi causés la détérioration de nombreux produits conservés à la chambre froide. Ils sont sans doute aussi responsables d'une évolution néfaste d'échantillons stockés. A ces problèmes, déjà importants venaient s'ajouter ceux inhérent au travail de laboratoire en Guadeloupe. La distribution de courant électrique dans ce département est soumise à quelques "irrégularités", qui amènent beaucoup d'organismes à posséder leur propre groupe électrogène. Le C.P.A.A.C. possède le sien, mais du fait que sa mise en route ne peut être instantanée, certaines manipulations sont ratées à cause d'une simple coupure de courant. L'eau connaît aussi quelques ennuis de distribution mais beaucoup moins importants. Par contre les réparations d'appareils sophistiqués comme les chromatographes en phase vapeur présentent de sérieuses difficultés. Il est nécessaire de les envoyer en France (métropolitaine) pour en assurer la bonne réparation. Cela demande des délais très longs et est source de ralentissement du travail. L'approvisionnement en produits de laboratoire est aussi très long, la plupart des produits venant de France (toujours métropolitaine). Tous ces arrangements ont provoqués un relatif découragement de stagiaires et je remercie Mr PARFAIT de nous avoir aidés à le surmonter. Toute l'équipe de la station a fait preuve d'énergie et de compréhension pour permettre à ses cinq stagiaires de mener à bien leurs études. Il faut souligner la bonne entente régnant au C.P.A.A.C. qui permet aux stations de pallier aux difficultés d'approvisionnement par une entraide mutuelle. Enfin, comme problème on peut souligner aussi le manque de coordination dans la transmission de l'information qui règne à la station de biotechnologie du C.R.A.A.C. Il est dû à un manque de personnel permanent mais, est en passe d'être résolu, par l'utilisation d'un mini ordinateur en particulier.

#### IV) Conclusion générale

Ce stage représente à la fois une expérience scientifique et une aventure humaine. Un étudiant antillais qui rentre dans la vie professionnelle en Guadeloupe après une formation dans une université métropolitaine se trouve confronté à de nombreux problèmes qui ont été évoqués en partie ici.

Le programme de recherche sur le rhum existe depuis bientôt dix ans et il reste pourtant beaucoup à faire, si on compare la rhumerie à une industrie de pointe comme la brasserie. Il est heureux compte tenu de la place que tient le rhum dans son économie et son folklore que la Guadeloupe soit le fer de lance de ce programme.

A travers ce stage j'ai abordé deux problèmes essentiels. L'un est lié aux techniques d'analyse, l'autre à la définition d'une opération de recherche. Si les méthodes d'analyse chromatographique des alcools supérieurs sont connues, la préparation de l'échantillon pose un problème. Mes résultats permettent grâce à une préparation adéquate de faire un bilan d'une fermentation en analysant le moût le moût fermenté, le distillat et le résidu de distillation (vinasse). En ce qui concerne l'opération de recherche de nombreux travaux ont été accomplis à la formation des alcools supérieurs.

L'effet bouche et l'effet pâte ont ainsi pu être mis en évidence. Dans la nouvelle approche qui se fonde sur les travaux de POE, on prend en considération l'état physiologique dans lequel se trouve l'agent de fermentation. Dans la station du C.R.A.A.G. on cherche à caractériser cet état physiologique par le contenu des levures en sucres de réserves. J'ai donc été confronté dans cette partie de mon travail à la formulation d'une nouvelle voie de recherche. L'expérimentation n'a pas été un franc succès mais elle ouvre la voie à d'autres plus complètes. Sur le plan personnel, elle m'aura appris à avoir plus de méthode dans mes recherches.

En conclusion je considère mon stage comme positif sur un plan strictement personnel. Je souhaite qu'il l'ait aussi été pour la station qui m'a accueilli. Je remercie chacun de ses membres pour cet accueil chaleureux, bien que j'espère pouvoir un jour renouveler ces remerciements de vive voix.

ANNEXE 1

Dosage de l'azote : Méthode de KJELDAHL

Principe : A l'aide d'acide sulfurique pur et d'un catalyseur, on minéralise l'azote intracellulaire sous forme de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , qu'on titrera ensuite par un acide de normalité connue.

Réactifs :

-Catalyseur :	$\text{K}_2\text{SO}_4$	130 g
	Selenium	2,5 g
	$\text{CuSO}_4$	15 g
	HgO rouge	2,5 g

-NaOH : 30 % (pds/vol) contenant 5 % (pds/vol) de thiosulfate de sodium.

- $\text{H}_2\text{SO}_4$  pur

-NaOH N/100

-HCl N/40

-Indicateur coloré de tashiro

Matériel : Ranpe à minéraliser

Appareil d'entraînement à la vapeur

Hotte aspirante

Matras à minéralisation

Réalisation :

- Minéralisation : mettre dans un matras 3 g de catalyseur, 2 ml d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  et 1 ml de la suspension de levure à doser. Chauffer sous la hotte aspirante en veillant à éviter le débordement du matras. La minéralisation est terminée lorsque le matras ne contient plus qu'un liquide bleu turquoise en ébullition légère. Une minéralisation dure environ 2 h .

- Titration : 1) Distiller 14 ml de soude 30 % à la vapeur. On recueille le distillat par barbottage dans 20 ml d'HCl N/40 pendant 5 mn puis pendant 1 mn sans barbottage. Titrer ensuite le distillat par NaOH N/100. Le volume de titration doit être de 50 ml.

2) Distiller ensuite le mélange NaOH 30 % plus minéralisat, en introduisant dans l'appareil d'entraînement à la vapeur d'abord le minéralisat puis NaOH. On recueille le distillat comme ci-dessus. Titrer par la soude

N/100, noter le volume de titration. Ce volume doit être inférieur à 50 ml.

La différence de volume de soude utilisée correspond à la quantité d'acide titré par le  $\text{NH}_4\text{OH}$  libéré lors de la distillation. La quantité d'azote intracellulaire se

calcule comme suit :

N1 titre de la suspension de levure en eq OH / l : inconnu

V1 volume de la prise d'essai

N2 titre de la soude N/100 eq OH/l

V2 (volume du blanc - volume de l'essai) =  $\Delta V$

Le titre de la suspension de levure N1 est donné par l'équation :

$$N1 \times V1 = N2 \times V2$$

d'où

$$N1 = N2 \times V2 / V1$$

Dans le cas présent du titrage de l'azote sous forme de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 1 eq OH est obtenu pour un eq N. La masse molaire de l'azote étant de 14 g on obtient X la quantité d'azote intracellulaire par l'équation suivante :

$$X = \frac{N2 \times V2 \times 14}{V1}$$

le résultat est obtenu en g/l si tous les volumes sont exprimés en ml

Dosage des alcools supérieurs dans les eaux de vie.

Principe : Dosage par chromatographie en phase gazeuse avec étalon interne

Matériel : Chromatographe en phase gazeuse GirdeL série 3000

Colonne: inox avec phase stationnaire 10 % PEG 1540 sur chromosorb WAW 60/80me

long: 7,50 m diamètre 1/8 de pouce (3,17 mm)

Conditions de travail : Gaz vecteur N<sub>2</sub> pression au chromatographe 2,5

H<sub>2</sub> pression 1.6

Air pression 2,2

Température Injecteur 150°C

Four 90°C

Détecteur 150°C

Réglage électromètre Sensibilité 1

Polarisation 230 V

Sortie intégrateur 0,1 V

Atténuation 1

Intégration : Intégrateur Delsi Icap 10

Paramètres de calcul et d'intégration

donnés dans les feuilles suivantes.

Atténuation 64

Enregistrement : enregistreur Servotrace type PE

(TEFRAM- Paris)

vitesse 5 ou 10 mm/ mn

Préparation de la solution de référence :

Solvant : Solution hydroalcoolique à 50°CGL 20/20.

Solutés : butanol-2 125 mg/l

propanol-n 125 mg/l

isobutanol 500 mg/l

butanol-1 62,5 mg/l

methyl-3 butanol-1 625 mg/l

methyl-2 butanol-1 625 mg/l

acétaldéhyde 25,8 mg/l

acétate d'éthyle 250 mg/l

A cette solution de référence on ajoute l'étalon interne, le méthyl-4 pentanol-2 dans la proportion de 0,5 ml d'une solution de méthyl-4 pentanol-2 à 5 g/l dans 5 ml de solution de référence. Le volume final est donc de 5,5 ml.

Le volume d'injection est de 1  $\mu$ l

Calcul des coefficients de réponses : Ces coefficients sont déterminés à partir de la solution de référence et pour chaque composé à doser

Soient QC et SC la concentration et surface du pic pour le constituant à doser, QI et SI ceux de l'étalon interne, QA la quantité de l'analyse et KX un coefficient multiplicatif. Le coefficient de réponse du constituant à doser est donné par la formule

$$KC = \frac{QC \times SI}{SC \times QI} \times QA \times KX \times 10^x$$

Une fois les coefficients déterminés pour tous les constituants, on peut les doser dans toutes les solutions où l'étalon interne est présent. On obtient la concentration par la formule :

$$C = \frac{QI}{SI} \times SC \times KC \times \frac{KD \times 10^D}{QA \times KX \times 10^x}$$

Cette formule est valable pour une injection de 1  $\mu$ l d'échantillon où l'étalon interne a été ajouté dans les mêmes proportions que dans la solution de référence.

