



**HAL**  
open science

## Contribution à l'étude de l'influence des micro-organismes sur la composition du rhum

Raphël Magnet

► **To cite this version:**

Raphël Magnet. Contribution à l'étude de l'influence des micro-organismes sur la composition du rhum. Biochimie [q-bio.BM]. Université de la Réunion, 1997. Français. NNT: . tel-00488438

**HAL Id: tel-00488438**

**<https://theses.hal.science/tel-00488438>**

Submitted on 2 Jun 2010

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE DE LA REUNION  
FACULTE DES SCIENCES**

**THESE**

présentée à l'Université de la Réunion

pour obtenir le **DIPLÔME DE DOCTORAT**

**SPECIALITE : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE**

par

**Raphaël MAGNET**

Ingénieur Agronome

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'INFLUENCE DES  
MICRO-ORGANISMES SUR LA COMPOSITION DU  
RHUM**

## REMERCIEMENTS

---

Avant de présenter ce travail, je tiens à exprimer ma reconnaissance à tous ceux qui m'ont permis de le réaliser ou qui m'ont fait l'honneur de le juger.

J'adresse de chaleureux remerciements à Monsieur le Professeur Jean-Claude PIERIBATTESTI qui, malgré ses nombreuses occupations et responsabilités, a toujours été disponible et m'a encouragé dans mon travail.

Monsieur Frédéric DEMARNE a mis à ma disposition le matériel d'analyse nécessaire à mon travail. Malgré ses nombreuses occupations, il n'a jamais hésité à m'apporter son aide et à me faire bénéficier de ses connaissances dans de multiples domaines. Je lui fait part de mes sincères remerciements. Il me fait également l'honneur de participer à ce jury en qualité de rapporteur.

Que Monsieur le Professeur Christian MARION, qui me fait l'honneur de juger ce travail et d'en être le rapporteur, soit ici remercié. Qu'il soit assuré de l'importance que j'attache à son jugement.

Monsieur le Professeur Pierre GALZY s'est toujours montré disponible et m'a fait profiter de son expérience et de ses connaissances. Ses nombreux conseils m'ont été précieux pour mener à bien ce travail. Il me fait également l'honneur de présider le jury de cette thèse. Pour tout cela, je lui adresse mes sincères remerciements.

Monsieur Pierre-Olivier COGAT me fait l'honneur de participer à ce jury et de juger ce travail. Il m'a également accueilli à l'U.N.G.D.A. en me permettant de travailler dans les meilleures conditions. Je lui en suis profondément reconnaissant.

Monsieur Laurent BROCC, en qualité de directeur de la distillerie de Savanna, s'est toujours intéressé à mon travail et m'a continuellement apporté son aide. Les nombreuses discussions que nous avons eues ont été déterminantes pour le choix de la direction à prendre pour mon travail. Il a tout fait pour que je dispose des meilleures conditions pour réaliser cette thèse. Je tiens à lui exprimer mes plus chaleureux remerciements.

Tout ce travail n'aurait pu être réalisé sans la disponibilité et l'aide permanente du personnel de la distillerie. Qu'il soit assuré de ma reconnaissance.

Je remercie Monsieur Eric ODOUX, responsable du service Plantes Aromatiques du C.I.R.A.D., pour son aide précieuse. Il m'a permis de bénéficier du matériel d'analyse de son laboratoire, et notamment du Spectromètre de Masse.

Les analyses en électrophorèse capillaire ont été réalisées par Madame Andromaque MONNERVILLE au laboratoire d'Agrochimie de l'Université de la Réunion malgré ses nombreuses occupations. Je la remercie sincèrement.

Les travaux portant sur les précurseurs d'arômes ont été effectués par Monsieur Patrick CHEMARDIN au Laboratoire de Microbiologie et de Génétique des Micro-Organismes de l'E.N.S.A.M. Qu'il soit assuré de ma reconnaissance et de mon amitié.

Je tiens à remercier tout particulièrement Valérie pour son soutien et son aide permanents dans la réalisation de ce travail.

Que Jimmy et Jean-Christophe soient remerciés de m'avoir accordé leur aide et, mieux, leur amitié.

# INTRODUCTION

---

Depuis toujours, l'homme a été confronté au problème de la conservation des aliments, et par là même au problème du développement des micro-organismes sur tout ce qui est d'origine végétale ou animale. L'une des voies possibles empruntées par ces micro-organismes pour se développer est la fermentation. De là naquirent tout naturellement les boissons fermentées telles que le vin, l'hydromel ou la bière, connues depuis la plus haute antiquité et issues de matières organiques riches en sucres.

La technique de distillation, quant à elle, est attestée par certains auteurs dès l'an 1000 avant J-C. A cette époque, les Perses distillaient l'eau de rose. Mais ce n'est qu'à partir du XIII<sup>ème</sup> siècle avec Arnaud de Villeneuve et Raymond de Lulle que les premières eaux-de-vie de vin apparaissent. Les eaux-de-vie ainsi obtenues étaient utilisées comme médicament et élixir de vie. Enfin, à la fin du XVI<sup>ème</sup> siècle, les vins blancs de Charente sont distillés et les produits de cette distillation, Cognac et Armagnac, sont commercialisés.

Il est généralement admis que la canne à sucre, de laquelle le rhum est issu, est originaire de l'Insulinde et plus précisément de la Nouvelle-Guinée et des îles voisines. Sa culture y est attestée depuis le XV<sup>ème</sup> siècle avant notre ère. Sa lente diffusion à travers le monde est liée aux différentes migrations. Au IV<sup>ème</sup> siècle avant Jésus-Christ, Alexandre le Grand la ramena de ses conquêtes en Asie, jusque dans le bassin méditerranéen. La canne fut alors cultivée, notamment par les populations d'origine arabe, dans les îles et sur le pourtour méditerranéen. Puis, la prise de Constantinople par les Turcs en 1453 et le recul de l'influence arabe après l'expulsion des Maures d'Espagne en 1502 amenèrent les investisseurs à rechercher de nouvelles aires de culture (Fahrasmane 1996). C'est ainsi qu'au XVI<sup>ème</sup> siècle, l'arrivée des espagnols en Amérique marque également celle de la canne à sucre. Enfin, après que le Cap de Bonne-Espérance fut devenu un passage obligé des Européens en direction de l'Inde, la canne à sucre atteignit les îles de l'océan Indien.

# I- Qu'est ce que le rhum?

## I-1. Origine du mot « rhum ».

L'origine du mot rhum fait l'objet de nombreuses hypothèses. C'est ainsi que plusieurs termes anglais sont susceptibles de lui avoir donné naissance. Ce sont : « rummage » qui désigne une boutique à alcool, « rummey » qui fut un vin anglais très apprécié des marins au XVII<sup>ème</sup> siècle, « rummer » qui est un grand vase à liqueur, et « rumbellion » qui désigne dans le Newyorkshire une bagarre de voyous (ce qui illustrerait les effets du rhum).

Le mot rhum pourrait également provenir du terme malais « brum » qui signifie « boisson alcoolisée ».

Enfin, l'hypothèse la plus probable est la suivante : le mot « rhum » serait issu de la contraction de deux autres mots : « rum » ou « rheu » qui signifie en sévillan « tiges », et « bullion » qui signifie « bouillon ». On obtiendrait ainsi « rumbullion », puis « rum ». L'apparition pour la première fois du « h » date de l'Encyclopédie de Diderot et d'Alembert.

## I-2. La technologie rhumière dans le temps.

La technologie rhumière, depuis les début de sa relativement courte histoire, a connu bien des modifications, aussi bien au niveau de la tenue de la fermentation qu'au niveau de la distillation.

Au départ, prenons l'exemple des Antilles. Lorsque la canne à sucre arrive aux Antilles au début du XVI<sup>ème</sup> siècle, elle est destinée exclusivement à la production du sucre qui était alors une denrée rare et chère. Cependant, le jus de canne fermenté ou flangourin était parfois consommé par les esclaves. Ce n'est qu'à partir du XVII<sup>ème</sup> siècle que l'on note de façon certaine la fabrication de rhum en marge de l'activité sucrière. Le père Labat le rapporte dans son « Nouveau voyage aux Isles de l'Amérique ». Les techniques de distillation sont déjà utilisées en Europe pour la fabrication d'eaux-de-vie, notamment pour le Cognac, ce qui va

permettre l'utilisation presque immédiate aux Antilles d'alambics discontinus opérant par repasse. La matière première utilisée alors est les différents rejets des sucreries (écumes, mélasses, etc) ; la fermentation se fait de manière spontanée. Le rajout également des vinasses des distillations précédentes, préalablement fermentées lors du stockage, entraîne une forte pression osmotique ainsi qu'une forte acidité du milieu, sélectionnant de ce fait une flore particulière : levures osmophiles telles que les *Schizosaccharomyces* et certaines bactéries acidifiantes. Du fait de la mauvaise qualité des matières premières employées et du peu de soins apportés au cours de la fermentation, cette dernière était longue (une à deux semaines) et faiblement productrice d'alcool. Le vin était distillé dans des alambics discontinus comprenant des parties en cuivre et opérant par repasse. On éliminait ainsi les composés très volatils, dits de « tête », qui étaient oxydés par le cuivre et les composés lourds, dits de « queue », qui restaient dans le fond de l'alambic. Cependant, la non-rectification des produits obtenus après distillation donnait un produit final, nommé guildive ou arrack, de médiocre qualité. Le rhum produit était alors essentiellement destiné à la population locale.

Cette technique de distillation fut améliorée au XIX<sup>ème</sup> siècle avec l'apparition des colonnes simples. Elles permettent d'effectuer des rétrogradations et d'obtenir des produits plus chargés en alcool grâce à l'existence de quelques plateaux de concentration. Ces colonnes à distiller augmentèrent la productivité et l'eau-de-vie obtenue fut alors commercialisable. La fabrication de rhum devint une industrie à part entière. En parallèle, les découvertes de Pasteur permirent de mieux comprendre le phénomène de fermentation et amenèrent les producteurs à améliorer la conduite de cette étape en apportant un plus grand soin à l'hygiène pendant tout le process.

Depuis, les progrès réalisés tout au long du XX<sup>ème</sup> siècle dans le domaine de la microbiologie ont entraîné l'essor de la commercialisation de levures sélectionnées, répondant aux diverses attentes des producteurs de boissons fermentées. De même, les avancées technologiques concernant les appareils à distiller ont permis d'obtenir des produits de plus en plus fins. En effet, l'apparition des colonnes concentratrices, rectificatrices et épuratrices, qui augmentent d'autant le nombre de plateaux de distillation, a permis d'obtenir des produits de plus en plus allégés en composés aromatiques ; ce qui a donné naissance au rhum léger utilisé pour les punches ou les cocktails. L'évolution du matériel de distillation a par ailleurs rendu possible la correction de certains défauts provenant d'accidents de fermentation.

Les différentes technologies employées à la distillerie de Savanna pour la production du rhum sont le témoignage des progrès réalisés ces dernières années dans ce domaine.

### **I-3. Les étapes de la fabrication du rhum de mélasse.**

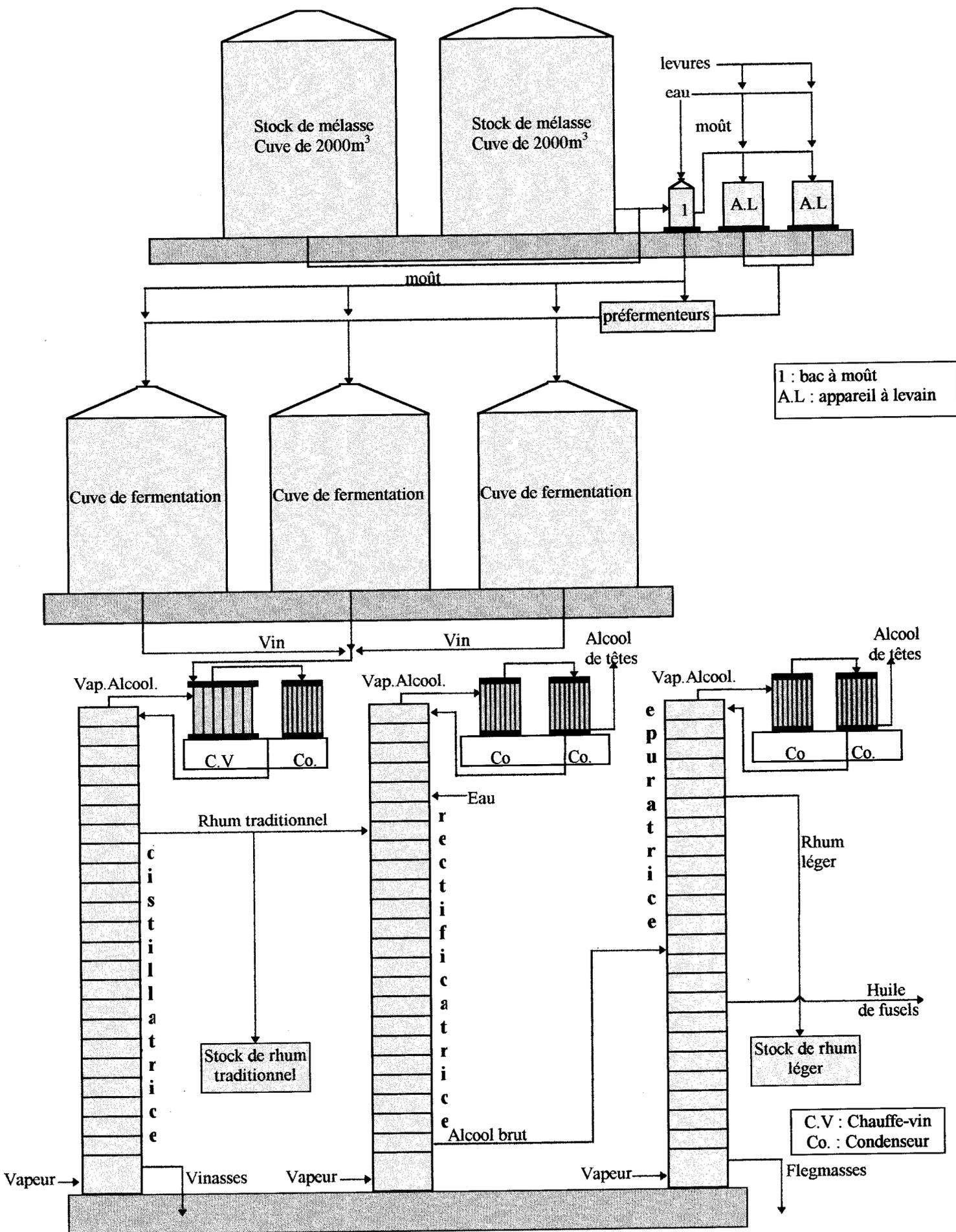
Il existe plusieurs façons de travailler pour aboutir au rhum de mélasse. La description qui suit correspond au schéma de fonctionnement de la distillerie de Savanna où nous avons effectué notre travail.

Deux étapes principales permettent d'aboutir au rhum (figure 1). La première étape est une fermentation, qui permet la transformation des sucres en éthanol sous l'action d'une levure. Cette étape se fait en conditions anaérobies et nécessite un ensemencement de masse en levures. L'étape suivante est la distillation, qui permet de récupérer l'alcool en le concentrant. Elle est réalisée par évaporation de l'alcool puis condensation. On a alors la possibilité d'affiner le produit en multipliant le nombre de colonnes et donc de plateaux de concentration.