La programmation de l'intégrateur est telle que les concentrations apparaissent en 1/10 ng/l.

# Tableau de Paramètres d'Intégration N°2

Valeurs Initiales				VALEURS				PARAM	SIGNIFICATION			
Tab 1	Tab 2	Tab 3	Tab 4									
NA et NI sont les valeurs introduites par l'opérateur								NA	Numéro d'Analyse +1 à chaque analyse			
								NI	Numéro d'Identification. Se modifie seulement sur l'opérateur			
4	8	16	4				8	LP	Largeur du Pic la plus étroite à mi-hauteur. Exprimé en Secondes			
ST1		ST 3		ST2		ST. 1			N° des Sous Tableaux à utiliser pour l'analyse			
3 8					5		5	SP	définit la Sensibilité de Penté			
5 0					3			LB	Ligne de Base			
3					2		3	CT	Critère de Tangence. Définit la largeur minima des grands pics			
200					500		500	SM	Surface Minimale			
9999					1000		1000	HG	Hauteur de Groupement HG = H/10			
Tableau n°4 initialisé pour fonctionnement du TEST					280		100	DI	Délai d'Intégration			
										1T	1 <sup>er</sup> Temps auquel LP est x 2 (unité du chronomètre)	
											2T	2 <sup>em</sup> Temps auquel LP est encore x 2 (unité du chronomètre)
											1E	temps de C <sup>de</sup> Ext n°1 (unité du chronomètre)
											2E	temps de C <sup>de</sup> Ext n°2 (unité du chronomètre)
								1000		280	TF	Temps de Fin de Sous Tableau ou de fin d'Analyse (unité au chrono)

$$\text{Sensibilité de pente} = \frac{2 \text{ SP} \cdot 1}{\text{LP}} \times \frac{\text{Unité de H}}{10} \Rightarrow \frac{2 \text{ SP} \cdot 1}{\text{LP}} \mu\text{V/s en CPG}$$

$$\text{Temps de réflexion pour reconnaissance de la ligne de Base} = \frac{\text{LB}}{10} \times \text{LP} \text{ secondes}$$

$$\text{Largeur minimale (à la base) des grands pics} = 2 \cdot \text{CT} \times \text{LP} \text{ secondes}$$

### Cas Particuliers

- SP=0 CT=0 découpage en tranches" ⇒ Largeur des tranches = LP en  $\frac{1}{10}$  seconde
  - SP≠0 CT=8 mesure de hauteur des pics en  $\frac{\text{Unité de H}}{10}$
  - CT=9 Pas de détection de Grands Pics (CT équivalent à ∞)
  - LB=9 Pas de reconnaissance de ligne de base (LB équivalent à ∞)
- Tous les pics sont intégrés par rapport à une ligne de base fixe. Début

# Tableau de paramètres de Calcul N°

NC	TC	KC	QC
N° du Constituant	Temps de rétention du constituant	Coefficient du constituant	Quantité du Constituant
0 0 1	3 6 5	1 1 6 1	1 2 5 0
0 0 2	3 8 5	9 2 3	1 2 5 0
0 0 3	4 6 5	7 1 2	5 0 0 0
0 0 4	5 9 0	6 5 1	6 2 5
0 0 5	7 8 0	6 8 1	1 2 5 0 0
1 0 1	1 8 5	3 0 2 4	9 5 8
1 0 2	2 5 0	3 4 1 8	2 5 0 0
2 0 1	5 4 0	3 0 0 0	

Après Validation de NC 0000

Attention : la visualisation n'indique jamais les lettres QC et KD

NA	QA	QI	KD
N° de l'Analyse	Quantité de l'Analyse	Quantité Etalon Interne	Coef. de Dilution ou Facteur Multiplicatif
		5 0 0 0	

Après validation du KD de la ligne NA 0000 → voir F2

2	0
↑	↑
M	K

M K

La valeur donnée à M indique la méthode de calcul.  
 M = 0 → Normalisation Interne  
 M = 2 → Calcul Concentration avec étalon. Int ou Ex  
 M = 4 → Normalisation Interne x Coef à chaque pic  
 Si on ajoute 5 à ces chiffres, les calculs s'effectuent suivant les mêmes méthodes mais les TC et TR du Tableau de calcul sont remis à jour après chaque analyse d'étalonnage en fonction des variations du temps du pic de réf.  
 M = 3 et M = 6 sont réservés aux calculs après découpage du signal en tranches de surface calculés en option

La valeur donnée à K affecte un coefficient aux pics inconnus  
 Si K = 0 → Coef. pics inconnus = 0  
 Si K = 1 → Coef. pics inconnus = 1  
 (Initialisé à 01)

1	0
	5
	5

F K

% admis de variation du coef. calculés et si ≠ 0, moyenne des Kc  
 Si FK = 00, pas de moyenne des Kc.

F C

% admis de variation du temps du constituant (initialisé à 10)

F R

% admis de variation du temps du pic de référence (initialisé à 10)

6	4	0
---	---	---

T R

Temps du pic de référence

--	--	--

T M

Temps mort de l'analyseur

1	0	0	0
---	---	---	---

K X

Coefficient Multiplicatif (Initialisé à 1000)

			4
X		D	

X D

X = puissance de 10 affectée à KX  
 D = puissance de 10 affectée à KD  
 Pour X et D, de 0 à 9 puissances positives (ex: 4 → 10<sup>4</sup>)  
 de 10 à 19 puissances négatives (ex: 14 → 10<sup>-4</sup>)  
 (Initialisé à 0006)

--	--	--	--

G P

Groupement de pics Ex: 0 3 0 6  
 N° du premier pic du group / N° du dernier pic groupé.

	9	9
--	---	---

S A

Séquence d'Analyse. Ex: 0 2 0 5  
 Nbre d'Analyses Etalons / Nbre d'Analyses Echantillon

	0	0	0
--	---	---	---

A C

Analyse en Cours. Nbre Indiquant l'analyse en cours dans le cycle défini par S.A.

Les formules utilisées pour les différentes méthodes de calcul sont indiquées page 3

SC = Surface mesurée du Constituant  
SI = Surface mesurée de l'étalon Interne.

## 1<sup>o</sup> Calcul des coefficients KC

$$KC = \frac{QC}{SC} \times \frac{SI}{QI} \times QA \times KX \cdot 10^X$$

- En Etalon Externe  $QI = 0000$  et  $\frac{SI}{QI}$  considéré = 1

- Si  $QA = 0000$  considéré = 1

Calculer  $10^X$  pour que KC soit inférieur à 9999.

## 2<sup>o</sup> Calcul des concentrations

La concentration calculée est exprimée par un nombre à 10 chiffres dont 4 après la virgule  
(xxxxxx,xxxx)

M=0 → Normalisation Interne avec coefficients

$$\text{Concentration} = \frac{KC \cdot SC}{\sum KC \cdot SC} \times KD \cdot 10^D$$

M=2 → Etalon Interne ou Externe

$$\text{Concentration} = \frac{QI}{SI} \times SC \times KC \times \frac{1}{QA \cdot KX} \times KD \cdot 10^D$$

- En Etalon Externe  $QI = 0000$  et  $\frac{QI}{SI}$  considéré = 1

M=4 → Normalisation Interne avec coefficients X Facteur Correctif.

$$\text{Conc} \times \text{Facteur Correctif} = \frac{KC \cdot SC}{\sum KC \cdot SC} \times KD \cdot 10^D \times QC$$

A mettre dans le tableau qui possède M=4 et les Facteurs Correctifs dans les cases QC. Les TC et KC seront pris dans l'ordre du tableau précédent

M=3 (option)

$$\text{Conc}_j = \frac{\sum_{i=1}^n S_i}{\sum_{i=1}^n S_i} \times 100$$

n = nombre de surfaces mémorisées.

M=6 (option)

$$\text{Conc}_k = \frac{S_k}{\sum_{i=1}^n S_i} \times 100$$

Dosage des alcools supérieurs dans les moûts fermentés

Principe : Dosage chromatographique en phase gazeuse avec étalon interne

Cette méthode est dans son principe identique à la méthode du dosage des alcools supérieurs dans les eaux de vie. Elle en diffère par la composition de la solution de référence, dont la nouvelle composition est donnée ci-dessous, et par les paramètres de calcul et d'intégration qu'on trouvera dans les feuilles suivantes.

Solution de référence :	butanol-2	25 mg/l
	propanol-n	25 mg/l
	isobutanol	50 mg/l
	butanol-1	5 mg/l
	methyl-2 butanol-1	50 mg/l
	methyl-3 butanol-1	50 mg/l
	acétaldéhyde	100 mg/l
	acétate d'éthyle	100 mg/l

Le solvant est une solution hydroalcoolique à 7°GL 20/20. La quantité d'étalon interne est diminuée. On le rajoute dans la proportion de 0,1 ml pour 10 ml de solution de référence ou d'échantillon. La sensibilité du chromatographe passe elle de 1 à 0,1.

# Tableau de Paramètres d'Intégration N°3

valeurs initiales				VALEURS				PARAM	SIGNIFICATION
Tab 1	Tab 2	Tab 3	Tab 4						
N°1 et N°2 sont les valeurs introduites par l'opérateur								NA	Numero d'Analyse +1 à chaque analyse
4	8	16	4			8		LP	Largeur du Pic la plus élevée à mi-hauteur. Exprime en Sec.
ST1	ST 3	ST2	ST 1						N° des Sous Tableaux à utiliser pour l'analyse
3	8		5			5		SP	définit la Sensibilité de Pe
5	0		3					LB	Ligne de Base
3			2			3		CT	Critère de Tangence Définit la largeur minimale des pics
200			500	500				SM	Surface Minimale
9999			1000	1000				HG	Hauteur de Groupement HG = H/HO
			280	100				DI	Délai d'Intégration
			440					1T	1 <sup>er</sup> Temps auquel LP est x (unité du chronomètre)
								2T	2 <sup>em</sup> Temps auquel LP est min (unité du chronomètre)
								1E	Temps de C <sup>de</sup> Ext n°1 (unité du chronomètre)
								2E	Temps de C <sup>de</sup> Ext n°2 (unité du chronomètre)
			900	280				TF	Temps de Fin de Sous Tableau ou de Fin d'Analyse

Tableau N°3 initialisé pour l'analyse de l'échantillon du TEST

$$\text{Sensibilité de pointe} = \frac{2 \cdot SP \cdot 1}{LP} \times \frac{\text{Unité de H}}{10} \Rightarrow \frac{2 \cdot SP \cdot 1}{LP} \mu\text{V/s en CP}$$

$$\text{Temps de réflexion pour reconnaissance de la ligne de Base} = \frac{LB}{10} \times LP \text{ secondes}$$

$$\text{Largeur minimale (à la base) des grands pics} = 2 \cdot CT \times LP \text{ secondes}$$

### Cas Particuliers

- SP=0 CT=0 "délouage en tranches"  $\Rightarrow$  Largeur des tranches = LP en  $\frac{1}{10}$  secondes
- SP=0 CT=8 mesure de hauteur des pics en  $\frac{\text{Unité de H}}{10}$
- CT=9 Pas de détection de Grands Pics (CT équivalent à 10)
- LB=9 Pas de reconnaissance de ligne de Base (LB équivalent à 10)  
Tous les pics sont inférieurs par rapport à une ligne de base horizontale
- SP=0 CT=8 Voltmètre numérique (Unité de H)

# Tableau des paramètres de Calcul N°

NC	TC	KC	QC
N° du Constituant	Temps de rétention	Coefficient du Constituant	Quantité du Constituant
001	365	1774	250
002	385	1433	250
003	465	600	500
004	590	649	50
005	780	900	1000
101	185	2464	1000
102	250	1500	2000
201	540	1500	

Après validation de NC 0000

Attention : la visualisation n'indique jamais les lignes QC et KD

NA	QA	QI	KD
N° de l'Analyse	Quantité de l'Analyse	Quantité Etalon Interne	Coef de Dilution ou Facteur de Dilution
		500	

Après validation du KD de la ligne NA 0000

<table border="1"> <tr><td>2</td><td>0</td></tr> <tr><td>M</td><td>K</td></tr> </table>	2	0	M	K	<p>M K</p>	<p>La valeur donnée à M indique la méthode de calcul.</p> <p>M=0 → Normalisation Interne  M=2 → Calcul Concentration avec étalon interne  M=4 → Normalisation Interne x Coef à chaque pic</p> <p>Si on ajoute 5 à ces chiffres, les calculs s'effectuent suivant les mêmes méthodes mais les TC et TR du tableau de calcul ont remis à jour après chaque analyse d'étalonnage en fonction des variations du temps du pic de réf.</p> <p>M=3 et M=6 sont réservés aux calculs après découpage du signal en tranches de surface (calculs en sortie).</p> <p>La valeur donnée à K est un coefficient aux pics individuels.</p> <p>Si K=0 → Coef. inconnus = 0  Si K=1 → Coef. inconnus = 1  (Initialisé à 01)</p>				
2	0									
M	K									
<table border="1"> <tr><td>1</td><td>0</td></tr> </table>	1	0	<p>FK</p>	<p>% admis de variation du coef. calculé et si = 0, moyenne les 11  si FK=00, pas de moyenne des KC.</p>						
1	0									
<table border="1"> <tr><td></td><td>5</td></tr> </table>		5	<p>FC</p>	<p>% admis de variation du temps du constituant  (initialisé à 10)</p>						
	5									
<table border="1"> <tr><td></td><td>5</td></tr> </table>		5	<p>FR</p>	<p>% admis de variation du temps du pic de référence  (initialisé à 10)</p>						
	5									
<table border="1"> <tr><td>6</td><td>4</td><td>0</td></tr> </table>	6	4	0	<p>TR</p>	<p>Temps du pic de référence</p>					
6	4	0								
<table border="1"> <tr><td></td><td></td><td></td></tr> </table>				<p>TM</p>	<p>Temps mort de l'analyseur</p>					
<table border="1"> <tr><td>1</td><td>0</td><td>0</td></tr> </table>	1	0	0	<p>KX</p>	<p>Coefficient Multiplicatif (Initialisé à 1000)</p>					
1	0	0								
<table border="1"> <tr><td></td><td></td><td>4</td></tr> <tr><td>X</td><td></td><td>D</td></tr> </table>			4	X		D	<p>XD</p>	<p>X = puissance de 10 affectée à KX  D = puissance de 10 affectée à XD  Pour X et D, de 0 à 9 puissances positives (ex: 4 → 10<sup>4</sup>)  de 10 à 19 puissances négatives (ex: 14 → 10<sup>-4</sup>)  (Initialisé à 0006)</p>		
		4								
X		D								
<table border="1"> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </table>					<p>GP</p>	<p>Groupe de pics en: <table border="1"><tr><td>0</td><td>3</td><td>0</td><td>6</td></tr></table>  N° du premier pic du groupe      N° du dernier pic groupe</p>	0	3	0	6
0	3	0	6							
<table border="1"> <tr><td>3</td><td>9</td><td>9</td></tr> </table>	3	9	9	<p>SA</p>	<p>Séquence d'Analyse en: <table border="1"><tr><td>0</td><td>2</td><td>0</td><td>3</td></tr></table>  Nbre d'Analyses Etalons      Nbre d'Analyses Echantil</p>	0	2	0	3	
3	9	9								
0	2	0	3							
<table border="1"> <tr><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr> </table>	0	0	0	<p>AC</p>	<p>Analyse en Cours. Nbre indiquant l'analyse en cours de la suite de données sur SA.</p>					
0	0	0								

Les formules utilisées pour les différentes méthodes de calcul sont indiquées page 3

## Calculs statistiques

But : connaître la valeur à accorder à un résultat ou à une méthode de traitement d'un échantillon.

On appelle probabilité  $P$  d'un évènement le rapport  $\frac{\text{Nb de cas favorables}}{\text{Nb de cas possibles}}$ .

On estime qu'un seuil de probabilité de 95 % est raisonnable pour une mesure de laboratoire. Lors d'une série de mesures identiques, on peut par des méthodes statistiques déterminer l'intervalle dans lequel une mesure prise au hasard a 95 % de chances de se trouver.

Soit  $\bar{x}$  la moyenne arithmétique des  $x_n$  mesures.

On appelle variance le nombre  $s^2 = \frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}$ . Ce nombre représente

la dispersion des résultats autour de la moyenne. On se sert aussi pour représenter cette dispersion de l'écart-type qui est la racine carrée de la variance. L'intervalle de confiance à 95 % est trouvé grâce à la table de FISHER (p.15). Il s'agit d'une table à deux entrées : 1) probabilité choisie pour l'erreur possible. Si on désire un intervalle de confiance à 95 %, on entrera dans la table par la colonne 0,05 qui représente les 5 % d'erreur possible.

2) le nombre de degré de liberté qui est égal à  $n-1$  où  $n$  est le nombre de mesures effectuées.

Grâce à cette table on détermine un coefficient  $t$  tel que le résultat ait 95 % de chance de se trouver dans l'intervalle  $\bar{x} \pm \Delta t$ . Toute mesure sera donc connue avec une précision

$$\text{de : } Y = \frac{\Delta \cdot t}{\bar{x}} \times 100$$

Soit  $\Delta_n = \frac{\Delta}{\sqrt{n}}$  l'écart-type moyen, la valeur moyenne vraie a 95 % de chance de se trouver dans l'intervalle  $\bar{x} \pm \Delta_n t$ . La précision de la méthode analytique est de

$$Z = \frac{\Delta_n t}{\bar{x}} \times 100$$

Par suite tout résultat se trouvant à l'extérieur des intervalles de confiance ainsi déterminés peuvent être considérés comme erronés et éliminés.

elles on a calculé la normalité de l'acide correspondant chaque dosage (x). La valeur moyenne de la normalité est égale à :

$$\frac{\sum x}{n} = \frac{20,475}{18} = 1,1375.$$

Les résultats élémentaires obtenus (x) présentent, de part et d'autre de cette valeur moyenne, des écarts (x -  $\bar{x}$ ). Nous calculons la somme des carrés de ces écarts :

$$\sum (x - \bar{x})^2$$

et nous divisons par « n - 1 », « n » étant le nombre de mesures effectuées, nous obtenons la variance :

$$v = \frac{302,5 \times 10^{-4}}{17} = 17,79 \cdot 10^{-4}$$

puis l'écart-type

$$\sigma = \pm \sqrt{v} = \pm 4,22 \cdot 10^{-2}$$

Cette valeur est directement utilisable dans le cas d'un grand nombre de mesures, lorsque celles-ci atteignent le voisinage de la centaine.