La phase fermentaire comporte un certain nombre d'étapes préparatoires destinées à la multiplication de la levure. Pour cela, on ensemence des volumes croissants d'un milieu de culture réalisé en partie avec de la mélasse. Ces étapes de multiplication, réalisées au laboratoire jusqu'au stade de l'appareil à levain, se font en présence d'oxygène afin de favoriser la voie respiratoire productrice de plus d'énergie. Dans un premier temps, on évite donc la fermentation. L'azote et le phosphate sont des éléments indispensables intervenant dans le métabolisme de la levure. Il est alors important de compléter le milieu de culture par des nutriments azotés (sous la forme de sulfate d'ammonium) et phosphatés. Ces étapes sont les plus vulnérables à la contamination par des levures ou des bactéries « sauvages ». Il convient donc de prendre soin de l'état sanitaire du matériel utilisé et pour chaque étape de vérifier au microscope l'absence de toute forme de contamination. Il est possible de protéger le milieu par l'ajout d'acide sulfurique dans le but de diminuer le pH et donc de limiter le développement bactérien. Une fois cette phase de multiplication et d'adaptation de la levure terminée, on ensemence le milieu de fermentation.

Le milieu de fermentation appelé moût est constitué de mélasse diluée avec de l'eau. Les levures sont introduites dans un fermenteur rempli de moût. La fermentation dure environ 24 heures et est réalisée entre 30 et 37°C. Le produit obtenu est un vin qui titre entre 6,5 et 7 degrés d'alcool. Il est alors prêt à être distillé.

Figure 1 : Schéma de distillerie



La phase de distillation consiste à alimenter de façon permanente en vin, préalablement chauffé dans le chauffe-vin, la colonne à distiller et à apporter en même temps de la chaleur sous forme de vapeur. La vapeur, en remontant la colonne, va s'enrichir en alcool. Le vin quant à lui s'appauvrit en alcool au fur et à mesure qu'il descend. Le résidu obtenu en bas de colonne, nommé vinasse, est délevuré par centrifugation puis injecté dans un forage. Les vapeurs alcoolisées qui alimentent la colonne concentratrice se recondensent dès qu'elles sont à une température inférieure à leur température d'ébullition. On opère ainsi un classement de l'alcool qui va se concentrer dans les hauts plateaux de la colonne où la température est la plus basse. On obtient le rhum traditionnel qui est récupéré aux alentours de 93,5° Gay-Lussac (°GL), puis stocké.

Par la suite, on peut également envoyer l'alcool dans une colonne dite d'épuration. Celle-ci est alimentée en alcool et en eau. Un nouveau classement de l'alcool s'effectue tout au long des plateaux de la colonne. L'alcool brut obtenu est alors envoyé dans une colonne rectificatrice à la sortie de laquelle on récupère le rhum léger. C'est un produit plus concentré en alcool (environ 94° GL) et débarrassé de la plus grande partie de ses impuretés.

#### **I-4. Définition des différents types de rhums.**

Autrefois défini par un texte national, le rhum est défini, depuis 1989, par le règlement communautaire relatif aux boissons spiritueuses.

Le **rhum** est la « boisson spiritueuse obtenue exclusivement par la fermentation alcoolique et des distillations soit des mélasses ou des sirops provenant de la fabrication du sucre de canne, soit du jus de la canne à sucre lui-même, et distillé à moins de 96% vol., de telle sorte que le produit de la distillation présente d'une manière perceptible les caractères organoleptiques spécifiques du rhum ».

Le Titre Alcoométrique Volumique Acquis (T.A.V.A.) minimal est fixé à 37,5% vol. On peut noter le caractère subjectif de cette définition en ce qui concerne la perception des caractères organoleptiques du rhum. En effet, face aux problèmes de fraudes, il n'a jamais été possible de définir analytiquement, avec certitude, le rhum par rapport aux autres boissons spiritueuses. Nous aborderons dans un des chapitres suivants les différentes recherches qui ont été menées (sans véritable réussite) dans le but de distinguer les rhums des autres eaux-de-vie.

Le **rhum agricole** est également défini par le règlement communautaire sur les boissons spiritueuses.

Il s'agit « de l'eau-de-vie issue exclusivement de la fermentation alcoolique et de la distillation du jus de canne à sucre, présentant les caractères organoleptiques spécifiques du rhum et ayant une teneur en substances volatiles supérieure ou égale à 225 grammes par hectolitres d'alcool à 100% (g/HLAP) ».

En application de ce texte communautaire et de la réglementation nationale définissant les rhums d'appellation d'origine (Décret du 22 Avril 1988 mod. D du 27 Mars 1992), la dénomination « rhum agricole » ne peut être utilisée que pour un rhum d'appellation d'origine.

Les rhums d'appellation d'origine sont définis par le décret précité de 1988. Ils doivent être « distillés et vieillies dans l'aire géographique dont ils portent le nom ».

Leur T.A.V.A. minimal est fixé à 40% vol.

Le **rhum traditionnel** est défini par la réglementation nationale (Décret du 22 Avril 1988 relatif aux rhums d'appellation d'origine). Il s'agit de la boisson spiritueuse « obtenue exclusivement par la fermentation alcoolique et la distillation des mélasses ou des sirops provenant de la fabrication du sucre de canne, distillé à moins de 96% vol., de telle sorte que le produit de la distillation présente d'une manière perceptible les caractères organoleptiques spécifiques du rhum et ait une quantité totale de substances volatiles autres que les alcools méthyliques et éthyliques supérieure ou égale à 225 g/HLAP ».

De même que pour le rhum agricole, la dénomination « rhum traditionnel » ne peut être utilisée que pour un rhum d'appellation d'origine.

Son T.A.V.A. minimal, en application des dispositions définissant les rhums d'appellation d'origine, est fixé à 40% vol.

Le **rhum grand arôme** est, d'après le décret de 1988, « un rhum traditionnel ayant une quantité totale de substances volatiles, autres que les alcools méthyliques et éthyliques, supérieure ou égale à 800g/HLAP et une teneur minimale en esters égale ou supérieure à 500 g/HLAP ».

Le **rhum vieux** est défini par le décret du 25 Juillet 1963. Il doit avoir subi un vieillissement d'au moins trois ans, en vaisseaux de bois de chêne d'une capacité de 650 litres au plus, et renfermer une quantité d'éléments volatils, autres que les alcools méthyliques et éthyliques, au moins égale à 325 g/HLAP.

Le **rhum léger** était autrefois défini par la réglementation nationale comme un rhum traditionnel contenant une quantité de substances volatiles, autres que les alcools méthyliques et éthyliques, supérieure à 60g/HLAP. Aujourd'hui, il ne fait plus l'objet d'une réglementation.

La figure 2 résume les étapes de fabrication des différents types de rhum.

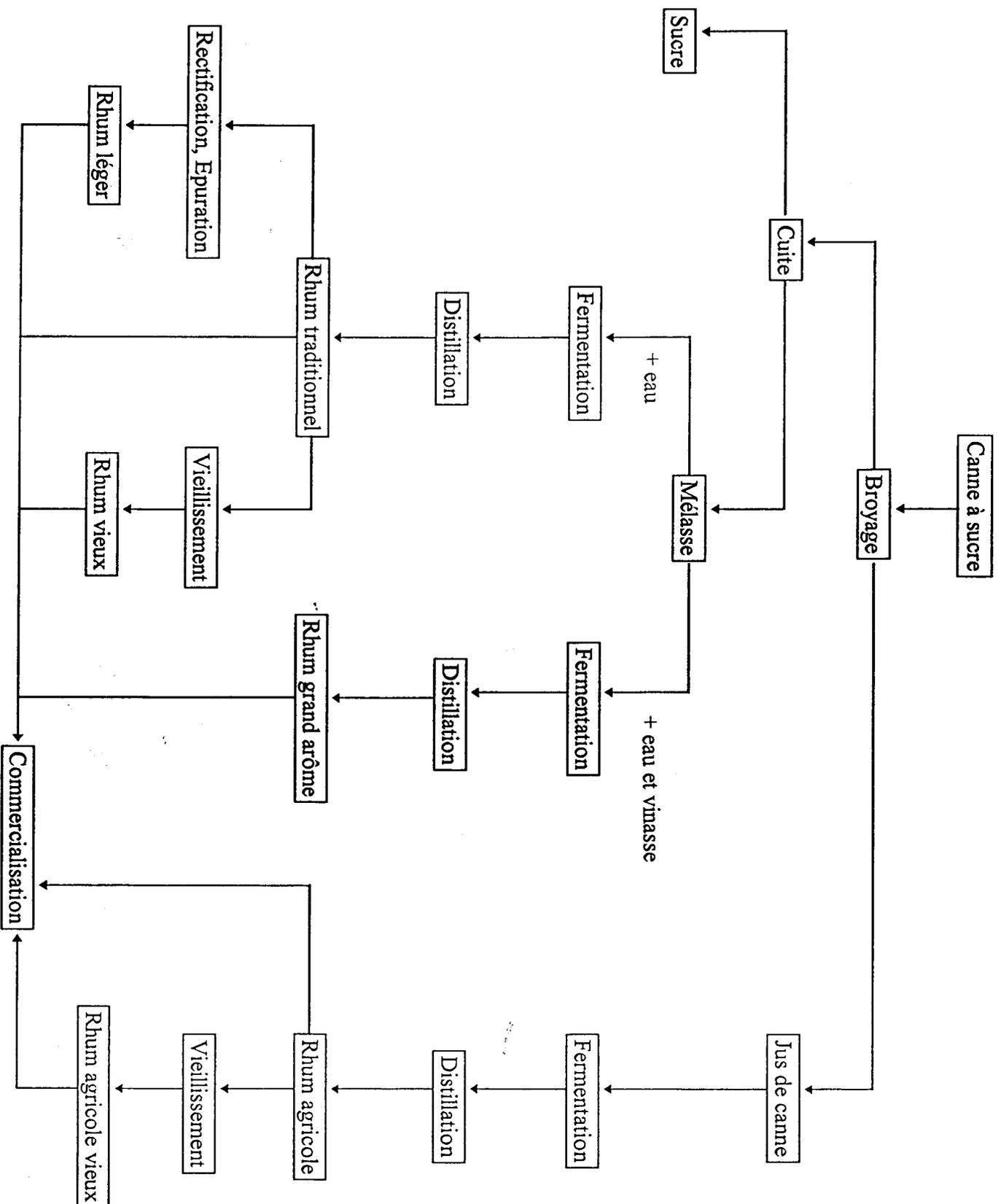
## II- Le rhum et la Réunion : un peu d'histoire...

La Réunion ne fut habitée de manière permanente qu'à la fin du XVII<sup>ème</sup> siècle (1671). Ile volcanique et montagneuse, elle était surtout destinée à ravitailler les navires de passage puis, à partir de 1735, à approvisionner l'île Maurice.

La canne à sucre garde longtemps un statut de culture familiale. La canne est tout d'abord cultivée pour la production de jus. Le vin de canne, appelé flangourin, est issu de la fermentation naturelle du jus de canne et est consommé tel quel. Dès 1704, on note la présence d'alambics qui permettent de distiller le flangourin et d'obtenir ce que l'on appelle indifféremment arack, guildive, tafia ou rhum.

La première distillerie date de 1815 et tout au long du XIX<sup>ème</sup> siècle, en raison de la perte par les français de l'île Maurice et de Saint Domingue, on assiste au développement extrêmement rapide de l'industrie sucrière et parallèlement de l'industrie rhumière. En 1860, la Réunion compte 120 usines sucrières et 40 distilleries. Le rhum est alors fabriqué à partir des écumes et de la mélasse et devient un sous produit de l'activité sucrière : « (...) Les écumes continuent de monter à la surface du liquide, d'où elles sont enlevées comme à la seconde chaudière. Il y a des personnes qui conservent les écumes pour les distiller et qui en obtiennent un rhum de médiocre qualité. ». Le rhum, en effet, est très rarement obtenu à partir du jus de canne, en raison de la rentabilité de l'industrie sucrière.

Figure 2 : obtention des différents types de rhum.



Au XIX<sup>ème</sup> siècle, l'apparition de l'oïdium puis du phylloxera en métropole affectent les productions de vin et par la même celle des eaux-de-vie de vin. Les échanges entre les colonies et la métropole se développent alors. Les exportations de rhum réunionnais, vers la métropole, augmentent. Entre 1833 et la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, la production de rhum passe de 355.000 litres à plus de 2.000.000 de litres.

En 1921, l'appellation de rhum est réglementée et en 1922 un régime de contingentement est adopté suite à la surproduction qui marque la fin de la première guerre mondiale.

Les progrès technologiques, permettant aux usines de traiter un tonnage de plus en plus important de canne à sucre, conjugués à la diminution de la surface totale cultivée vont entraîner tout au long de la deuxième moitié du XX<sup>ème</sup> siècle une baisse du nombre de sucreries et de distilleries à la Réunion. Aujourd'hui on ne compte plus que deux sucreries et trois distilleries.

La Réunion, qui a accédé entre temps au statut de Département d'Outre-mer (1946), a entièrement modernisé ses infrastructures. Aujourd'hui, les deux sucreries de l'île font partie chacune d'un complexe comprenant une centrale thermique. Ces centrales produisent de l'énergie à partir de la bagasse pendant la campagne sucrière, et à partir de charbon pendant l'intercampagne.

Les évolutions ont également concerné la variété de canne à sucre cultivée. Les recherches agronomiques au cours du XX<sup>ème</sup> siècle ont permis de mettre au point, entre autre grâce à la technique d'hybridation, des variétés de canne à sucre particulièrement bien adaptées aux conditions du milieu dans lequel elles sont cultivées et offrant des rendements intéressants.

La principale variété de canne cultivée actuellement à la Réunion est la R570 qui satisfait deux conditions primordiales :

- un bon rendement à l'hectare avec des richesses en sucre assez élevées.
- une bonne résistance aux différents parasites de la canne, tel que le boreer.

Cependant la Réunion est victime depuis 20 ans d'un autre parasite qui affecte aujourd'hui la totalité de l'île : le ver blanc. Celui-ci attaque surtout les racines de la canne la fragilisant et perturbant son développement. C'est la lutte biologique qui est mise en avant pour combattre le ver blanc ; en effet, l'introduction d'un de ses parasites est actuellement en cours.

### **III- L'importance économique de la production rhumière.**

Aujourd'hui, la canne à sucre est la première production agricole mondiale en tonnage, avec 1 040 millions de tonnes en 1993 (Annuaire F.A.O cité par Fahrasmane et Ganou-Parfait (1997)), devant le riz et le blé. Dans tous les pays producteurs de sucre de canne, la mélasse est utilisée pour fabriquer de l'alcool destiné à des utilisations variées (alcool de bouche, alcool carburant, etc).

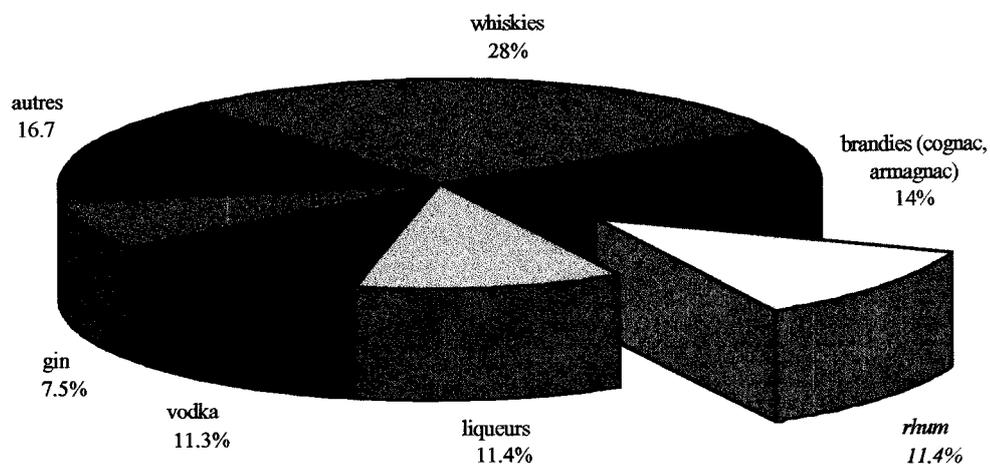
Le rhum est quant à lui le troisième spiritueux le plus consommé dans le monde. Avec plus de 500 millions de litres d'alcool pur produit par an, il représente 11,4% du marché des spiritueux, derrière les whiskies et les brandies, mais devant tous les autres alcools blancs comme le gin ou la vodka (figure 3). Le premier producteur mondial de rhum est le Brésil.