Dans notre cas particulier il nous faut avoir recours au travail de FISCHER, lequel a établi une table dite « Table de FISCHER » (Tableau II). Cette table de FISCHER est une table à double entrée donnant la valeur de t en fonction du nombre de mesures et de la probabilité choisie. D'une

façon générale on adopte la probabilité de 95 % (ou P = 0,05), qui, ainsi que nous l'avons vu, correspond à une « Loi Probable ». Dans le cas présent pour :

$$n - 1 = 17 \quad \text{et} \quad P = 0,05$$

la Table de FISCHER indique :

$$t = 2,11$$

Il s'ensuit que toute mesure à 95 % de chances de se trouver dans les limites :

$$\bar{x} \pm \sigma t$$

c'est-à-dire :

$$1,1375 \pm 0,0042 \times 2,11$$

soit entre les limites 1,129 et 1,146.

Il s'ensuit que toute mesure effectuée dans ces conditions à 95 % de chances d'être connue avec une précision égale à :

$$\frac{0,004 \times 2,11}{1,1375} \times 100 = \pm 0,8 \%$$

mais le résultat moyen est connu avec une précision meilleure que 0,8 %. En effet, la précision de la valeur moyenne est caractérisée par l'écart-moyen :

$$\sigma_m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

TABLEAU II

Extrait de la table t de Fischer.

n-1	P 0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0,05	0,02	0,01	0,001
1	0,158	0,225	0,510	0,727	1,000	1,376	1,963	3,078	6,314	12,706	31,821	63,657	636,619
2	0,142	0,289	0,445	0,617	0,816	1,061	1,385	1,883	2,920	4,303	6,965	9,925	21,595
3	0,137	0,277	0,424	0,584	0,765	0,978	1,250	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	12,941
4	0,134	0,271	0,414	0,559	0,741	0,941	1,190	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	9,610
5	0,132	0,267	0,408	0,559	0,727	0,920	1,156	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	6,859
6	0,131	0,265	0,404	0,553	0,718	0,906	1,134	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,959
7	0,130	0,263	0,402	0,549	0,711	0,896	1,119	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	5,405
8	0,130	0,262	0,399	0,546	0,706	0,889	1,108	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	5,041
9	0,129	0,261	0,396	0,543	0,703	0,883	1,100	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,781
10	0,129	0,260	0,397	0,542	0,700	0,879	1,093	1,372	1,812	2,228	2,761	3,169	4,587
11	0,129	0,260	0,396	0,540	0,697	0,876	1,088	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,437
12	0,128	0,259	0,395	0,539	0,695	0,873	1,083	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	4,318
13	0,128	0,259	0,394	0,538	0,694	0,870	1,079	1,350	1,771	2,160	2,659	3,012	4,221
14	0,128	0,258	0,392	0,537	0,692	0,868	1,076	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	4,140
15	0,128	0,258	0,391	0,536	0,691	0,866	1,074	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	4,073
16	0,128	0,258	0,392	0,535	0,690	0,865	1,071	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	4,015
17	0,128	0,257	0,392	0,534	0,689	0,863	1,069	1,333	1,740	2,110	2,567	2,896	3,963
18	0,127	0,257	0,392	0,534	0,688	0,862	1,067	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,922
19	0,127	0,257	0,391	0,533	0,688	0,861	1,066	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,883
20	0,127	0,257	0,391	0,533	0,687	0,860	1,064	1,323	1,725	2,086	2,528	2,845	3,850
21	0,127	0,257	0,391	0,532	0,686	0,859	1,063	1,325	1,721	2,080	2,518	2,831	3,819
22	0,127	0,256	0,390	0,532	0,686	0,858	1,061	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,792
23	0,127	0,256	0,390	0,532	0,685	0,858	1,060	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,767
24	0,127	0,256	0,390	0,531	0,685	0,857	1,059	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,745
25	0,127	0,256	0,390	0,531	0,684	0,856	1,058	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,725
26	0,127	0,256	0,390	0,531	0,684	0,856	1,058	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,707
27	0,127	0,256	0,389	0,531	0,684	0,855	1,057	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,690
28	0,127	0,256	0,389	0,530	0,683	0,855	1,056	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,674
29	0,127	0,256	0,389	0,530	0,683	0,854	1,055	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,659
30	0,127	0,256	0,389	0,530	0,683	0,854	1,055	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,646
40	0,126	0,255	0,388	0,529	0,681	0,851	1,050	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	3,551
60	0,126	0,254	0,387	0,527	0,679	0,848	1,046	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660	3,460
120	0,126	0,254	0,386	0,526	0,677	0,845	1,041	1,289	1,658	1,900	2,358	2,617	3,373
∞	0,126	0,253	0,385	0,524	0,674	0,842	1,036	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	3,291

Reproduit par autorisation de M. FISCHER, Les méthodes statistiques appliquées à la Recherche Scientifique, Presses Universitaires de France, Paris.

Composition de milieu Malt Wickerham (MW)

Extrait de malt	3 g
Biopolytone	5 g
Extrait de levure	3 g
Sucre	Quantité variable
Eau distillée	q.s.p. pour 1000 ml

Extraction du glycogène : méthode de BECKER

Principe : Lyse des cellules par  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , le glycogène est hydrolysé puis on dose le glucose produit

<u>Réactif</u> :	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	0,25 M	
	$\text{CH}_3\text{COOH}$	3 N	
	$\alpha$ -amylglucosidase		
	$\text{CH}_3\text{COONa}$	0,2 M	
	Tampon KOH	triéthanolamine HCl 1 M	Proportions 3
		KOH 10 N	0;8
		$\text{CH}_3\text{COOH}$ 1 M	0,2

Manipulation : Mettre environ 50 mg en poids sec de levure dans 2 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,25 M. Chauffer au bain marie bouillant pendant 90 mn. Refroidir. Amener à pH 4,6 à 5,2 par addition d'environ 0,5 ml de  $\text{CH}_3\text{COOH}$  3 N. Prélever 0,4 ml de cette solution et y ajouter 0,6 ml de  $\text{CH}_3\text{COONa}$  0,2 M et 0,01 ml d'amylglucosidase. Mettre au bain marie à  $37^\circ\text{C}$  pendant 2 H. Arrêter la réaction par dilution dans le tampon KOH en notant le coefficient de dilution. (2 par exemple).

Dans ces conditions de manipulation le coefficient de dilution final est de 17,5.

Doser le glucose sur la dernière solution obtenue .

Extraction du tréhalose: méthode de TREVELYAN

Principe : Lyse des cellules et extraction spécifique du tréhalose par l'éthanol à 80 % à chaud.

Réactifs :

Ethanol	80 %		
Solution de CARPEZ I	$Zn(CH_3COO)_2 + 2 H_2O$	21,9 g	
	ou $Zn(CH_3COO)_2 + 3 H_2O$	23,8 g	
	$CH_3COOH$	3 g	
	$H_2O$	q.s.p.	100ml
Solution de CARPEZ II	$K_4Fe(CN)_6 + 3H_2O$	10,6 g	
	$H_2O$	q.s.p.	100ml
HCl	3 N		

Matériel : Concentrateur type Potavapeur  
Centrifugeuse

Manipulation : Mettre environ 250 mg de poids sec de levure dans 20 ml d'éthanol à 80 %  
Chauffer au reflux pendant 30 mn. Centrifuger à 5000 rpm pendant 10 mn. Conserver le  
surnageant, reprendre le culot dans 20 ml d'éthanol à 80 %. Recentrifuger. Mélanger les  
deux surnageants. Concentrer à environ 10 ml. Reprendre dans une fiole jaugée de 25 ml  
Ajouter 0,5 ml de la solution de CARPEZ I puis 0,5 ml de la solution de CARPEZ II. Ajouter  
à 25 ml avec de l'eau distillée. Filtrer. Prendre 2 ml de cette solution, y ajouter 8 ml  
d'HCl 3N. Mettre au bain marie bouillant pendant 4 H. Le coefficient de dilution est  
de 25. Doser le glucose sur la dernière solution obtenue.

## Dosage du glucose : méthode enzymatique

**Principe :** Le glucose est phosphorylé en glucose-6P par l'enzyme hexokinase et l'ATP. suivant la réaction:  $\text{Glucose} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{HK}} \text{Glucose-6P} + \text{ADP}$

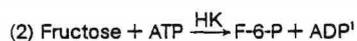
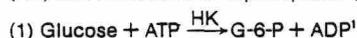
En présence de l'enzyme glucose-6P déhydrogénase le glucose-6P est oxydé en gluconate-6P par le NADP qui se transforme en NADPH. Ce composé absorbe à 340 nm de longueur d'onde.

La formation de ce composé étant stœchiométrique à la présence de glucose dans le milieu réactionnel il est possible de doser le glucose par ce moyen.

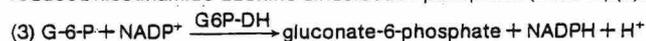
Les produits nécessaires au dosage du glucose sont vendus sous forme de kit par l'entreprise Mannheim-Boehringer. La méthode de dosage est détaillée dans le prospectus suivant, fourni avec le kit.

### Principe

Glucose and fructose are phosphorylated to glucose-6-phosphate (G-6-P) and fructose-6-phosphate (F-6-P) by the enzyme hexokinase (HK) and adenosine-5'-triphosphate (ATP) (1) (2).