Au niveau national, suite à la surproduction qui suivit la fin de la première guerre mondiale, des quotas de rhum à l'importation furent imposés par le gouvernement français, aux différentes colonies françaises de l'époque. Depuis, ces mêmes colonies, devenues entre temps Départements d'Outre-Mer ou indépendantes (Madagascar), sont soumis à ce régime de contingentement qui les dispense de surtaxes. La répartition du contingentement en 1992 est donnée figure 4. Compte tenu de la baisse récente de la consommation globale de rhum en France, le contingentement total a été ramené à 90 000 HLAP par an en 1996. Madagascar a pour sa part perdu son régime de contingentement.

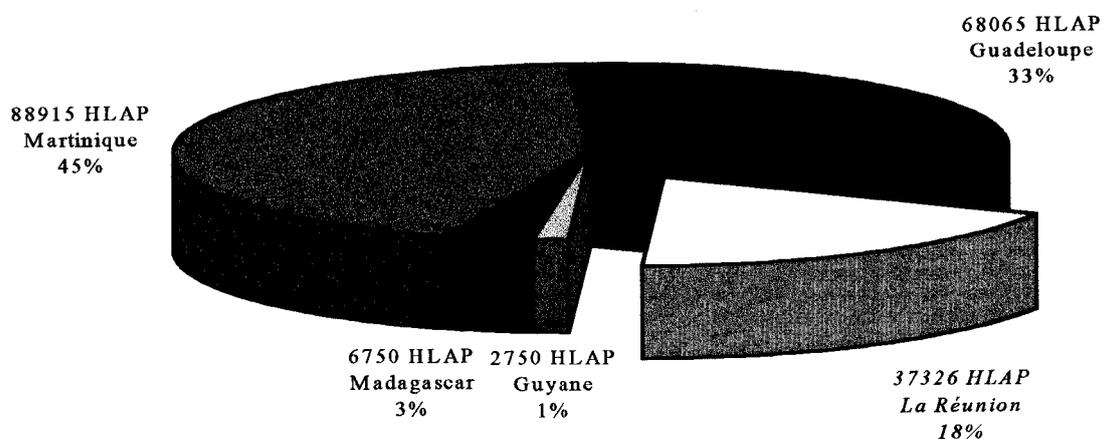
A la différence des Antilles, l'île de la Réunion n'est pas contingentée sur son propre territoire, ce qui explique en partie l'augmentation régulière de la consommation locale de rhum qui a atteint en 1960 le chiffre de 11 litres d'alcool pur par an et par habitant de plus de 20 ans. Ce phénomène s'inscrit dans un contexte social où le rhum a sa place.

Au niveau régional, ce qui distingue la production de rhum de la Réunion de celle des Antilles est la permanence de la production sucrière. En effet, à la Réunion, la production de sucre est toujours restée une priorité depuis le début de la culture de la canne. De ce fait la

**Figure 3 : Répartition de la consommation des différents spiritueux dans le monde**



**Figure 4 : Répartition des importations du rhum depuis les DOM et Madagascar vers la métropole en 1992**



production de rhum (bien que datant des débuts de l'exploitation de la canne à sucre à la Réunion) a toujours été une production de rhum traditionnel. La production de rhum agricole est demeurée marginale. Ceci est d'ailleurs le cas de la presque totalité des pays producteurs de sucre et seules les Antilles françaises font exception avec une production importante de rhum agricole, notamment à la Martinique. Ce schéma est même représentatif de la production globale dans le monde puisque le rhum agricole représente moins de 1% de la production mondiale de rhum. Dans le cas de la Martinique, c'est la crise de la filière sucre qui a poussé les industriels à se tourner vers ce type d'utilisation de la canne à sucre. La production de rhum à la Réunion est pour sa part essentiellement constituée de rhum traditionnel et de rhum léger.

Même si le rhum constitue une façon de valoriser les sous-produits des sucreries que sont les mélasses, le poids économique du rhum à la Réunion est non négligeable. Le rhum était au troisième rang des exportations de la Réunion en 1992. De plus, si l'on additionne tous les produits issus de la filière canne-sucre-rhum (ces trois produits étant indissociables), on obtient plus de 70% de la totalité des recettes à l'exportation du département.

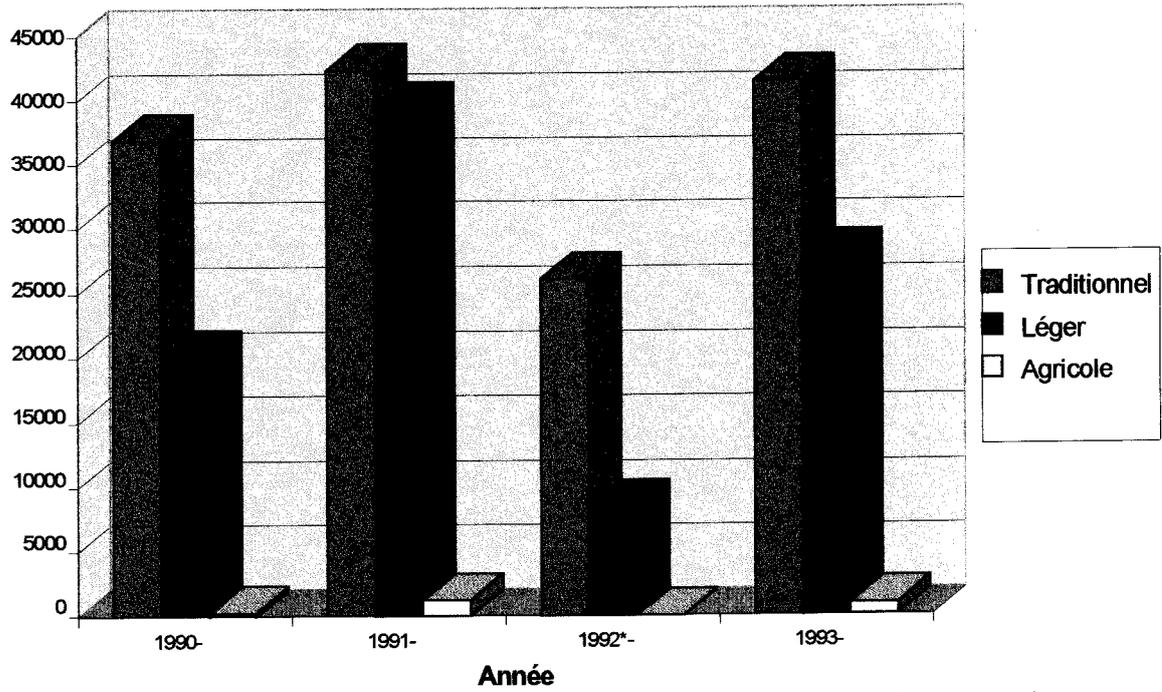
Il existe sur l'île trois distilleries : la distillerie de Savanna à Bois-Rouge, la distillerie Rivière-du-Mât à Saint-Benoît et la distillerie Isautier à Saint-Pierre, cette dernière étant plus artisanale. La production totale sur l'île tend à se stabiliser. Seule l'année 1992-93 présente une diminution exceptionnelle due au transfert de la distillerie de Savanna sur le site de Bois-Rouge (figure 5). Ainsi la production de 1996 est d'environ 80 000 hl d'alcool pur avec un volume de production pour le rhum agricole qui ne représente que 1% du volume total de rhum produit à la Réunion.

La distillerie de Savanna est située à proximité du complexe de Bois-Rouge. Elle reçoit directement la mélasse de la sucrerie, qu'elle stocke dans deux citernes de 2000 m<sup>3</sup> chacune. L'énergie est fournie soit par la sucrerie, soit par la centrale thermique. La distillerie de Savanna fabrique du rhum exclusivement à partir de mélasse. Sa production en 1996 était de 46 243 hl d'alcool pur répartis en fonction de la qualité du produit (figure 6).

Depuis 1972, les producteurs de rhum sont réunis au sein du Groupement d'Intérêt Economique (G.I.E) qui assure la commercialisation d'un produit issu de toutes les distilleries de l'île : le rhum « Charrette ». Cependant chaque distillerie conserve ses produits propres qu'elle met sur le marché le plus souvent sous la forme de cocktails, de punches ou encore de rhums vieux et de rhums agricoles.

Production (en HLAP)

**Figure 5 : Production de rhum à la Réunion**



(\* : fermeture de Savanna pour cause de transfert sur le site de Bois-Rouge)

La commercialisation en métropole des rhums réunionnais, tel que le rhum « Charrette », demeure faible ; mais le marché étranger, notamment les pays de la C.E.E, est important. Il est toutefois essentiel pour les producteurs de trouver de nouveaux marchés et de porter leurs efforts sur la qualité des produits, dans la mesure où à l'horizon de l'an 2002 se profile un changement dans la réglementation de la commercialisation du rhum. Les avantages fiscaux dont bénéficient les produits des D.O.M. par rapport aux produits des pays A.C.P. (Afrique-Caraïbes-Pacifique) vont s'effacer mettant ainsi en difficulté toute la filière rhum des D.O.M. En effet, le coût de production dans les pays A.C.P. est beaucoup plus compétitif, du fait de la main d'oeuvre bon marché.

\*

Le rhum s'inscrit dans l'histoire de chacun des pays ou région producteurs. Chaque région possède son rhum avec ses caractéristiques propres. Chacune revendique sa façon de travailler pour expliquer la typicité de son rhum. Mais à ce « savoir-faire », s'ajoutent évidemment un effet variétal et un effet terroir qui expliquent la grande diversité de rhum existant à travers le monde.

Une constante recherche de la meilleure qualité possible pousse les industriels à vouloir mieux connaître leur produit et à entreprendre pour cela des travaux de recherche.

C'est dans ce contexte que ce travail a été entrepris. Ce travail porte sur une étape cruciale de la fabrication du rhum, la fermentation, qui même si elle est maîtrisée en grande partie dans la pratique, reste le point qui offre le plus de possibilités d'amélioration de la qualité finale du produit. Le travail qui nous a été confié est le produit d'une collaboration entre la Distillerie de Savanna et l'Université de la Réunion.

# SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.

## ETAT DES CONNAISSANCES SUR LE

### RHUM

---

Vu l'importance économique de la production de rhum, on comprend que de nombreuses recherches concernant le rhum aient été effectuées. Ces recherches ont porté aussi bien sur la fermentation, étape cruciale dans l'élaboration de l'eau-de-vie, que sur la composition du produit final.

Dans ce chapitre, il nous a semblé intéressant de présenter l'étude bibliographique en trois parties qui reprennent les trois orientations bien distinctes qu'ont privilégiés les différents sujets de recherches sur le rhum. Ces trois parties sont :

- Les études microbiologiques : cette partie concerne tous les travaux effectués sur la flore rencontrée dans le milieu rhumier.

- Les études biochimiques : cette partie traite des différents travaux concernant la biosynthèse de certains constituants des rhums, tels que les alcools supérieurs et les acides gras, ou celle de certains composés indésirables.

- Les études sur la composition chimique des rhums : de nombreux auteurs se sont attachés à déterminer les constituants des rhums afin de pouvoir éventuellement les distinguer de ceux des autres eaux-de-vie.

## I- Les études microbiologiques.

### I-1. Origine de la flore rhumière.

Il existe dans les milieux rhumier une flore variée qui peut avoir trois origines différentes. Cette flore peut provenir de la matière première ou bien être introduite par l'homme soit de manière raisonnée, soit accidentellement.

Cette flore ne se développe pas systématiquement : l'homme cherche en effet à favoriser les micro-organismes qui l'intéressent.

#### I-1.1. Les levures responsables de la fermentation.

De nos jours, la fermentation est dans la plupart des cas réalisée par une ou plusieurs souches de levures appartenant à l'espèce *Saccharomyces Cerevisiae*. L'implantation de cette espèce de levure est l'oeuvre de l'homme. Elle a progressivement remplacé les levures du genre *Schizosaccharomyces*, présentes naturellement dans le milieu. Ces dernières se développent trop lentement, permettant aux bactéries de se développer simultanément et donc de nuire dans la plupart des cas à la qualité du rhum. Cependant, dans certains cas, et notamment pour la fabrication du rhum « Grand Arôme », le développement bactérien est souhaité. Ce sont alors les levures du genre *Schizosaccharomyces* que l'on sélectionne pour la fermentation, en utilisant leur propriété osmophile. L'augmentation de la pression osmotique se fait par le recyclage des vinasses préalablement récupérées, que l'on laisse reposer et fermenter, puis que l'on utilise dans certaines proportions pour diluer la mélasse.

Dans le cas des rhums autres que le rhum « Grand Arôme », les levures de l'espèce *Saccharomyces Cerevisiae* sont introduites en masse dans le milieu fermentaire. Pour cela on procède soit par le développement d'une souche pure avec un appareil à levain, soit par l'utilisation de souches sélectionnées que l'on introduit directement dans la cuve de fermentation. Dans ce dernier cas, les levures se présentent sous la forme de Levures Sèches Actives (ou L.S.A.). L'utilisation de ces levures sèches actives éliminent les stades

préfermentaires qui peuvent être à l'origine de contaminations. L'existence dans la plupart des cas d'un caractère « killer » chez ces souches limite encore plus le risque de contamination. De plus, l'utilisation de ces levures limite les investissements liés à la mise en place d'appareils à levain et de préfermenteurs et simplifie de ce fait le travail dans les distilleries. Ces raisons expliquent le développement de cette méthode d'ensemencement chez les différents producteurs de boissons fermentées. En revanche, cette méthode nécessite l'achat régulier de levures en quantité importante.

### **I-1.2. Les accidents de fermentation.**

Un accident de fermentation est le développement de micro-organismes indésirables. Une mauvaise hygiène dans l'atelier de fermentation ou l'existence de conditions favorables au développement de micro-organismes indésirables sont les deux principales causes d'un accident de fermentation. Les agents responsables de ces accidents de fermentation sont des levures « sauvages », c'est à dire des levures présentes naturellement dans le milieu de la distillerie, et des bactéries.

Un accident de fermentation peut se traduire par la formation de composés nuisant à la qualité du rhum, par un arrêt prématuré de la fermentation entraînant une baisse de rendement, ou encore, ce qui est le cas le plus fréquent, par les deux phénomènes simultanément.

Les moyens de lutte contre ces infections sont généralement préventifs. Ce sont l'acidification du milieu afin de limiter le développement bactérien et une propreté à tous les stades de fabrication. Il est nécessaire de bien contrôler le bon développement des levures. L'utilisation d'antibiotiques est l'ultime recours contre les infections. Du fait de son coût onéreux et des risques de sélection à terme de souches résistantes, il est à éviter dans la mesure du possible.