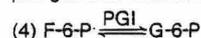


In the presence of the enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6P-DH), G-6-P is oxidized by nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NADP) to gluconate-6-phosphate with the formation of reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NADPH) (3).



The amount of NADPH formed in this reaction is stoichiometric with the amount of glucose. It is NADPH which is measured by the increase in absorbance at 334, 340 or 365 nm.

On completion of reaction (3), F-6-P is converted to G-6-P by phosphoglucose isomerase (PGI) (4).



G-6-P reacts in turn with NADP forming gluconate-6-P and NADPH. The amount of NADPH obtained in this reaction is stoichiometric with the amount of fructose. The increase in NADPH is measured by means of its absorbance at 334, 340 or 365 nm.

### Each Test-Combination Contains

- Bottle 1 with ca. 5 g of lyophilisate, consisting of triethanolamine buffer - pH 7.6  
NADP - 64 mg  
ATP - 160 mg  
magnesium sulphate stabilizers.
- Bottle 2 with 0.7 ml of enzyme suspension, consisting of hexokinase - ca. 200 U  
glucose-6 phosphate dehydrogenase - ca. 100 U
- Bottle 3 with 0.7 ml of phosphoglucose isomerase - 490 U

### Preparation of Solutions

- Dissolve contents of bottle 1 in 27 ml of redist. water.
- Use contents of bottle 2 undiluted.
- Use contents of bottle 3 undiluted.

### Stability of Solutions

Solution 1 is stable for 4 weeks at +4°C, and for 2 months at -20°C. The contents of bottles 2 and 3 are stable for 1 year at +4°C.

### Procedure

Wavelength:<sup>3</sup> 340 nm, Hg 365 nm or Hg 334 nm  
Glass cuvette<sup>4</sup>: 1 cm light path  
Temperature: 20-25°C  
Final volume: glucose 3.02 ml  
fructose 3.04 ml

Read against air (without a cuvette in the light path) or against water.

Sample solution: 3-100 µg of glucose and fructose per cuvette<sup>4</sup>

Pipette into cuvettes	blank	sample
solution 1	1.0 ml	1.0 ml
sample solution	-	0.1 ml
redist. water	2.0 ml	1.9 ml
mix, read absorbances of the solutions (A <sub>1</sub> ) after approximately 3 min and start reaction by addition of		
suspension 2	0.02 ml	0.02 ml
mix, wait for the end of the reaction (approx. 10-15 min), and read the absorbances of the solutions (A <sub>2</sub> ). If the reaction has not stopped after 15 min, continue to read the absorbances at 5-min intervals until the absorbances increase constantly over 5 min. Add.		
suspension 3	0.02 ml	0.02 ml
mix, read absorbances of the solutions after 10-15 min (A <sub>3</sub> ).		

If the absorbance A<sub>2</sub> increases constantly, extrapolate the absorbances to the time of the addition of suspension 2.

Determine the absorbance differences A<sub>2</sub>-A<sub>1</sub> for both blank and sample. Subtract the absorbance difference of the blank from the absorbance difference of the sample, thereby obtaining ΔA (glucose). Determine the absorbance differences A<sub>3</sub>-A<sub>2</sub> for both blank and sample. Subtract the absorbance difference of the blank from the absorbance difference of the sample, thereby obtaining ΔA (fructose).

### Calculation

According to the general formula for calculating the concentrations, the equation is:

$$c = \frac{V \times \text{MW}}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A \text{ [g/l]}$$

where V = final volume [ml]  
v = sample volume [ml]  
MW = molecular weight of the substance to be assayed  
d = light path [cm]  
ε = absorption coefficient of NADPH at:  
340 nm = 6.3 [l x mmol<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>]  
Hg 365 nm = 3.5 [l x mmol<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>]  
Hg 334 nm = 6.18 [l x mmol<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>]

It follows for glucose:

$$c = \frac{3.02 \times 180.16}{\epsilon \times 1 \times 0.1 \times 1000} \times \Delta A_{(\text{glucose})} = 5.441 \times \frac{\Delta A_{(\text{glucose})}}{\epsilon} \text{ [g glucose/l sample sol.]}$$

and for fructose:

$$c = \frac{3.04 \times 180.16}{\epsilon \times 1 \times 0.1 \times 1000} \times \Delta A_{(\text{fructose})} = 5.477 \times \frac{\Delta A_{(\text{fructose})}}{\epsilon} \text{ [g fructose/l sample sol.]}$$

If the sample has been diluted during preparation, the result must be multiplied by the dilution factor F.

### Further Instructions

Dosage du glucose : méthode phénol sulfurique (SMITH et COLL)

Principe : Dosage colorimétrique de l'hydroxyméthylfurfural formé par action de l'acide sulfurique sur les oses.

Réactifs :

Phénol	5 g / 100ml
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pur pour analyse	( d = 1,83)
Glucose	solution à 0,1 g/l

Manipulation : Réaliser une gamme étalon de glucose de 0 à 100 g/ml. Ajouter à chaque tube contenant 1 ml de solution gluconée, 1 ml de la solution de phénol et 5 ml d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, dans cet ordre. L'ajout de l'acide doit être rapide et il faut se méfier des projections possibles. Laisser reposer 30 mn. Lire la D.O. sur un spectrophotomètre à 490 nm .

Tracer la droite sur du papier millimétré : D.O. = f ( concentration).

Traiter les échantillons à doser de la même manière. La droite tracée donne directement la concentration de l'échantillon à doser en fonction de la D.O. obtenue.

ANNEXE 2

```

PARAM  INTEG  3
          23  NA
          2600 NI
           9  LP
           5  5  SP
           3   LB
           2   3  CT
          500 500 SM
         1000 1000 HG
          200  100 DI
          440   IT
          900  280 TF

```

```

PARAM  CALCUL  3
NC  TC  KC  QC
001 365 1774 250
002 385 1403 250
003 465 600 500
004 590 649 50
005 790 900 1000
101 185 2464 1000
102 250 1504 2000
201 540
NA  QA  QI  KD
000          500

```

```

20  MK
10  FK
 5  FC
 5  FR
640 TR
1000 KX
 4  XD
399  SA
320  AC

```

```

ICAP  10  DELSI
PARAM  INTEG  3
      0011
      2600

```

```

TEMPS  SURFACE  CB
187    16997  Z1
237    1199  Z1
252    31854  Z1
296    30171787  S0
389    121274  T1
469    246527  T1
568    11390  T1
645    218919  T1
792    563720  T1
ANALYSE ECHANT  08
REFERENCE 645

```

```

PARAM  CALCUL  3
TEMPS  CONC  NO
187    95.6532 3101
252    109.4204 3102
389    396.9176 3002
469    337.8331 3003
568    16.8965 3004
792    1158.7573 3005
2115.4781

```

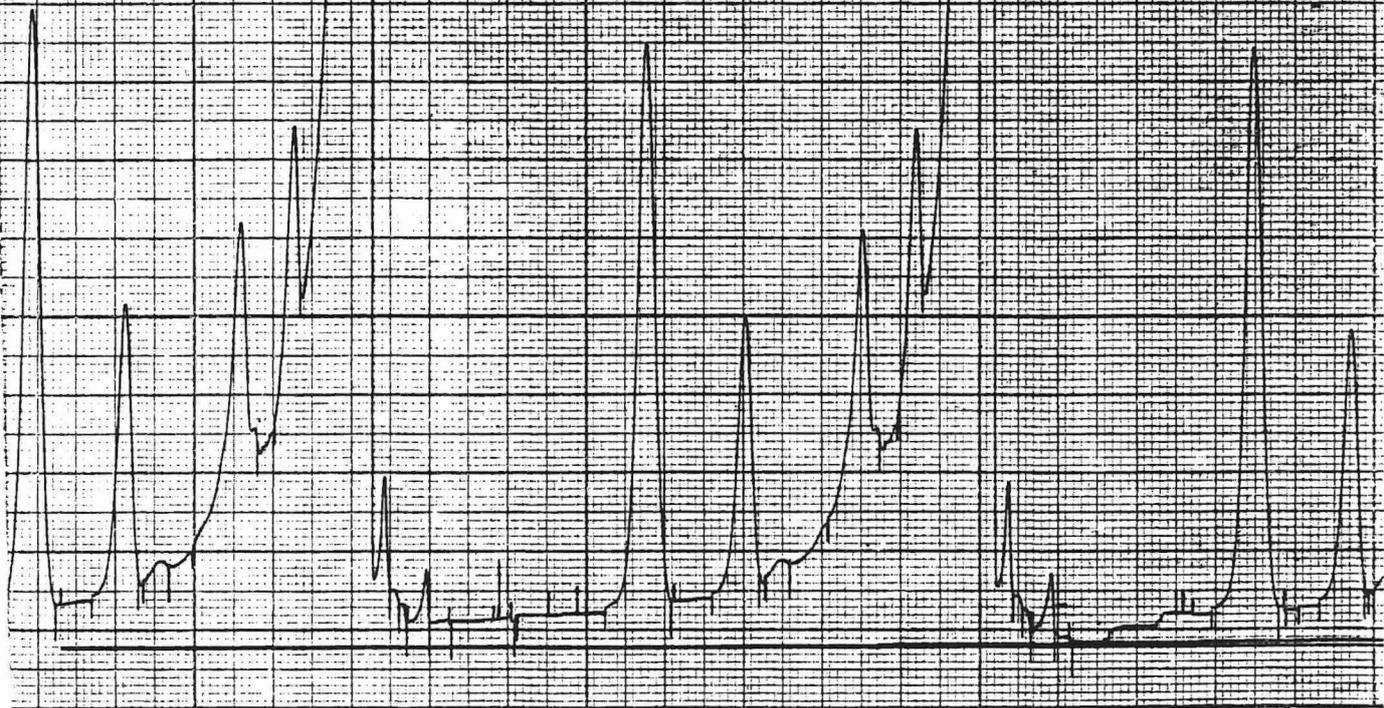
R<sub>1</sub>

R<sub>1</sub> à R<sub>11</sub>

Paramètres de calcul  
et d'intégration utilisés  
par les études statistiques

Fiches d'intégrations de  
l'étude statistique de  
chromatographe.