\*

La flore rencontrée dans le milieu rumier est très variée et est constituée aussi bien de levures que de bactéries. De nombreux auteurs ont répertorié les différents micro-organismes rencontrés à toutes les étapes de la fabrication du rhum. Certains sont présents systématiquement, d'autres ont été rencontrés de manière exceptionnelle. Les tableaux n°1 et 2

**Tableau 1 : Inventaire de la flore levurienne aux différentes  
étapes de la fabrication du rhum  
(d'après Parfait et al. (1978))**

Levures identifiées	dans la matière première	dans le vin
<i>Candida guilliermondii</i>	+	
<i>Candida intermedia</i> var. <i>ethanophila</i>	+	
<i>Candida krusei</i>	+	+
<i>Candida mycoderma</i>	+	
<i>Candida parapsilosis</i> var. <i>intermedia</i>	+	
<i>Candida pseudotropicalis</i>	+	
<i>Candida saccharum</i>	+	
<i>Candida tropicalis</i>	+	+
<i>Endomyces magnusii</i>	+	
<i>Hansenula anomala</i>	+	+
<i>Hansenula minuta</i>		+
<i>Kloeckera apiculata</i>	+	
<i>Saccharomyces aceti</i>	+	+
<i>Saccharomyces acidifaciens</i>	+	
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>		+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+
<i>Saccharomyces chevalieri</i>	+	+
<i>Saccharomyces delbruecki</i>		+
<i>Saccharomyces marxianus</i>	+	
<i>Saccharomyces microellipsoides</i>		+
<i>Saccharomyces rosei</i>	+	
<i>Saccharomyces rouxii</i>	+	+
<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	+	
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>		+
<i>Schizosaccharomyces mellacei</i>	+	+
<i>Torulopsis candida</i>	+	
<i>Torulopsis glabratica</i>	+	+
<i>Torulopsis glabrata</i>	+	
<i>Torulopsis globosa</i>	+	+
<i>Torulopsis saccharum</i>	+	
<i>Torulopsis stellata</i>	+	+
<i>Rhodotorula</i>	+	
<i>Pichia membranaefaciens</i>	+	+
<i>Pichia fermentans</i>	+	
<i>Debaromyces</i>	+	+
<i>Zygosaccharomyces mussbaumeri</i>	+	
<i>Zygosaccharomyces major</i>	+	

**Tableau 2 : Inventaire de la flore bactérienne aux différentes étapes de la fabrication du rhum (d'après Parfait et al., 1978)**

Bactéries identifiées	dans le sol	dans la matière première	dans le vin
<i>Acetobacter mesoxydans</i>			+
<i>Acetobacter oxydans</i>			+
<i>Acetobacter suboxydans</i>			+
<i>Achromobacter</i>		+	
<i>Aerobacter aerogenes</i>	+	+	
<i>Alcaligenes</i>		+	
<i>Arthrobacter</i>	+	+	
<i>Bacillus amylobacter</i>			+
<i>Bacillus brevis</i>		+	
<i>Bacillus butyricus</i>			+
<i>Bacillus cereus</i>	+	+	
<i>Bacillus herbicola aureum</i>		+	+
<i>Bacillus levaniiformans</i>		+	
<i>Bacillus licheniformis</i>		+	
<i>Bacillus liodermos</i>		+	
<i>Bacillus longissimus lafar</i>		+	
<i>Bacillus megaterium</i>	+	+	+
<i>Bacillus mesentericus</i>			+
<i>Bacillus mesentericus fuscus</i>		+	
<i>Bacillus proteus</i>		+	
<i>Bacillus sp</i>		+	
<i>Bacillus steararothermophilus</i>		+	
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+
<i>Bacillus vulgatus</i>		+	
<i>Bacterium saccharalis</i>		+	
<i>Brevibacterium imperiale</i>		+	
<i>Bacterium sp</i>		+	
<i>Bacterium xylinum</i>		+	
<i>Bacterium xylinus</i>		+	
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	+	+	+
<i>Clostridium butyricum</i>	+	+	+
<i>Clostridium difficile</i>	+	+	+
<i>Clostridium propionicum</i>	+	+	+
<i>Clostridium saccharobutyricum</i>			+
<i>Clostridium subterminale</i>	+	+	+
<i>Corynebacterium</i>		+	
<i>Enterobacter</i>	+	+	
<i>Erwinia</i>		+	
<i>Escherichia</i>	+	+	
<i>Flavobacterium sp</i>		+	

**Tableau 2 : Inventaire de la flore bactérienne aux différentes étapes de la fabrication du rhum (suite)**  
(d'après Parfait et al., 1978)

Bactéries	dans le sol	dans la matière première	dans le vin
<i>Lactobacillus buchneri</i>		+	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	+	+	+
<i>Lactobacillus fermentum</i>	+	+	+
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	+	+	+
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	+	+	+
<i>Lactobacillus homohiochii</i>	+	+	+
<i>Lactobacillus leichmanii</i>	+	+	+
<i>Lactobacillus salicinus</i>	+	+	+
<i>Lactobacillus salivarius</i>	+	+	+
<i>Lactobacillus trichodes</i>	+	+	+
<i>Lactobacillus viridescens</i>	+	+	+
<i>Leuconostoc dextranicum</i>	+	+	+
<i>Leuconostoc mesenteroïdes</i>	+	+	+
<i>Leuconostoc oenos</i>	+	+	+
<i>Leuconostoc paramesenteroïdes</i>	+	+	+
<i>Micrococcus candidus</i>		+	
<i>Micrococcus canetidus</i>		+	
<i>Micrococcus caseolyticus</i>		+	
<i>Micrococcus luteus</i>		+	
<i>Micrococcus varians</i>		+	
<i>Pediococcus cerevisiae</i>	+	+	+
<i>Propionibacterium technicum</i>			+
<i>Pseudomonas</i>		+	
<i>Sarcina flava</i>		+	
<i>Sarcina hansenii</i>		+	
<i>Serratia</i>		+	
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	
<i>Streptobacilles</i>		+	
<i>Streptomyces</i>		+	+

dressent un inventaire non exhaustif des micro-organismes rencontrés dans le milieu de la canne à sucre. Toutes les recherches portant sur cette flore banale des milieux rhumiers ont été réalisées aux Antilles et plus généralement dans l'ensemble des Caraïbes.

Les intérêts de telles recherches sont multiples. Elles permettent tout d'abord une meilleure connaissance du milieu environnemental dans lequel les industriels travaillent et donc des risques encourus. Elles permettent également l'étude, après isolement, de souches pures particulièrement bien adaptées aux conditions du milieu et présentant des caractères bien définis ; ce qui permet d'envisager soit des utilisations adaptées dans le cas de micro-organismes jugés intéressants, soit des moyens de lutte appropriés dans le cas de micro-organismes indésirables.

## **I-2. Les levures rencontrées dans le milieu rhumier**

### **I-2.1. Evolution des recherches.**

Depuis les découvertes de Pasteur sur l'existence des micro-organismes responsables de la fermentation, de nombreux travaux d'identification ont été entrepris pendant toute la première moitié du XX<sup>ème</sup> siècle. Dès 1942, Arroyo traite du problème de la sélection des souches pures de levures et en 1946 Kervegant souligne déjà que certaines distilleries fonctionnent avec des *Saccharomyces cerevisiae* introduits par l'homme et d'autres avec des *Schizosaccharomyces pombe* présents naturellement dans le milieu. Kervegant ajoute que l'activité de ces levures aboutit à des produits nettement différents en qualité. Il réalise un premier inventaire des levures rencontrées dans les distilleries. En 1960, avec les travaux de El Tabey-Shehata d'une part et de Mayeux d'autre part, une liste importante des différentes levures rencontrées dans le milieu rhumier est dressée. En 1975, Parfait et Sabin complètent cette liste.

Lorsque l'on regarde cette liste, on constate que de nombreuses familles de levures sont représentées, avec une nette prédominance du genre *Saccharomyces*.

## I-2.2. Les différentes levures et leur impact sur la fermentation.

La presque totalité de ces levures se développent seulement lors de contaminations, pouvant entraîner des accidents de fermentation (faible production d'alcool, augmentation de l'acidité, etc). Parmi les levures « sauvages » rencontrées, certaines sont productrices d'une forte acidité (c'est le cas de *Saccharomyces aceti*, de divers *Brettanomyces*, et de nombreux *Candida*) ; d'autres, d'une grande quantité d'acétate d'éthyle (*Kloeckera apiculata*, *Pichia membranaefaciens*, *Hansenula anomala*). Dans le cas de telles contaminations, il est nécessaire de nettoyer entièrement les cuves avant de reprendre le processus de production. Il est plus délicat d'enrayer une contamination levurienne qu'une contamination bactérienne, ces dernières étant plus sensibles aux antibiotiques. Parmi ces levures, toutes ne se développent pas ou mal en anaérobiose du fait de l'absence du matériel enzymatique nécessaire à la fermentation ; ce qui limite les possibilités de contamination pendant la phase fermentaire.

Comme nous l'avons dit, les levures de l'espèce *Schizosaccharomyces pombe* osmophiles sont recherchées par les distilleries dans le cas particulier de la production du rhum « Grand Arôme ». Elles sont alors associées à une importante flore bactérienne. Leur développement est favorisé par l'apport de vinasses qui assurent une forte pression osmotique et de ce fait limitent la multiplication des autres types de levures. Leur croissance lente, liée à leur mode de reproduction asexué particulier (la scissiparité), permet le développement bactérien. Les temps de fermentation sont compris entre une à deux semaines.

\*

La grande variété de levures rencontrées dans la matière première souligne l'importance de l'ensemencement et la nécessité d'une bonne conduite de l'atelier de fermentation.

### **I-3. Les bactéries rencontrées dans le milieu rhumier.**

#### **I-3.1. Evolution des recherches et résultats.**

Jusqu'au début du XX<sup>ème</sup>, l'existence et surtout le rôle des bactéries dans la fermentation étaient ignorées. A partir de 1905, Allan publie plusieurs études faisant état de

l'existence de certaines bactéries dans les différents milieux de fermentation rencontrés. En 1946, Kervégant mentionne l'existence de bactéries pouvant jouer un rôle positif ou négatif dans la production de certains rhums. Il note déjà l'importance des bactéries butyriques dans l'élaboration du bouquet des rhums « Grand Arôme » et parle de bactéries responsables de défauts dans la qualité du rhum. Puis ce sont les travaux réalisés par Parfait et al. (1978) et Ganou-Parfait et al. (1989) qui traitent de manière plus approfondie de la flore bactérienne présente dans les milieux rhumiers.

Une grande variété de bactéries a été isolée et identifiée dans les milieux rhumiers (Tableau 2). Elle atteste de la difficulté rencontrée pour déterminer les responsables de telle ou telle caractéristique d'un produit. Dans certains cas, le développement d'une bactérie peut être responsable de la formation d'un composé indésirable ; à l'inverse dans d'autres cas, l'absence d'une bactérie peut se traduire par la perte de notes positives recherchées. Les différentes études menées ont également permis de connaître l'origine des bactéries.

Compte tenu des nombreuses étapes conduisant au rhum, l'origine des bactéries peut être multiple. Ainsi elles peuvent provenir de la canne à sucre lorsque celle-ci a subi des détériorations (brûlage des cannes, attaques parasitaires). Elles peuvent également se développer au cours du process sucrier lors des différentes étapes de l'extraction du sucre. Enfin elle peuvent provenir des eaux de dilution ou, dans le cas particulier de la fermentation de type « Grand Arôme », de la vinasse utilisée pour la dilution de la mélasse.

### I-3.2. Les différentes familles de bactéries et leur impact sur la fermentation.

Parmi les bactéries isolées, c'est dans la famille des *Bacillaceae* que l'on retrouve le plus grand nombre d'espèces différentes. On retrouve à tous les stades de la fermentation, que ce soit à partir de jus de canne, de sirop ou de mélasse, des *Bacillaceae* aérobies et anaérobies. On distingue à l'intérieur de cette famille deux genres : le genre des *Clostridium* et celui des *Bacillus*.

- La présence des *Clostridium* dans les différents milieux de fermentation est systématiquement citée dans la bibliographie. Leur présence est également notée dans le sol dont ils sont probablement issus. Il existe de nombreuses espèces différentes présentes dans le milieu mais ce sont les espèces butyriques qui sont le plus souvent citées et que l'on juge responsables du bouquet des rhums « Grand Arôme ». Ces *Clostridium* ont donc une action bénéfique, à nuancer toutefois puisque certains auteurs pensent qu'ils peuvent être parfois à l'origine de la formation d'acrylates. Ce sont des bactéries anaérobies strictes généralement thermorésistantes sous forme de spores.

- Les *Bacillus*, présents également en grande quantité, sont quant à eux aérobies. Il est donc rare de les rencontrer au cours de l'étape de fermentation ; ils se développent de préférence lors des stades qui précèdent cette phase ou qui la suivent. Leur présence se traduit souvent par la formation d'un voile de surface. Cette flore banale est généralement jugée indésirable.

La famille des *Lactobacillaceae* est également bien représentée dans le milieu rhumier. Des bactéries appartenant à trois genres de cette famille ont été retrouvées.

- La plupart des bactéries présentes appartenant à cette famille, sont incluses dans le genre des *Lactobacillus*. Au sein de ce genre on peut également distinguer deux catégories de bactéries. Les *Lactobacillus* homofermentatifs qui ne produisent pas de CO<sub>2</sub> sur glucose, ni de mannitol sur fructose. Les *Lactobacillus* hétérofermentatifs qui, outre de l'acide lactique, produisent du CO<sub>2</sub>, de l'acide acétique et de l'éthanol sur glucose et du mannitol sur fructose. Ce sont les *Lactobacillus* les plus fréquemment rencontrés dans le milieu rhumier.

- Les bactéries du genre *Leuconostoc* proviennent généralement de la canne à sucre et sont redoutées par les sucriers. Elles n'ont qu'une très faible incidence sur la qualité des rhums car elles se développent très peu dans les conditions rencontrées dans les distilleries.

- Les bactéries du genre *Streptococcus* sont parfois présentes dans les milieux rhumiers mais ne s'y développent que très rarement.

La famille des *Acetobacteriaceae* est représentée par les bactéries du genre *Acetobacter*. Les *Acetobacter* sont régulièrement présents dans le milieu rhumier et ont souvent une action négative car ils oxydent l'éthanol en acide acétique. Cependant ce sont généralement des germes aérobies qui ne peuvent donc pas se développer pendant la phase de fermentation. Si l'on prend soin de distiller rapidement le vin après la fermentation, leur action n'est pas à redouter.

Des bactéries appartenant à la famille des *Corynebacteriaceae* sont également présentes. Elles sont indésirables car on estime qu'elles sont en partie responsables de la formation de l'alcool allylique, de l'acroléine et de l'acide acrylique présents dans les rhums défectueux (Lencrerot et al., 1984). Leur métabolisme essentiellement aérobie permet de les éviter en soignant les étapes qui précèdent la fermentation et en distillant rapidement le vin.

Les bactéries de la famille des *Micrococcaceae* retrouvées dans les milieux rhumiers appartiennent principalement au genre des *Micrococcus*. Ce sont également des bactéries aérobies. Elles sont généralement déclarées indésirables en raison de la qualité médiocre des rhums issus des vins sur lesquels leur activité a été mise en évidence.

Les seuls représentants de la famille des *Propionibacteriaceae* identifiés dans les milieux rhumiers appartiennent au genre *Propionibacterium*. Ce sont des bactéries anaérobies qui ont une activité importante à la fois quantitativement et qualitativement dans certaines productions. On estime qu'elles peuvent avoir une action positive sur la qualité des rhums présentant un riche bouquet.

Les bactéries sulfato-réductrices sont des germes anaérobies que l'on retrouve généralement dans les eaux de dilution de mauvaise qualité. Elles produisent du H<sub>2</sub>S et sont responsables de la présence d'une partie des composés soufrés retrouvés dans les rhums.