Blue D. l. t.



16/09

2

ICAP 10 DELSI  
 PARAM INTEG 3  
 0012  
 2609

TEMPS	SURFACE	CB
152	1263	Z1
186	17050	Z1
222	1435	Z1
240	1085	Z1
251	33483	Z1
300	31535093	S0
388	121555	T1
469	250239	T1
589	10958	T1
645	221829	T1
792	562204	T1

ANALYSE ECHANT 09  
 REFERENCE 645  
 PARAM CALCUL 3

TEMPS	CONC	N0
186	94.6927	3101
251	113.5073	3102
388	392.6184	3002
469	338.4214	3003
589	16.0297	3004
792	1140.4811	3005
	2095.7506	

ICAP 10 DELSI  
 PARAM INTEG 3  
 0014  
 2609

TEMPS	SURFACE	CB
152	671	Z1
187	15658	Z1
252	40038	Z1
300	35571564	S0
389	116967	T1
471	236657	T1
589	9746	T1
647	213017	T1
794	550384	T1

ANALYSE ECHANT 11  
 REFERENCE 647  
 PARAM CALCUL 3

TEMPS	CONC	N0
187	90.5592	3101
252	141.3435	3102
389	393.4280	3002
471	333.2931	3003
589	14.8465	3004
794	1162.6903	3005
	2136.1606	

ICAP 10 DELSI  
 PARAM INTEG 3  
 0016  
 2609

TEMPS	SURFACE	CB
187	16056	Z1
237	1572	Z1
252	29469	Z1
296	28970171	S0
389	111507	T1
471	205942	T1
588	10495	T1
647	203278	T1
794	522444	T1

ANALYSE ECHANT 13  
 REFERENCE 647  
 PARAM CALCUL 3

TEMPS	CONC	N0
187	97.3100	3101
252	109.0166	3102
389	393.0320	3002
471	303.9315	3003
588	16.7535	3004
794	1156.5432	3005
	2076.5868	

ICAP 10 DELSI  
 PARAM INTEG 3  
 0013  
 2609

TEMPS	SURFACE	CB
188	16462	Z1
226	610	Z1
252	31786	Z1
291	29889262	S0
389	121034	T1
471	239350	T1
588	11081	T1
647	218609	T1
792	552328	T1

ANALYSE ECHANT 10  
 REFERENCE 647  
 PARAM CALCUL 3

TEMPS	CONC	N0
188	92.7737	3101
252	109.3416	3102
389	396.6339	3002
471	328.4631	3003
588	16.4484	3004
792	1136.9504	3005
	2080.6711	

ICAP 10 DELSI  
 PARAM INTEG 3  
 0015  
 2609

TEMPS	SURFACE	CB
186	15644	Z1
222	1707	Z1
237	1339	Z1
251	33160	Z1
299	33664659	S0
388	120343	T1
468	240235	T1
586	10796	T1
645	214898	T1
792	556394	T1

ANALYSE ECHANT 12  
 REFERENCE 645  
 PARAM CALCUL 3

TEMPS	CONC	N0
186	89.6863	3101
251	116.0379	3102
388	401.2404	3002
468	335.3707	3003
586	16.3021	3004
792	1165.0983	3005
	2123.7357	

ICAP 10 DELSI  
 PARAM INTEG 3  
 0017  
 2609

TEMPS	SURFACE	CB
187	16075	Z1
240	1078	Z1
251	29658	Z1
297	32130008	S0
389	112344	T1
471	201210	T1
589	9672	T1
647	205639	T1
794	529183	T1

ANALYSE ECHANT 14  
 REFERENCE 647  
 PARAM CALCUL 3

TEMPS	CONC	N0
187	96.3066	3101
251	108.4561	3102
389	391.4358	3002
471	293.5386	3003
589	15.2624	3004
794	1158.0116	3005
	2063.0111	

R3

R5

R2

we  
8  
109

ICAP 10 DELSI  
PARAM INTEG 3  
0022  
2609

ICAP 10 DELSI  
PARAM INTEG 3  
0018  
2609

TEMPS	SURFACE	CB
187	16465	Z1
226	755	Z1
240	1079	Z1
252	30736	Z1
296	33333397	S0
389	120504	T1
471	229382	T1
588	9710	T1
647	219744	T1
794	570515	T1

ANALYSE ECHANT 15  
REFERENCE 647  
PARAM CALCUL 3

TEMPS	CONC	NO
187	92.3114	3101
252	105.1936	3102
389	392.9168	3002
471	313.1500	3003
588	14.3389	3004
794	1168.3220	3005
	2086.2307	

R 8

ICAP 10 DELSI  
PARAM INTEG 3  
0020  
2609

TEMPS	SURFACE	CB
187	17083	T1
252	32310	Z1
293	30069017	S0
388	120690	T1
468	246621	T1
586	11147	T1
644	223647	T1
789	578584	T1

ANALYSE ECHANT 17  
REFERENCE 644  
PARAM CALCUL 3

TEMPS	CONC	NO
187	98.5117	3101
252	108.6404	3102
388	412.2953	3002
468	330.8173	3003
586	16.1737	3004
789	1164.1685	3005
	2130.5969	

R 12

ICAP 10 DELSI  
PARAM INTEG 3  
0022  
2609

TEMPS	SURFACE	CB
152	1046	Z1
186	20324	Z1
223	1481	Z1
236	739	Z1
252	28271	Z1
294	30357309	S0
387	158776	T1
432	701	T1
466	210048	T1
525	94470	T1
584	17270	T1
640	194281	T1
786	611892	T1

ANALYSE ECHANT 19  
REFERENCE 640  
PARAM CALCUL 3

TEMPS	CONC	NO
186	128.8811	3101
252	109.4280	3102
387	585.5590	3002
466	336.6999	3003
584	28.8454	3004
786	1417.2842	3005
	2606.6976	

R 13 Z

ICAP 10 DELSI  
PARAM INTEG 3  
0019  
2609

TEMPS	SURFACE	CB
186	16583	T1
221	1948	Z1
250	34454	Z1
289	34656322	S0
388	124451	T1
468	239542	T1
586	10613	T1
644	222597	T1
791	572965	T1

ANALYSE ECHANT 16  
REFERENCE 644  
PARAM CALCUL 3

TEMPS	CONC	NO
186	91.7813	3101
250	116.3960	3102
388	400.5855	3002
468	322.6372	3003
586	15.4715	3004
791	1159.3006	3005
	2105.3721	

R 9

ICAP 10 DELSI  
PARAM INTEG 3  
0021  
2609

TEMPS	SURFACE	CB
152	706	Z1
187	17640	T1
237	1106	Z1
251	32922	Z1
292	30216076	S0
387	126172	T1
468	249404	T1
584	11477	T1
642	221881	T1
788	575069	T1

ANALYSE ECHANT 18  
REFERENCE 642  
PARAM CALCUL 3

TEMPS	CONC	NO
187	197.9465	3101
251	111.5793	3102
387	413.8941	3002
468	337.2131	3003
584	16.7850	3004
788	1166.3461	3005
	2143.7641	

R 11

ICAP 10 DELSI  
PARAM INTEG 3  
0023  
2609

TEMPS	SURFACE	CB
186	19203	Z1
222	1430	Z1
236	718	Z1
252	31627	Z1
295	32158921	S0
387	174642	T1
432	773	T1
466	194918	T1
525	208471	T1
584	13335	T1
640	184970	T1
786	564075	T1

ANALYSE ECHANT  
REFERENCE 640  
PARAM CALCUL 3

TEMPS	CONC	NO
186	127.9023	3101
252	128.5803	3102
387	676.4934	3002
466	316.1345	3003
584	23.3941	3004
786	1372.2992	3005
	2644.8038	

R 12

26/09

4

ICAP 10 DELSI  
PARAM INTEG 3  
0025  
2609

ICAP 10 DELSI  
PARAM INTEG 3  
0028  
2609

ICAP 10 DELSI  
PARAM INTEG 3  
0024  
2609

TEMPS SURFACE CB  
186 15385 Z1  
221 1170 Z1  
234 2467 Z1  
249 31440 T1  
293 29824944 80  
384 113946 T1  
463 211059 T1  
580 11177 T1  
634 212601 T1  
780 550894 T1

ANALYSE ECHANT 21  
REFERENCE 634  
PARAM CALCUL 3

IFS CONC NO  
186 89.1544 3101  
249 111.2077 3102  
384 384.0165 3002  
53 297.8240 3003  
630 17.0598 3004  
780 1166.0448 3005  
2065.3072

TEMPS SURFACE CB  
187 16133 Z1  
240 3760 Z1  
250 30984 T1  
296 29952177 80  
385 127314 T1  
432 873 T1  
464 249977 T1  
581 11414 T1  
637 220651 T1  
783 572175 T1

ANALYSE ECHANT 23  
REFERENCE 637  
PARAM CALCUL 3

TEMPS CONC NO  
187 90.0782 3101  
250 105.5964 3102  
385 413.4152 3002  
464 339.8720 3003  
581 16.7859 3004  
783 1166.9049 3005  
2132.6526

TEMPS SURFACE CB  
187 16056 Z1  
240 3580 Z1  
250 27483 Z1  
285 30611522 80  
386 121401 T1  
432 771 T1  
464 232682 T1  
583 10180 T1  
639 208168 T1  
783 541610 T1

ANALYSE ECHANT 25  
REFERENCE 639  
PARAM CALCUL 3

TEMPS CONC NO  
187 95.0241 3101  
250 99.2814 3102  
386 417.8539 3002  
464 335.3281 3003  
583 15.8689 3004  
783 1170.8067 3005  
2134.1631

EV3

ICAP 10 DELSI  
PARAM INTEG 3  
0027  
2609

EV3

EVA

ICAP 10 DELSI  
PARAM INTEG 3  
0025  
2609

TEMPS SURFACE CB  
186 16058 Z1  
236 4567 Z1  
250 29853 T1  
292 28591050 80  
385 125111 T1  
431 754 T1  
464 246004 T1  
581 11186 T1  
637 214480 T1  
781 553074 T1

ANALYSE ECHANT 22  
REFERENCE 637  
PARAM CALCUL 3

TEMPS CONC NO  
186 92.2391 3101  
250 104.6692 3102  
385 417.9505 3002  
464 344.0936 3003  
581 16.9239 3004  
781 1166.6975 3005  
2142.5738

TEMPS SURFACE CB  
152 767 Z1  
186 16393 Z1  
239 3029 Z1  
250 30338 Z1  
292 32457855 80  
385 128825 T1  
432 864 T1  
464 255018 T1  
583 10734 T1  
639 221626 T1  
783 579326 T1

ANALYSE ECHANT 24  
REFERENCE 639  
PARAM CALCUL 3

TEMPS CONC NO  
186 91.1272 3101  
250 102.9399 3102  
385 416.4814 3002  
464 345.2084 3003  
583 15.7164 3004  
783 1176.2911 3005  
2147.7564

ICAP 10 DELSI  
PARAM INTEG 3  
0031  
2609

TEMPS SURFACE CB  
186 16557 Z1  
227 729 Z1  
239 953 Z1  
249 30703 T1  
297 31549680 80  
385 125259 T1  
432 798 T1  
464 245188 T1  
581 10693 T1  
637 215839 T1  
781 562370 T1

ANALYSE ECHANT 27  
REFERENCE 637  
PARAM CALCUL 3

TEMPS CONC NO  
186 94.5066 3101  
249 106.9716 3102  
385 415.8102 3002  
464 340.7929 3003  
581 16.0762 3004  
781 1172.4780 3005  
2146.6355

EV3

EV2

EV1 à EV10 : Fiches d'intégration pour l'étude statistique

emille for  
26/09

ICAP 10 DELSI  
PARAM INTEG 3  
0032  
2609

TEMPS SURFACE CB  
187 16964 Z1  
250 31944 T1  
290 29542269 S0  
385 129356 T1  
431 872 T1  
464 252882 T1  
581 10892 T1  
637 227764 T1  
781 587624 T1

ANALYSE ECHANT 28  
REFERENCE 637

PARAM CALCUL 3

TEMPS CONC NO  
187 91.7601 3101  
250 105.4683 3102  
385 406.9281 3002  
464 333.0842 3003  
581 15.5180 3004  
781 1160.9859 3005  
2113.7446

EV2

ICAP 10 DELSI  
PARAM INTEG 3  
0033  
2609

TEMPS SURFACE CB  
186 15104 Z1  
221 527 Z1  
239 1225 Z1  
249 30330 T1  
296 33071444 S0  
384 119699 T1  
432 898 T1  
463 232348 T1  
581 10418 T1  
636 200846 T1  
781 541868 T1

ANALYSE ECHANT 29  
REFERENCE 636

PARAM CALCUL 3

TEMPS CONC NO  
186 89.0997 3101  
249 109.2104 3102  
384 410.6582 3002  
463 333.7598 3003  
581 16.1872 3004  
781 1167.5617 3005  
2126.4770

EV8

ICAP 10 DELSI  
PARAM INTEG 3  
0034  
2609

TEMPS SURFACE CB  
152 1207 Z1  
186 15470 Z1  
224 878 Z1  
239 1357 Z1  
249 29575 T1  
290 31397331 S0  
384 122391 T1  
431 897 T1  
463 235272 T1  
581 10600 T1  
636 212062 T1  
781 546424 T1

ANALYSE ECHANT 30  
REFERENCE 636

PARAM CALCUL 3

TEMPS CONC NO  
186 89.8748 3101  
249 104.8768 3102  
384 413.5260 3002  
463 332.8347 3003  
581 16.2202 3004  
781 1159.5231 3005  
2116.8556

EV9

ICAP 10 DELSI  
PARAM INTEG 3  
0035  
2609

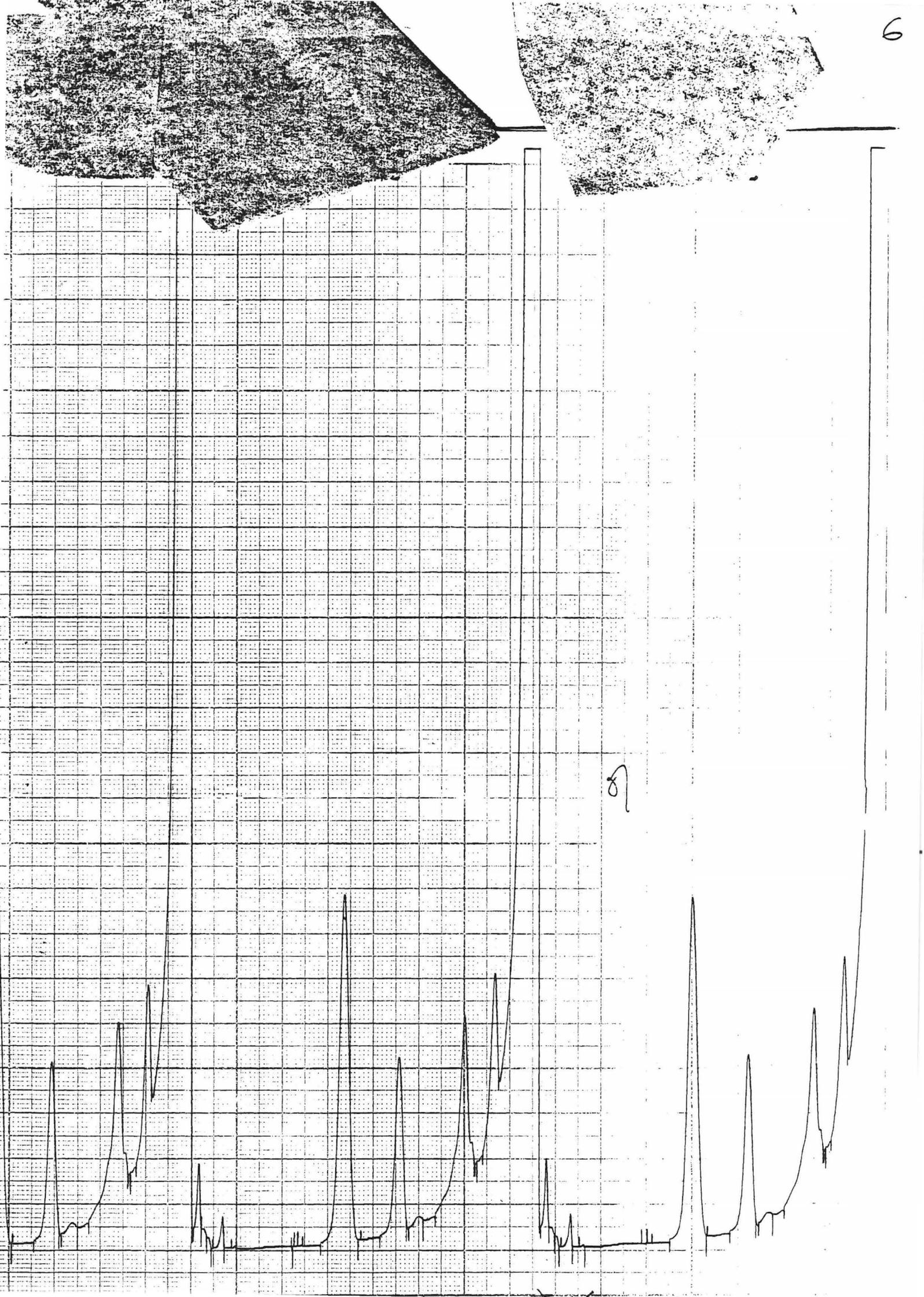
TEMPS SURFACE CB  
152 1095 Z1  
187 15338 Z1  
225 782 Z1  
250 29213 T1  
295 29985286 S0  
385 123299 T1  
432 769 T1  
464 239133 T1  
580 11235 T1  
637 211227 T1  
781 544374 T1