Les autres bactéries rencontrées n'ont généralement pas d'impact sur la qualité des rhums. Elles sont éliminées dès les premiers stades de la fermentation.

\*

Nous venons de voir que les bactéries sont présentes en grande quantité dans les milieux rhumiers. Lorsqu'elles prennent le pas sur les levures les conséquences peuvent être désastreuses pour la distillerie et aboutir à une production avariée. Ce risque grave explique l'importance de l'hygiène dans une telle industrie : il est essentiel de soigner tous les stades de la fabrication. On retrouve alors le double intérêt de l'utilisation de souches pures de levures : elles permettent d'obtenir un vin puis un rhum de qualité constante ; de plus, du fait de la technique employée pour les introduire dans le milieu, c'est à dire l'ensemencement de masse, leur développement est favorisé par rapport à celui des bactéries. Le rendement ainsi que la productivité s'en trouvent améliorés.

C'est à partir de cette liste de micro-organismes rencontrés dans les milieux rhumiers que nous avons choisi les levures et les bactéries qui ont fait l'objet de nos recherches.

## **II- Les études biochimiques**

Outre les travaux portant sur la qualité microbiologique des différents milieux utilisés, de nombreuses études sur la biochimie des micro-organismes rencontrés ont été réalisées. Elles portent soit sur des constituants du rhum quantitativement majoritaires (en dehors de l'éthanol) tels que les alcools supérieurs, soit sur des constituants quantitativement minoritaires ou normalement absents et dont la présence en trop grande proportion dans le produit final indique une anomalie lors de la phase de fermentation. Ces composés ont un impact certain sur la qualité des rhums.

## **II-1. Les constituants majoritaires du non-alcool.**

### **II-1.1. Définition du non-alcool.**

Nous appellerons **non-alcool** tous les composés du rhum autres que l'éthanol, le méthanol et bien entendu l'eau.

Les constituants majoritaires du non-alcool sont d'une part les alcools supérieurs suivants : le propan-1-ol, le butan-1-ol, le butan-2-ol, le 2-méthyl-1-propanol ou isobutanol, le butan-1-ol, le 2-méthyl-1-butanol et le 3-méthyl-1-butanol, ces deux derniers étant communément appelés les alcools amyliques (bien que l'alcool amylique soit en fait le 1-pentanol) ; et d'autre part l'acétate d'éthyle et l'acétaldéhyde ou éthanal. Ces composés représentent la presque totalité de la charge en non-alcool. Ce sont donc eux que l'on dose de manière systématique lors des analyses chromatographiques courantes et qui sont à la base des différentes appellations des rhums. A tous ces composés, il faut cependant ajouter l'acide acétique qui représente plus de 90% des acides présents dans le rhum, et le 2-furancarboxaldéhyde ou furfural.

### **II-1.2. Les alcools supérieurs.**

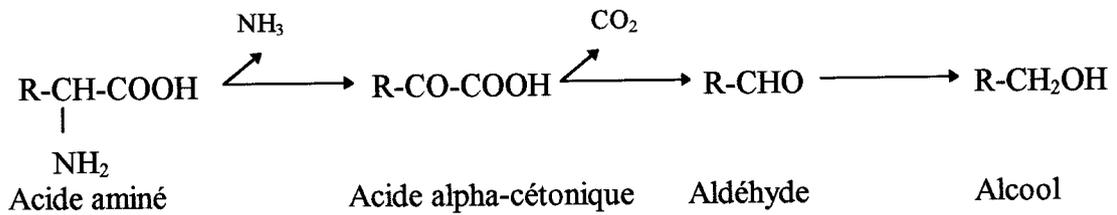
Connus depuis longtemps comme étant des constituants des différentes boissons alcoolisées, ils ont fait l'objet de nombreuses études depuis le début du XX<sup>ème</sup> siècle. C'est Ehrlich qui le premier, en 1907, propose une voie de synthèse de ces alcools supérieurs à partir des acides aminés. Il établit une relation métabolique entre les acides aminés et les alcools supérieurs (figure 7). De même, il établit que les levures forment du tyrosol et du tryptophol à partir respectivement de la tyrosine et du tryptophane. En 1911, Neubauer et Fromherz démontrent que les acides cétoniques sont des intermédiaires dans la réaction d'Ehrlich. Les travaux se sont ensuite multipliés pour aboutir finalement à un schéma relativement complet décrivant la formation de plusieurs alcools supérieurs à partir des acides aminés, mais aussi des sucres. En effet, la formation des alcools supérieurs à partir des acides aminés n'est responsable que de 10% de la quantité totale d'alcools supérieurs présents dans les différentes

boissons fermentées (Ribereau-Gayon et Peynaud, 1959). En fait, le pyruvate, formé à la fin de la glycolyse, peut emprunter d'autres voies que celle conduisant à l'éthanol et aboutir, toujours par l'intermédiaire des acides cétoniques, à la synthèse d'alcools supérieurs comme l'isobutanol ou le 3-méthyl-1-butanol ou à celles d'acides aminés (figure 8). Toutes ces réactions font intervenir un certain nombre d'enzymes et de coenzymes (figures 9, 10 et 11). La formation de ces alcools supérieurs est fonction de nombreux paramètres. Ainsi la composition du milieu en acides aminés va grandement influencer sur la quantité d'alcools supérieurs formés durant la fermentation. Un autre facteur important affectant le taux d'alcools supérieurs formés est la nature du ou des micro-organismes impliqués dans la fermentation (Verachtert, 1970 ; Suomalainen et al., 1972). D'autres facteurs tels que l'ajout de sulfate d'ammonium, le pH ou encore la température ont également une influence sur la quantité d'alcools supérieurs formés.

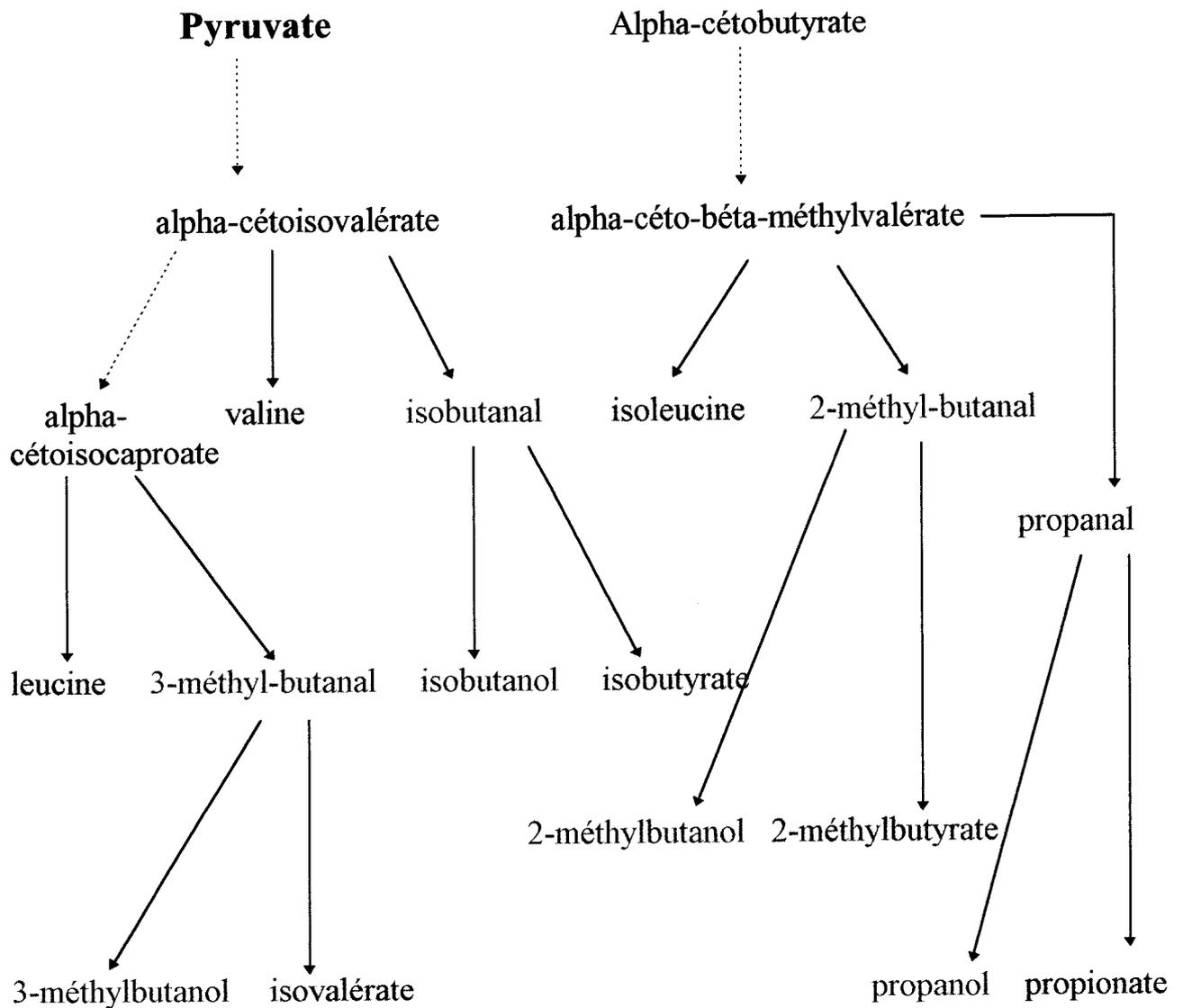
Il apparaît donc que l'ensemble des réactions conduisant à la formation des alcools supérieurs, constituants importants du non-alcool des boissons alcoolisées, est actuellement bien connu. En distillerie, dans la mesure où l'on subit les fluctuations de la qualité de la matière première, le seul facteur sur lequel on peut intervenir est le choix de la levure à utiliser pour la fermentation. Ce point fera l'objet d'une étude plus approfondie dans un des chapitres suivants.

### **II-1.3. L'acétate d'éthyle et l'éthanal.**

L'acétate d'éthyle est un constituant important, à la fois quantitativement et qualitativement, des boissons alcoolisées et notamment du rhum. Quantitativement, il représente plus de 80% des esters totaux. Le taux de ces esters est l'un des critères utilisés pour définir l'appellation du rhum « Grand Arôme » puisque une teneur minimale de 500 g/HLAP est nécessaire. En revanche, ils ne sont souhaités qu'à l'état de traces dans les rhums légers. Qualitativement, l'acétate d'éthyle est un composé volatil qui a une influence certaine sur la qualité organoleptique des produits dans lesquels il se trouve. Il possède une note qui évolue de « fruité » à « odeur de solvant » suivant sa concentration. Sa synthèse a été étudiée par Nordström en 1964 (cité par Äyräpää et al., 1973). Il a démontré que plusieurs voies



**Figure 7 : Réaction d'Ehrlich**



**Figure 8 : Relations métaboliques entre les acides aminés branchés, les alcools supérieurs et les acides gras correspondant (d'après Nordström, 1964).**

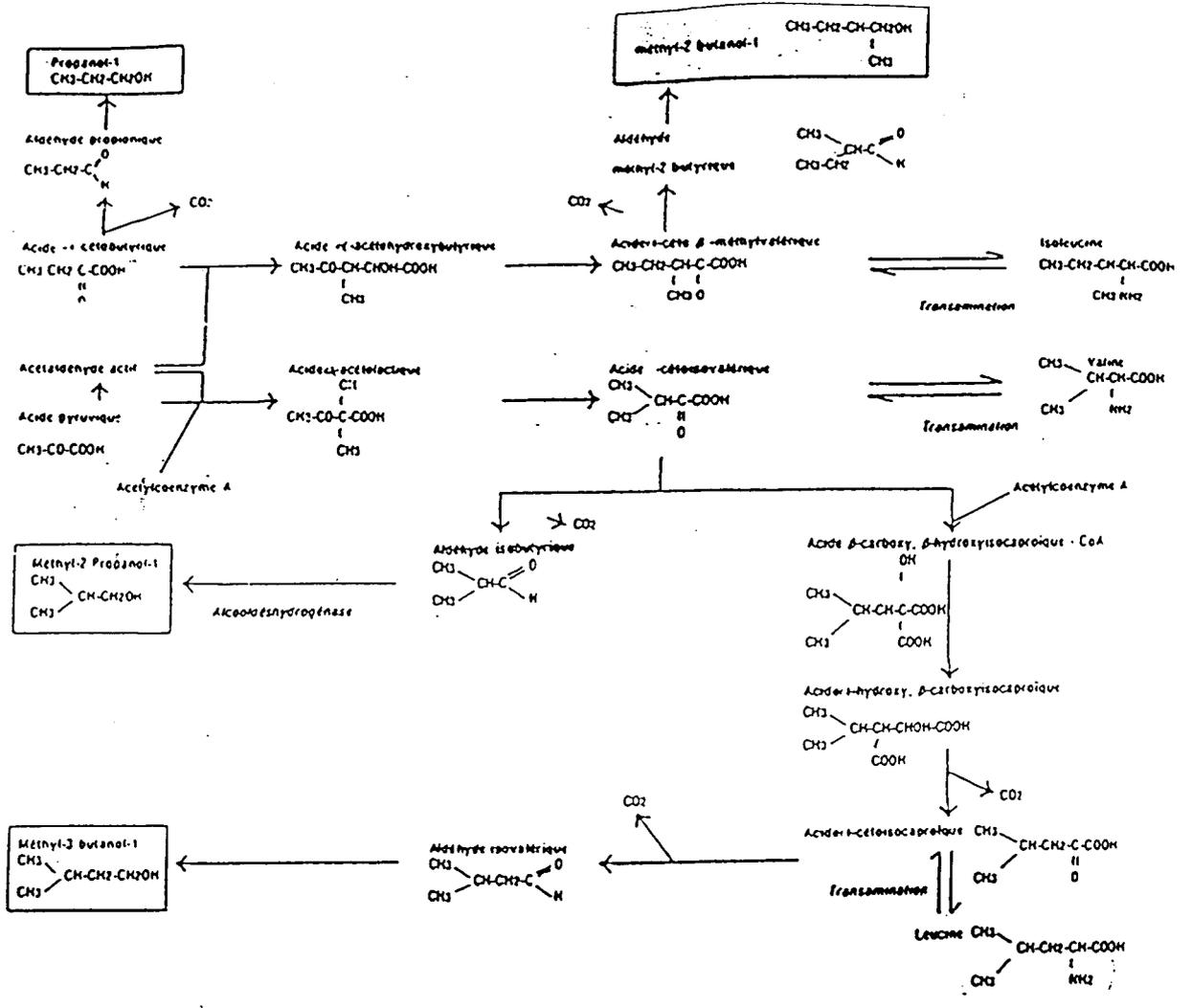
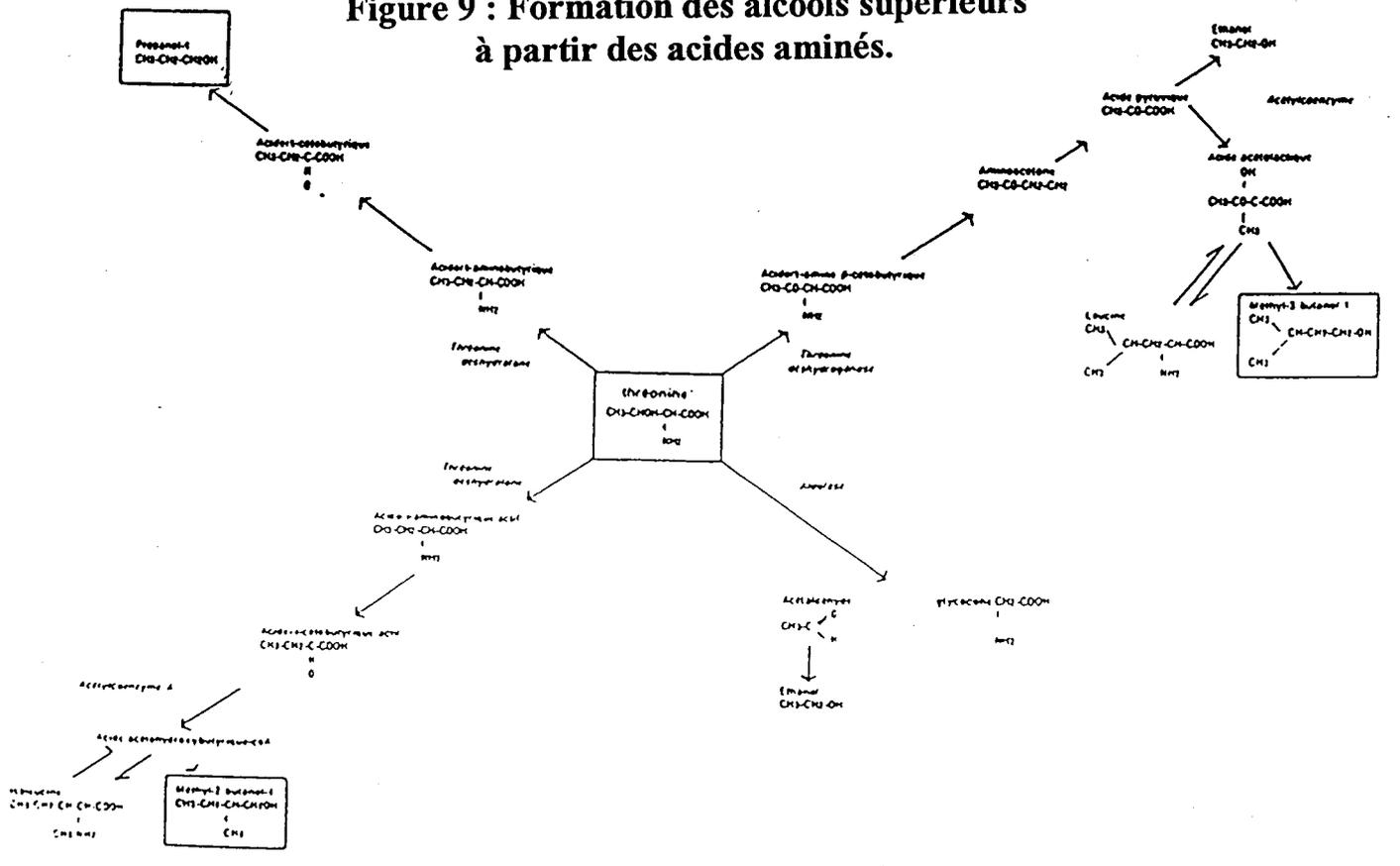


Figure 9 : Formation des alcools supérieurs à partir des acides aminés.



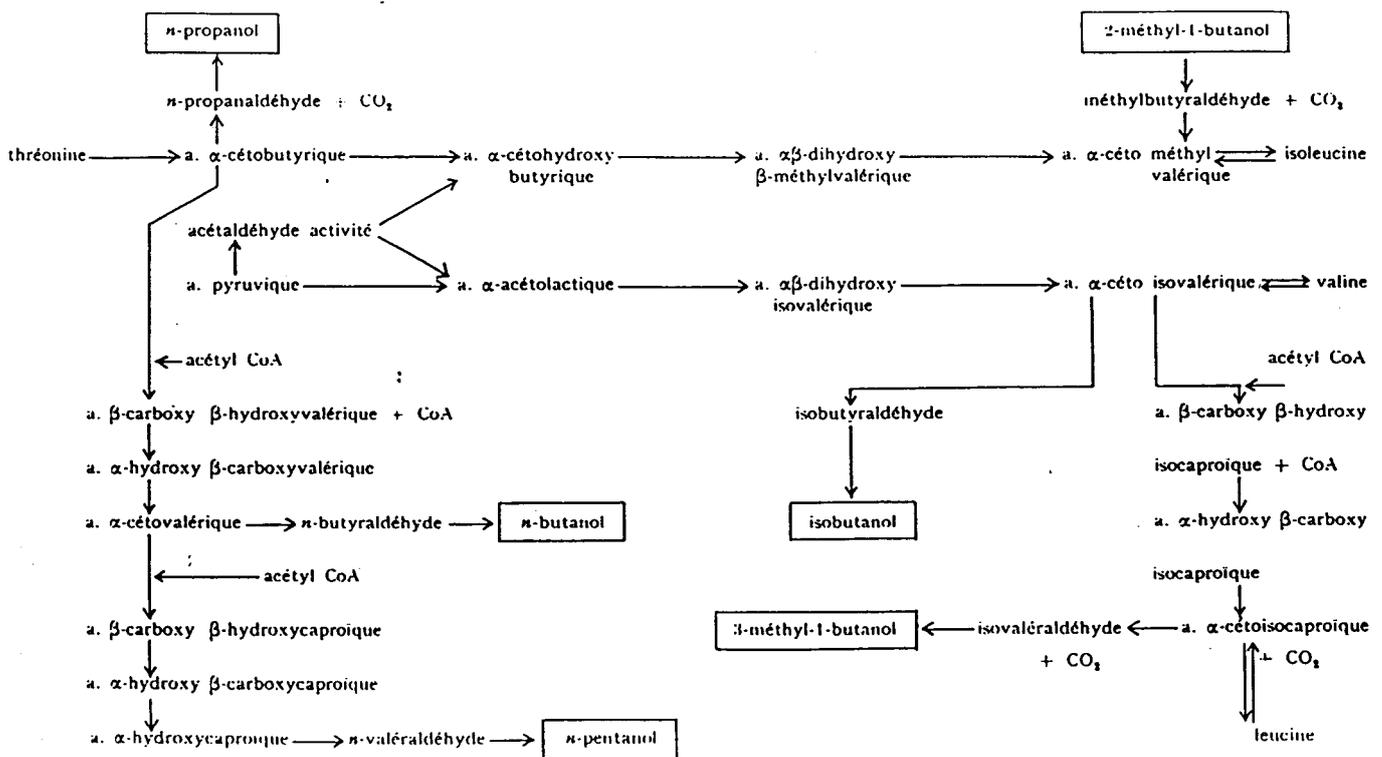


Figure 10 : Formation des alcools supérieurs (d'après Webb et Ingraham, 1963).

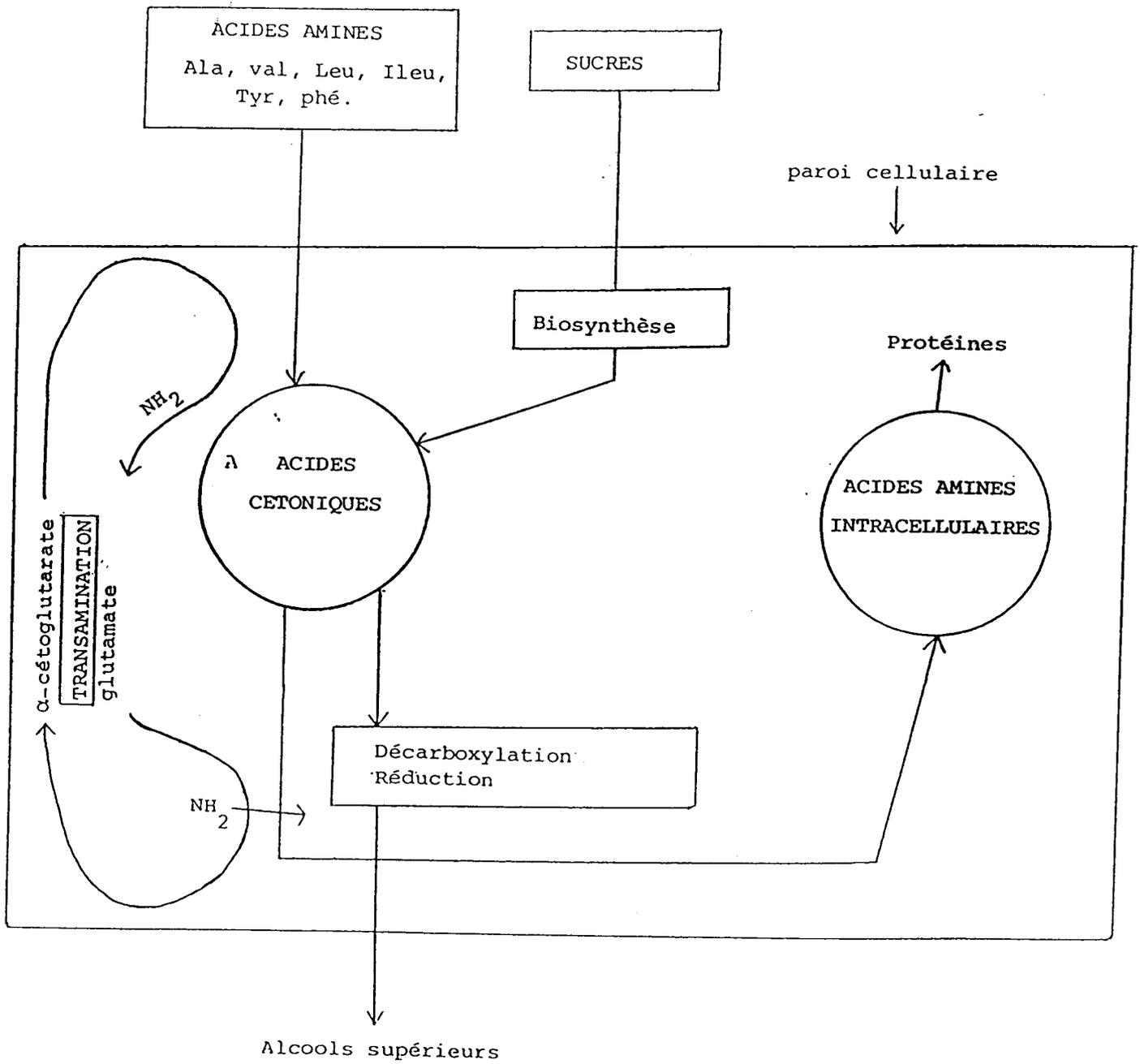
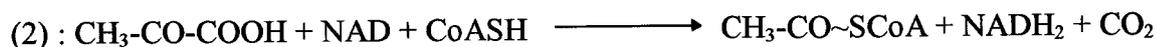


Figure 11 : Mécanismes de formation des alcools supérieurs (d'après Ayräpää, 1973).

permettant d'aboutir à la formation d'acétate d'éthyle et aux autres esters éthyliques existent (figure 12). Bien que l'on ait pensé au départ à une simple réaction entre l'acide acétique et l'éthanol, il s'est avéré que les réactions d'estérification qui se produisent durant la fermentation sont 1000 fois plus rapides et que l'équilibre entre les acides et les alcools est différent de celui attendu dans le cas de cette réaction. Nordström a démontré que les principales réactions d'estérification ont lieu dans la cellule. Les acylcoenzymeA, tel que le manolylcoenzymeA, agissent comme des intermédiaires indispensables à la formation de l'acétate d'éthyle et des autres esters éthyliques. Ils sont issus eux-mêmes de plusieurs réactions (figure 13). Les acylcoenzymeA réagissent avec l'alcool pour donner l'ester correspondant. La composition en alcools supérieurs va donc déterminer la composition du produit en esters. De nombreux autres paramètres tels que la composition du milieu, la température (Bavositto et al., 1961) ou l'aération (Nordström, 1965) influent sur la composition en esters. En ce qui concerne les boissons distillées, Parfait et al. (1972) ont montré que le fait de conserver les levures au cours de la distillation entraîne une augmentation du taux d'esters des rhums.

Avec le furfural, l'éthanal est l'un des composés carbonylés les plus importants quantitativement dans le rhum. Il est souvent souhaité en faible quantité mais, lorsqu'il dépasse un certain seuil, il donne une note désagréable au produit. C'est un composé très volatil, intermédiaire lors de la formation de l'éthanol au cours de la fermentation (figure 14). La quantité d'éthanal formé est liée aux conditions de milieu et notamment au pH ou à la température.

## Figure 12 : Formation de l'acétate d'éthyle.



**Puis alcoolise du composé acétyl-CoA :**



acétyl-CoA

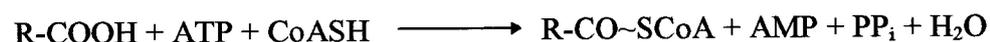
éthanol

acétate d'éthyle

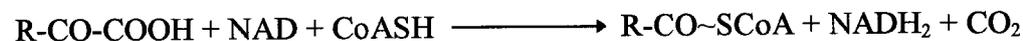
## Figure 13 : Formation des esters à partir des acides aliphatiques monocarboxyliques

**Il y a d'abord formation des acyl-CoA.**

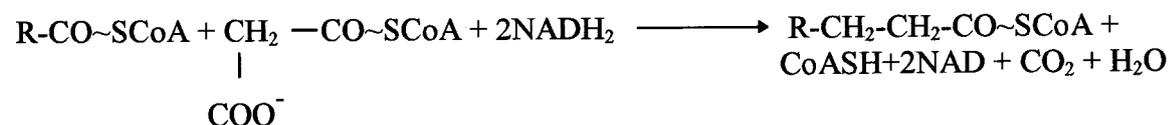
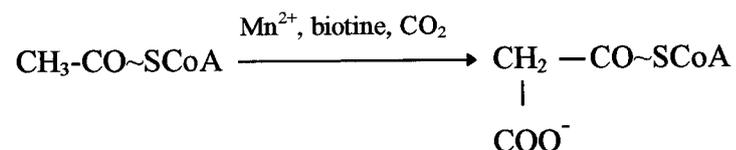
**Par activation des acides monocarboxyliques :**