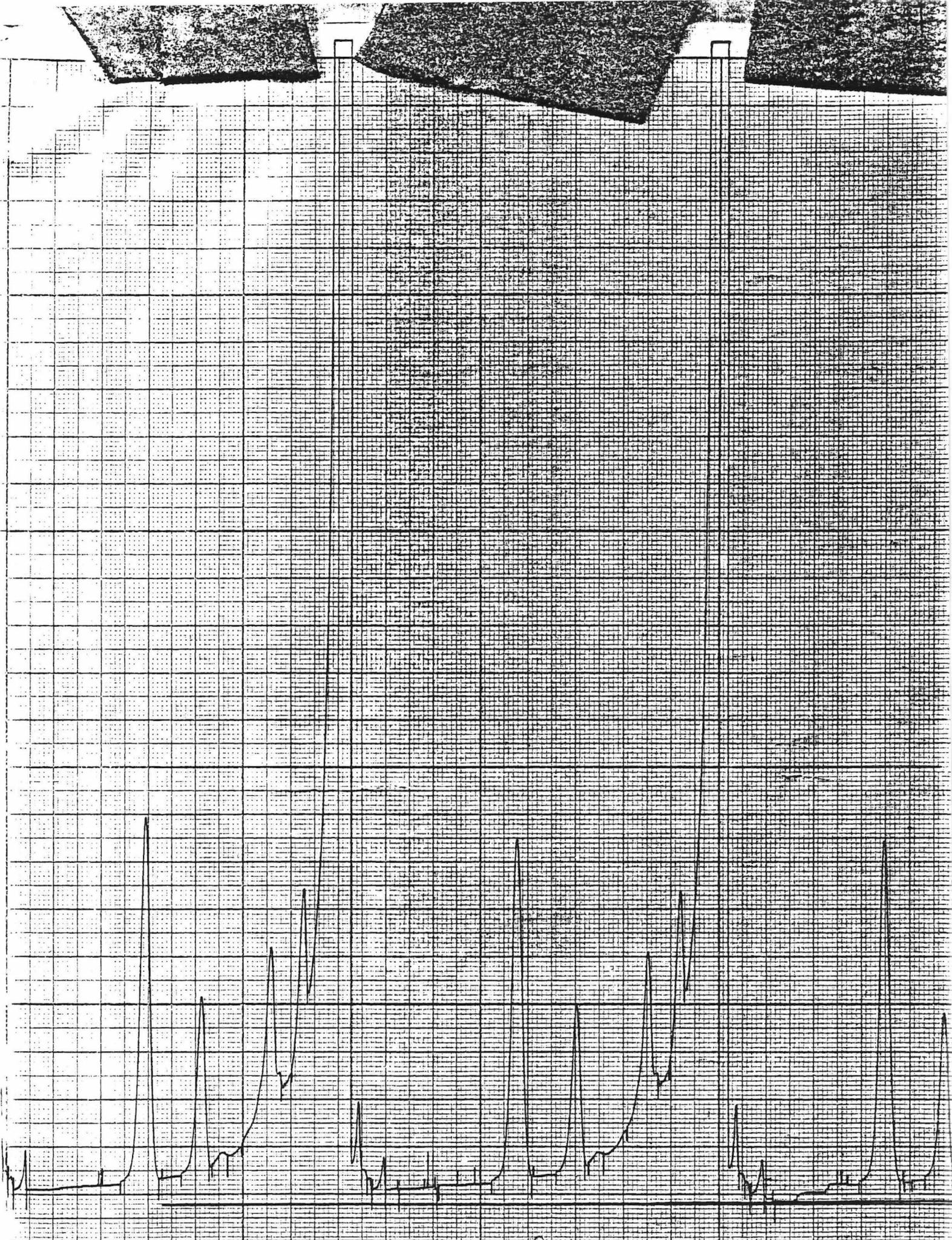
ANALYSE ECHANT 31  
REFERENCE 637

PARAM CALCUL 3

TEMPS CONC NO  
187 89.4602 3101  
250 104.0026 3102  
385 418.2407 3002  
464 339.6341 3003  
580 17.3590 3004

EV10





Rhuan ~~de~~ *[Signature]*

Diagnóstico ? -

REFERENCES. BIBLIOGRAPHIQUES

- 1/ARROYO. Studies on Rum-1945 Research Bulletin n°.5 University of Puerto.Rico
- 2/AYRAPAA. Biosynthetic formation of superiora alcohols by yeasts dependance on the nitrogenous nutrient level of the medium. J. Inst. Brew 77, 3, 266-276
- 3/BECKER J-U. A method for glycogen determination in whole yeast cells. Analytical Biochemistry 1978.86. p56-64
- 4/BOUX M. LEVEAU J-Y. Methodes utilisées en différenciation et classification des levures- 1980. APRIA/CDIIPA n°.24
- 5/CTCS. MARTINIQUE. Aptitudes Rhumières de variété de canne. 1979.
- 6/DUBOIS P. L'arôme du Rhum et des alcools
- 7/DUBOIS P-RICAUD. Etude qualitative et quantitative des constituants volatils du Rhum. Ann. Tech. Agr. 1975 24(3.4)
- 8/FAHRASMANE L. Contribution à l'étude de la formation des acides gras courts et des alcools supérieurs par des levures de Rhumerie. 1983. Thèse Université de Montpellier.
- 9/LACROIX Y. Le calcul statistique au laboratoire d'analyse. Soc. chin. 5ème série 1963. Mémoire
- 10/LEHNINGER A. Biochimie 1977. Médecine Sciences Flammarion.
- 11/LEHTONEN M-SUOMALAINEN H. Rum in "Alcoholic Beverage". AH. Rose Ed. 1977 Academic Press London N.Y
- 12/MANNER J. Structure and Biosynthesis of storage carbohydrate in yeast. in "The yeasts " Vol 2 Eds 1971 Academic Press London N.Y
- 13/MEJANE J-PIQOIS. Production d'eaux de vie de qualité en continu. Ann. Tech. Agr. 1975 Vol.3.4 (24)
- 14/MEJANE J. Fabrication de l'alcool. Les IAA Encyclopédie LAROUSSE 1979
- 15/MONTOUNET M. Biosynthèse des alcools supérieurs des boissons fermentées. Ann. Tech. Agr. 1969 18 Vol 3 p249-261



I6/NORDESTROM K. Formation of esters acid and alcohols from  $\alpha$ - keto acid by brewer's yeast. J. Inst. Brew. 1963. Vol 69 p483-485

I7/PANEK A-D. Trehalose metabolism in yeast cell in "Abstracts of the 4th Symposium on yeast" Part I. 1974. Vienna. Klaushofer et Pleytr. Eds.

I8/PARFAIT A-NAMORY M-DUBOIS. Les esters ethyliques des acides gras supérieurs des Rhums. Ann. Tech. Agr 1972 21 (2) p199-210

I9/PARFAIT A. Les impuretés aromatiques. Rapport de fin de contrat DGRST. Décision d'aide n°. 7470906 et 7470907.

20/PARFAIT A-THEMIA J.C. Protection des fermentations par les antibiotiques. Note de laboratoire. 1978.

21/PARFAIT A et COLL. Rhums et eaux de vie de canne+le procédé de fermentation. Rapport de fin de contrat DGRST. Décision d'aide 7770355

22/PARFAIT A-FABIN G. Les fermentations traditionnelles aux Antilles Françaises. IAA 92ème année Janv. 1975 n°. I p27-34

23/PARFAIT A-JOURET C. Formation des alcools supérieurs dans les Rhums. Ann. Tech. Agr. 1975 24 (3-4) p421-436.

24/PHAFF H. Les microorganismes industriels. Pour la science Nov. 1981 N° spécial

25/QUAIN DE-TUBB RS. The structural and storage carbohydrate of Saccharomyces cerevisiae changes during fermentation of wort and a role for glycogen catabolism and lipid biosynthesis. J. Inst. Brew Mar. Av. 1981-87 p103-111

26/QUAIN DE-TUBB RS. The importance of glycogen in brewing yeast. MBAA Technical quarterly 1982(19) n°. I p29-33

27/ROSE AH Recent Research on Industrially Important Strains of Saccharomyces cerevisiae in Biology and activities of yeasts. FA KINNER-JM PATMORE-PR DAVENPORT. Ed. Society for applied Bacteriology 1980 Academic Press. London. N.Y.

28/ROSE AH Secondary Product of Metabolism. 1979. Academic Press. London

29/ENIKATOVA NM. Culture of Saccharomyces yeast table to drying. Proceedings of the 5th. Int. Fermentation. Symp. 1976. Berlin

30/ROMALAINEN H. Investigation on the aroma of alcoholic beverages. NOFRING MIDDEL  
Industrien 1977 n°. I-2

31/TAYLOR CT-KIRKOP BM; The origin of médium chain length fatty acids present in beer. J.  
Inst. Brew. July. Aug 1977 (83) p241-243

32/THOFNE RSW. Fermentation velocity of yeasts. J. Inst. Brew. 1954 (60) p.227-237

33/THORNE PSW. Fermentation velocity of brewery yeasts. Brewer's Digest 1961 36 (7) 38

34/WENCKER B-LOUIS M-LANCEL P-HASSELMANN M. Etude de la fraction alcools supérieurs et  
methanol de diverses eaux de vie. Ann. Fals. Exp.  
Chim. Juil. Aout 1981 (74) n°. 799 p429-441.