**Depuis les acides alpha-cétoniques par décarboxylation oxydative :**



**A partir d'intermédiaires de la synthèse d'acides gras :**



**Les esters sont alors formés par alcoolise des composés acyl-CoA :**

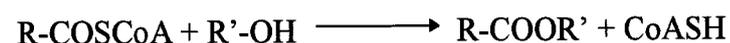
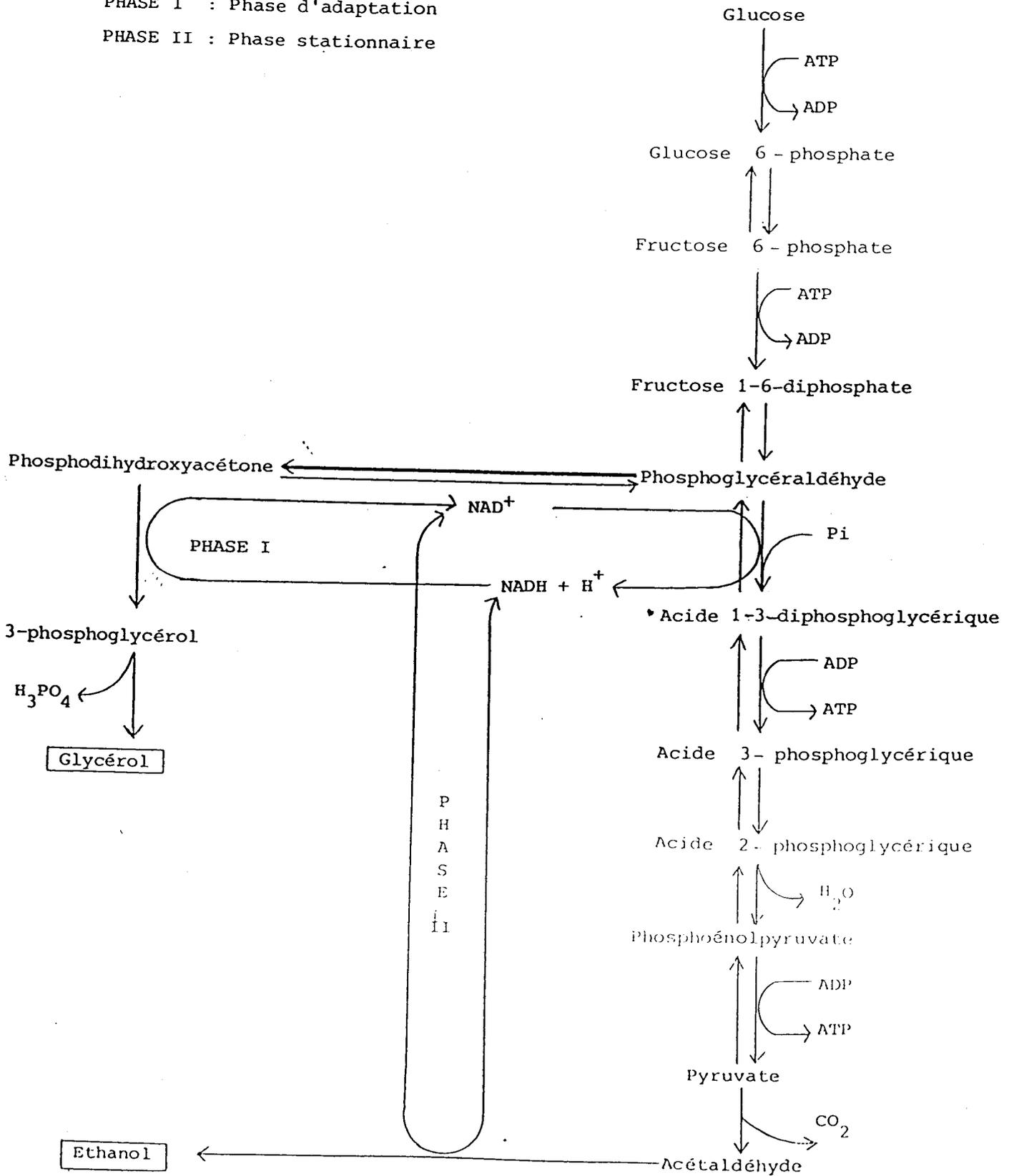


Figure 14 : Biochimie de la fermentation alcoolique.

PHASE I : Phase d'adaptation

PHASE II : Phase stationnaire



#### **II-1.4. L'acide acétique et le furfural.**

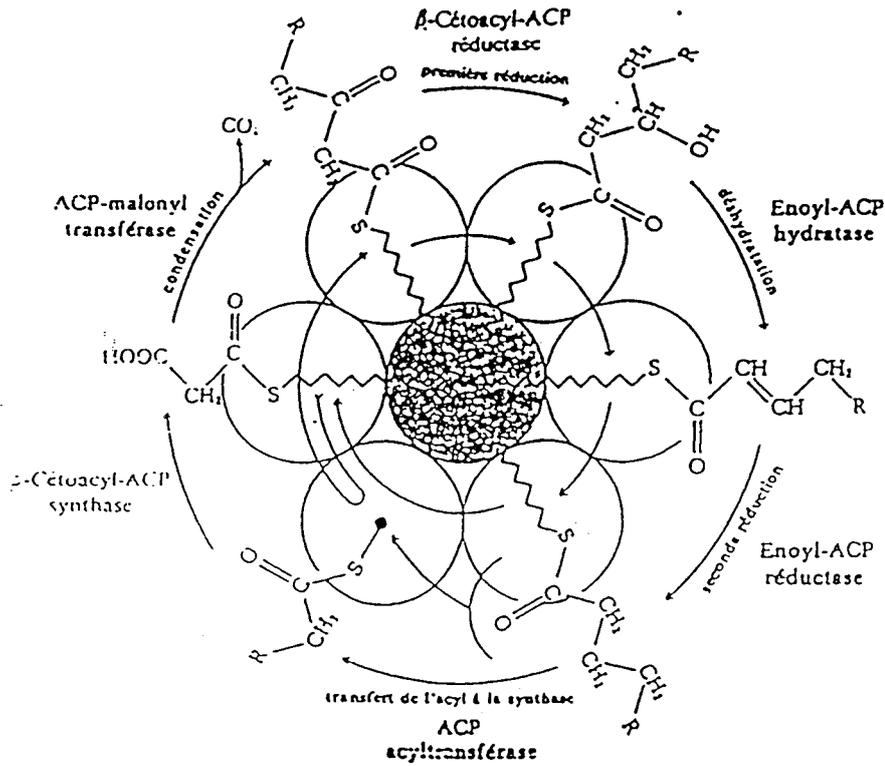
L'acide acétique, principal responsable de l'acidité organique dans le rhum, provient d'une succession de réactions. Sa formation est liée à celle des acides gras rencontrés dans le rhum (figure 15). Elle débute soit par une décarboxylation oxydative de l'acide 2-oxo-propionique (ou acide pyruvique) pendant la dégradation des sucres fermentescibles, soit par l'activation de l'acétate dérivé de l'oxydation de l'éthanol, et aboutit à l'acétylcoenzymeA. L'acétylcoenzymeA réagit ensuite pour former le malonylcoenzymeA. Deux atomes de carbones dérivés du malonylcoenzymeA s'additionnent lors de cycles successifs à un acylcoenzymeA précédemment formé. Les acides correspondants formés ont donc un nombre pair d'atomes de carbone. Dans le cas des acides gras à nombre impair d'atomes de carbone, l'acétylcoenzymeA est remplacé par le propionylcoenzymeA (Lynen, 1972). La présence de l'acide acétique en trop grande quantité est généralement liée au développement dans le milieu d'une flore bactérienne, notamment les *Acétobacter* qui transforment l'éthanol en acide acétique par une simple oxydation (figure 16).

Le furfural (dernier composé dont la teneur est considérée dans le calcul du non-alcool) peut provenir de la réaction des pentoses, lors des différentes étapes de chauffage conduisant à la mélasse. Les hexoses réagissent de même pour donner le 5-hydroxyméthylfurfural. Il semblerait que le furfural ne soit pas synthétisé au cours de la fermentation. Nous verrons en effet qu'il est présent dans la mélasse dans des proportions supérieures à celles constatées dans les distillats.

#### **II-2. Les constituants minoritaires du non-alcool.**

Les travaux concernant la formation de composés présents en faible quantité dans le rhum ont été réalisés pour deux raisons principales.

La première raison est que certains de ces composés nuisent à la qualité du rhum. La seconde raison qui a motivé ce type de recherche est le besoin de caractériser le rhum par rapport aux autres boissons alcoolisées et de différencier de manière certaine les rhum agricoles des rhums industriels.



**Figure 15 : Formation des acides gras, hélice de Lynen (1967).**



**Figure 16 : Formation de l'acide acétique à partir de l'éthanol.**

### II-2.1. Les composés indésirables.

Les différents chercheurs se sont intéressés à l'origine de ces composés dans le but d'éviter leur présence dans les rhums. Leur présence est liée le plus souvent à des accidents de fermentation. C'est le cas des composés tels que le 2-propenal (ou acroléine), le 2-propen-1-ol (ou alcool allylique) et l'acide propénoïque (ou acide acrylique). Ils sont présents dans les rhums présentant des notes piquantes, désagréables mais fugaces ; ce dernier caractère s'expliquant par leur grande volatilité. La présence de ces composés est liée à une flore bactérienne que certains auteurs ont tenté de déterminer (Dubois et al., 1973). Il semblerait que des corynébactéries soient responsables de leur formation (Lencrerot et al., 1984). Ces composés sont accompagnés d'acétals : le 3-éthoxy-propanal qui résulte de la réaction entre le 2-propenal et l'éthanol (Dubois et al., 1973) et le 1,1,3-triéthoxy-propane qui résulte de la réaction entre le 2-propen-1-ol et l'éthanal (de Smedt et Liddle, 1976). D'après Parfait et al (1980), le glycérol pourrait être un précurseur de ces composés. Certaines bactéries présentes dans le milieu utiliseraient le glycérol comme source de carbone ; ce qui conduirait à la formation, parmi d'autres produits, de l'acroléine et de l'alcool allylique. Ce glycérol provient lui-même du métabolisme des sucres par la levure. Il apparaît que les levures du type *Schizosaccharomyces Pombe* produisent des quantités plus importantes de glycérol que les *Saccharomyces Cerevisiae*.

Une famille de composés présente dans les rhum et que l'on estime indésirable est celle des acétals, dont la cinétique de formation a été étudiée par Misselhorn (1975). Le mécanisme de formation de ces composés (figure 17) fait état de cinq étapes, dans lesquelles interviennent notamment deux molécules d'alcool et une molécule d'aldéhyde. Cependant le pourcentage d'aldéhydes combinés en acétals est faible et Misselhorn considère que la contribution de ces acétals à la qualité organoleptique du rhum est négligeable.

### II-2.2. Les composés utilisés pour caractériser les rhums.

La grande variété des rhums est due aux nombreuses techniques différentes utilisées (utilisation de une ou plusieurs colonnes à distiller, en cuivre ou non), à la nature de la matière première, aux variations de la composition de la matière première en fonction du lieu de

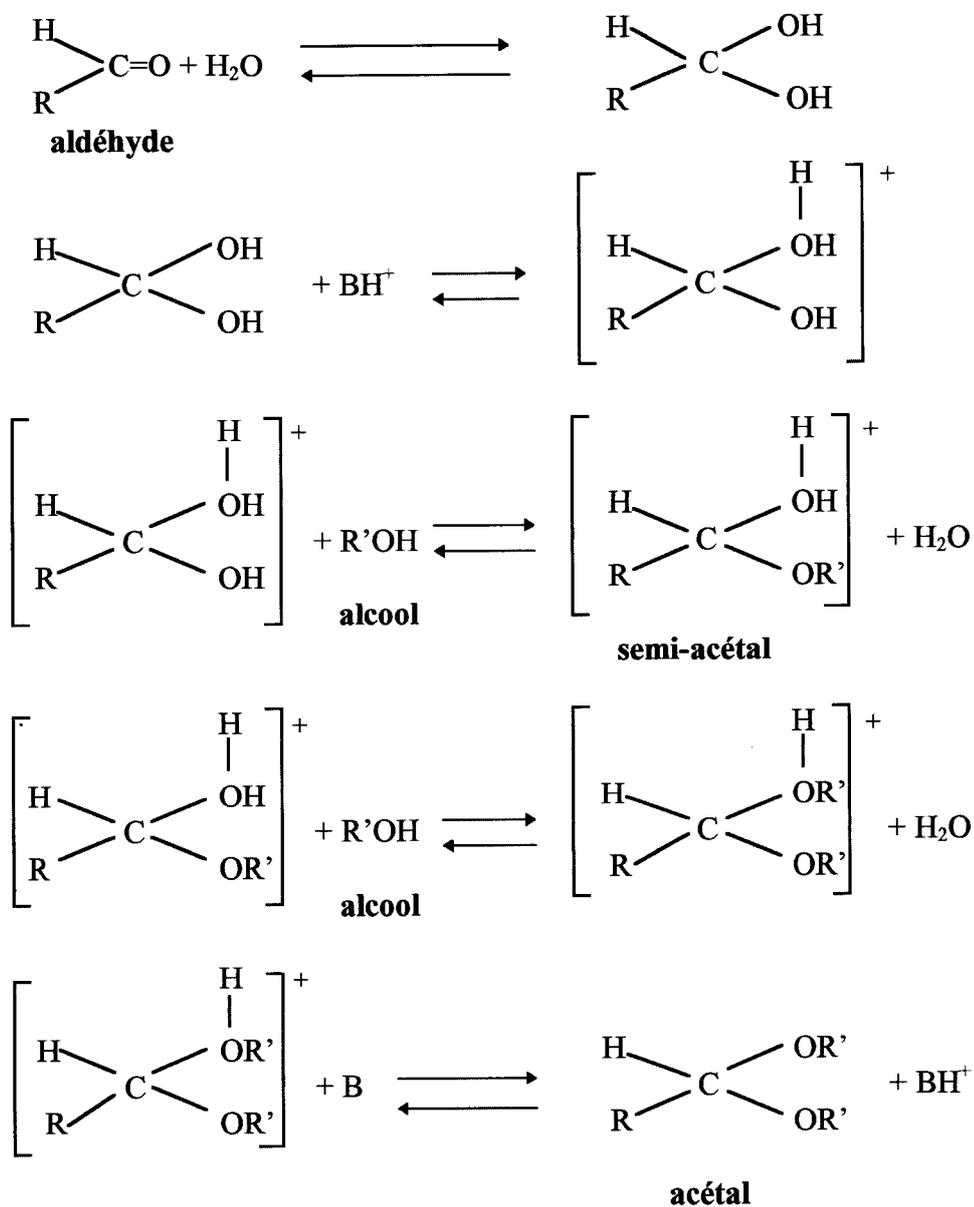


Figure 17 : Formation des acétals (d'après Misselhorn, 1975)

production, du process utilisée en sucrerie et de la variété de canne à sucre cultivée. Tout ceci fait qu'il est parfois impossible de déterminer **analytiquement**, de façon certaine, l'appartenance d'une boisson distillée à la famille des rhums.

Jouret et al. (1994) ont tenté de différencier les rhums agricoles des rhums industriels par la présence dans ces derniers d'alkylpyrazines particuliers. En effet, le 2-méthyl-pyrazine, le 2,5-diméthyl-pyrazine et le 2,6-diméthyl-pyrazine n'ont été identifiés que dans les rhums issus de mélasse. D'après Gallois (1984), les alkylpyrazines se rencontrent principalement dans des produits soumis à des traitements thermiques et sont issus d'une réaction entre les sucres et les acides aminés. Cependant, les jus de canne provenant de la diffusion subissent également un traitement thermique (80-85°C). Il serait donc nécessaire de vérifier l'absence ou la présence de ces composés dans les rhums agricoles provenant de ce type de jus de canne.

La formation des acides gras à chaîne courte a été longuement étudiée par Fahrasmane (1983). Il a constaté l'influence de plusieurs paramètres tels que la température, le taux d'ensemencement, la nature de la levure introduite ou la composition du milieu, sur la formation de ces acides. La réaction biochimique conduisant à leur formation est la même que celle décrite pour l'acide acétique ; seul varie le nombre de cycles par lesquels passe l'acylcoenzymeA. Fahrasmane insiste sur la présence dans les rhums d'une relativement grande proportion d'acide propionique. Cette caractéristique pourrait permettre de différencier les rhums des autres eaux-de-vie.

La formation des esters éthyliques des acides gras supérieurs des rhums a été également étudiée (Parfait et al., 1972) en raison du rôle important de ces esters dans la qualité organoleptique du rhum. Il a été montré que la quantité d'esters éthyliques formés dépend à la fois des levures utilisées et de la composition de la matière première. Les réactions aboutissant à leur formation sont connues (figure 13). Ces auteurs constatent que la quantité d'esters éthyliques dans les rhums est plus importante si la distillation est réalisée en présence de la levure.

\*

Les phénomènes biochimiques portant sur la formation d'un grand nombre d'autres composés obtenus à partir de milieux de natures différentes sont connus dans la mesure où les

*Saccharomyces cerevisiae* ont été étudiés de manière approfondie. Les paramètres intervenant dans ces processus biochimiques sont nombreux et variés mais deux d'entre eux ont un rôle déterminant : la nature du micro-organisme utilisé (souches de la même espèce, souches de genres différents, interactions levures-bactéries, etc) et la composition du milieu. Dans le cadre de notre recherche, nous nous sommes intéressés à un seul de ces paramètres : la nature du micro-organisme. Les fermentations ont donc toutes été effectuées dans les mêmes conditions, dans la mesure du possible, en considérant que les variations de la composition de la mélasse sont négligeables par rapport aux résultats obtenus.

### **III- Les études sur la composition chimique des rhums.**

On appellera composé aromatique toute molécule chimique participant de près ou de loin à l'élaboration du caractère organoleptique d'un produit. Il ne sera question ici que de composés aromatiques synthétisés de façon naturelle par la plante ou bien de molécules formées au cours des étapes de transformation du jus de canne en mélasse, de fermentation, de distillation et de vieillissement. A aucun moment du processus de fabrication du rhum, il n'est ajouté de produit aromatisant. Lors des différentes opérations, les seuls produits ajoutés sont l'eau de dilution, les produits destinés à protéger le milieu de fermentation des attaques bactériennes, les compléments nutritifs nécessaires au développement de la levure et la vapeur d'eau apportée lors de la distillation. On considèrera que tous ces apports contribuent de manière négligeable à la qualité organoleptique du produit.

Les constituants aromatiques sont des composés volatils appartenant aux différentes classes de molécules. Un arôme naturel est constitué de plusieurs centaines de composants volatils ; il en existe par exemple 790 dans l'arôme du café, 644 dans l'arôme du vin blanc et 550 dans l'arôme du rhum (Maarse, 1991). Cependant, selon la nature de l'aliment, tous les constituants n'ont pas le même poids dans l'élaboration de l'arôme.

Trois cas se présentent :

- dans le cas le plus simple, un seul composé donne la note aromatique typique de l'aliment ; c'est le cas de l'eugénol pour le clou de girofle.
- dans le second cas, le mélange de plusieurs composés caractérise l'arôme d'un produit.
- dans le cas le plus complexe, l'arôme du produit ne peut pas être reconstitué par le seul mélange de la totalité des composés présents naturellement.

Le rhum fait sans doute partie de cette troisième catégorie.

### **III-1. Origine de l'arôme du rhum.**

De nombreuses équipes de chercheurs se sont intéressées à la composition chimique des diverses boissons alcoolisées afin de les distinguer entre elles et de mieux comprendre les raisons de leurs différences de saveur. Les caractéristiques organoleptiques du rhum sont le résultat d'un équilibre entre plusieurs composés chimiques, l'influence de chacun de ces composés variant suivant son seuil de perception, sa concentration dans le produit et ses interactions avec les autres composés chimiques présents dans le mélange. Ainsi, deux mélanges comprenant les mêmes composés chimiques mais dans des proportions relatives différentes, ont des qualités organoleptiques différentes.

L'équilibre caractéristique d'un produit tel que le rhum provient d'une série de transformations subies par la matière première. Ces transformations ont lieu à chaque étape de fabrication, depuis la récolte de la canne jusqu'à la récupération de l'eau-de-vie. Elles peuvent être complétées par l'apport de composés chimiques issus du bois dans lequel le rhum a été vieilli. Le rhum contient donc à la fois des composés qui sont déjà présents dans la mélasse et qui n'ont pas subi de transformations et des composés qui proviennent de la transformation de la matière première par des phénomènes biochimiques et physico-chimiques intervenant à tous les stades de la fabrication du rhum. Les composés chimiques sont de toutes natures et leur contribution à la qualité organoleptique du produit va être souhaitée ou non selon l'intensité de leur impact.

## **III-2. Les composés du rhum.**

### **III-2.1. Evolution des recherches.**

En 1946, Kervégant dresse une première liste des composés du rhum et signale l'existence de nombreux alcools supérieurs, d'esters éthyliques et de certains acides gras. Il indique également la présence de dérivés terpéniques. Il note déjà que des composés tels que le 2-butanol ou le butyrate d'éthyle sont le signe d'une activité bactérienne.

Les premiers grands travaux sur la composition du rhum sont l'oeuvre de Maarse et al. (1966) et surtout de Liebich et al. (1970) qui ont identifié et dosé près de 200 composés. Pour cela, ils ont travaillé sur 40 litres d'un rhum de la Jamaïque. Du fait du caractère très aromatique de ce rhum, une grande variété d'esters a été trouvée. Ter Heide et al. (1981) ont complété ce travail en analysant 507 litres de rhum jamaïcain. Plus de 400 composés ont ainsi pu être identifiés, dont 214 nouveaux. Parmi ces nouveaux composés, de nombreux terpènes et dérivés terpéniques (terpénols, aldéhydes terpéniques, esters terpéniques) ont été identifiés, ainsi que de nouveaux esters (toujours en relation avec le caractère très aromatique du produit étudié).

Des listes complètes des différents composés chimiques présents dans les rhums existent. Les nombreux travaux qui ont permis de les réaliser sont les suivants ; ce sont des travaux d'identification : Maarse et al., 1966 ; Liebich et al., 1970 ; ter Heide et al., 1981 ; ou de synthèse : Harrison et al., 1970 ; Nykänen et al., 1983 ; ter Heide, 1986 ; Nykänen et al., 1991. Dans tous les cas, ces auteurs ne se sont pas intéressés aux différents paramètres de fabrication du rhum.

### **III-2.2. Les différentes familles de composés et leurs intérêts.**

Les travaux effectués sur la composition du rhum ont eu pour but de mieux connaître ce produit afin de le comparer à d'autres eaux-de-vie et de mieux comprendre les différences organoleptiques observées. Cette étude comparative peut permettre ensuite de différencier ces eaux-de-vie en fonction de leur composition. Les chercheurs peuvent ensuite s'intéresser à l'origine de composés particuliers.

Les différents composés identifiés sont classés en fonction de la nature de leur site réactionnel. Certaines familles de corps composant le non-alcool sont plus importantes quantitativement et interviennent dans la législation définissant les différentes appellations de rhums. C'est notamment le cas des alcools supérieurs, des esters et des aldéhydes.

### III-2.2.1 Les composés utilisés dans les appellations.

Les composés utilisés pour les différentes appellations sont les alcools supérieurs, les esters (principalement l'acétate d'éthyle), les acides (principalement l'acide acétique) et les aldéhydes (principalement l'acétaldéhyde et le furfural).

Les alcools supérieurs, bien que n'ayant peu ou pas d'influence positive sur la qualité organoleptique du rhum, restent d'excellents traceurs de la qualité globale du rhum. Il est intéressant de noter cependant que de nombreux autres alcools plus aromatiques existent à l'état de traces dans les rhums. C'est le cas des alcools cycliques tels que par exemple le phényl-2-éthanol qui est connu pour avoir une note de miel.

L'acide acétique constitue quantitativement 90% de l'acidité volatile des rhums. L'acidité volatile est généralement faible dans les rhums exceptée dans le cas des rhums « Grand Arôme » où les acides peuvent intervenir dans la qualité organoleptique.

Les esters sont en revanche très importants en ce qui concerne la qualité organoleptique du rhum. Par exemple, l'acétate d'éthyle qui représente généralement 80 à 90% des esters totaux est utilisé pour définir l'appellation « Grand Arôme ». Les 20% restants sont composés principalement d'esters éthyliques d'acides gras, d'acétate de 2-méthyl-1-butanol et d'acétate de 3-méthyl-1-butanol.

Deux aldéhydes, l'acétaldéhyde et le furfural, complètent cet inventaire des composés du non-alcool qui sont utilisés pour distinguer les différents types de rhum. Cependant, de nombreux autres aldéhydes contribuent à l'arôme du rhum. Ils peuvent réagir avec l'alcool pour donner des acétals que l'on retrouve en grande quantité dans les rhums. Toutefois leur présence semble être liée aux techniques d'extractions employées (Misselhorn, 1975). La présence d'aldéhydes aromatiques a suscité de nombreux travaux visant à comprendre leur origine. Il semble que la plupart, ainsi que quelques composés phénoliques, proviennent du bois lors du vieillissement des rhums (Puech et al., 1977 ; Puech et al., 1982). Ces auteurs ont plus particulièrement étudié les rapports quantitatifs entre plusieurs aldéhydes aromatiques afin de pouvoir détecter d'éventuelles adultérations.

Dans la mesure où nous avons travaillé uniquement sur des produits issus directement de la fermentation, la présence éventuelle de ces composés ne pourra pas être imputée à l'action du bois.

### III-2.2.2. Les autres composés intervenant dans l'arôme.

Les composés phénoliques sont importants du fait de leur faible seuil de perception. Ils sont présents en quantité non négligeable dans les rhums et notamment les rhums vieux. Dubois et al. (1972) ont comparé la teneur en phénols volatils entre deux rhums martiniquais : l'un conservé en bouteille de verre et l'autre vieilli dans un fût de chêne. Jounela-Eriksson et al. (1981) ont dosé les différents phénols dans quelques eaux-de-vie puis ont tenté de mesurer leur impact sur la qualité organoleptique des produits.

De nombreux acides ont été identifiés, parmi lesquels l'acide 2-éthyl-3-méthylbutyrique. Lehtonen et al. (1977) pensaient que ce dernier était un composé caractéristique du rhum. Plus récemment, Ganou-Parfait et al. (1986) ont supposé qu'il était d'origine bactérienne. On comprend alors que ce composé soit absent de certains rhums : ceux issus d'une fermentation où les micro-organismes impliqués dans la formation de ce composé (certains *Bacillus* notamment) sont absents. De plus, les techniques actuelles de distillation permettent d'envisager son élimination lors de l'élaboration du rhum. Fahrasmane et al. (1983) insistent sur le fait que les concentrations des différents acides gras à chaîne courte sont dépendantes des nombreux paramètres entrant en jeu dans la fabrication du rhum (qualité de la matière première, activité des différents micro-organismes, conditions de distillation, etc). Parfait et al. (1990) soulignent par ailleurs l'importance de la qualité de la flore présente et du mode de conservation, dans la teneur en acide formique des différents rhums.

Les cétones sont bien représentées dans le rhum et certaines apportent une note agréable. C'est le cas de la bêta-ionone et de la bêta-damascénone dont un isomère aurait une note aromatique rappelant celle du rhum (Dubois et al., 1975).

Certains hydrocarbures qui sont supposés participer activement à l'arôme du rhum, parmi lesquels des monoterpènes et des sesquiterpènes ainsi que certains de leurs dérivés, ont été identifiés dans le rhum jamaïcain.

Les terpénols, relativement nombreux dans les rhums sont intéressants du fait de leur faible seuil de perception et des notes agréables qu'ils dégagent. Leur origine peut être multiple : ils peuvent être déjà présents dans la mélasse, ou bien leurs précurseurs, sous forme de pyrophosphates (tels que le pyrophosphate de géranyle, de néryle ou de farnésyle) ou sous forme de terpènes glycosilés, existent dans la mélasse, ou encore ils sont issus d'une série de réactions depuis les terpènes aboutissant aux terpénols. Ces mêmes terpénols peuvent être ensuite réagir et former des esters qui ont un impact sur la qualité du produit. Du fait de leur importance qualitative, ils feront l'objet d'une étude particulière.

De Smedt et al. (1975) ont pour leur part tenté de distinguer les rhums des autres eaux-de-vie en analysant quantitativement les esters éthyliques et le furfural présents dans des échantillons issus d'une extraction liquide-liquide au pentane. Ils constatent des variations importantes dans les teneurs en esters éthyliques pour les différents rhums étudiés. Ils notent également une quantité importante d'hexanoate d'éthyle dans des rhums d'origine réunionnaise. Par la suite, ils ont fait une analyse qualitative qui a révélé la présence de neuf composés présentant un spectre de masse proche de celui du triméthyl-tétrahydronaphthalène (TTN) et la présence de deux composés présentant un spectre de masse proche du triméthyl-dihydronaphthalène (TDN). Par ailleurs, la bêta-damascénone est signalée en quantité relativement importante ; ce qui pourrait constituer une des caractéristiques des rhums. Ils complètent cette étude (De Smedt et al., 1980) en comparant de nouveaux rhums différents et en mettant en avant des composés communs tels que le menthol, le TTN, la bêta-damascénone, etc. L'origine possible de ces composés est partiellement discutée avec les bêta-carotènes comme précurseurs des TTN, TDN et bêta-damascénone.

En revanche, les composés soufrés ainsi que les composés azotés, tels que les alkylpyrazines, apportent des notes désagréables comme par exemple des notes de pourri ou de brûlé. La plupart des composés soufrés sont éliminés lors de la distillation.

Les composés azotés ont été étudiés par Wobben et al. (1971) qui en ont identifié 13 dans les rhums. Par la suite, ter Heide et al. (1981) en ont identifié 9 autres. Au total, plus de 500 composés ont pu être identifiés jusqu'à présent dans les différents types de rhums.

\*

Une partie de notre recherche a consisté à identifier les composés présents dans des distillats obtenus après des fermentations réalisées par des micro-organismes différents. Nous avons établi la liste des composés identifiés. Un certain nombre de composés préalablement identifiés au cours d'autres travaux sur la composition des rhums, n'ont pu être mis en évidence. Nous nous bornerons à étudier seulement ceux identifiés avec certitude tout au long de ce travail. Hormis les travaux de Shum-Chéong-Sing (1992) portant sur les caractères physico-chimiques des rhums réunionnais, ceux-ci n'ont jamais été étudiés de manière approfondie ; ce qui donne un intérêt supplémentaire à notre étude.

### III-3. Les rapports quantitatifs entre les composés.

Un autre type de recherches entreprises sur le rhum a porté sur l'étude de différents rapports entre des composés dosés quantitativement. Il s'agit notamment des alcools supérieurs ou des aldéhydes aromatiques. En 1975, Mesley et al. ont comparé les rapports entre les alcools supérieurs et l'acétate d'éthyle et ont abouti aux conclusions suivantes :

- tous les rhums étudiés ont une teneur en méthanol inférieure à 23 g/HLAP.
- le rapport 1-propanol / 2-méthyl-propanol est toujours supérieur à 0,7.
- le rapport 2-méthyl-1-butanol / 3-méthyl-1-butanol est toujours inférieur à 0,38.
- le rapport acétate d'éthyle / méthanol est toujours supérieur à 1,8.

Parfait et al. (1980) ont précisé, dans une étude portant sur différents rapports entre les alcools supérieurs et l'acétate d'éthyle, que les résultats doivent être interprétés avec prudence et qu'il faut bien connaître les conditions de travail car de nombreux paramètres entrent en jeu.

Suomalainen (1975) a comparé quantitativement plusieurs composés, présents aussi bien dans les rhums, que dans les whiskies et le cognac. Il a ainsi remarqué des similitudes dans la composition en acides gras entre ces différentes eaux-de-vie. De plus, il a observé une grande variabilité dans les proportions relatives des alcools supérieurs.

Enfin, Bricout et al. (1975) ont mesuré la teneur en isotopes stables des rhums et d'autres alcools de bouche dans le but de déterminer l'origine végétale d'une boisson alcoolisée, en établissant une relation entre la teneur isotopique du sucre et celle de l'éthanol correspondant.

\*

L'étude des rapports quantitatifs entre différents composés permet de classer les rhums dans une certaine catégorie d'eaux-de-vie. Mais les techniques de distillation sont telles aujourd'hui qu'il est possible de modifier ces rapports en classant les composés dans la colonne. Cette évolution des techniques de distillation montrent les limites d'une telle étude. En ce qui concerne notre travail, il nous a semblé que la comparaison des différents rapports quantitatifs pouvait être un bon outil pour différencier les souches. En effet, nous n'avons pas effectué de classement des composés lors des distillations.

#### **IV- Conclusion et objectifs.**

Comme nous venons de le voir, les recherches sur le rhum ont suivi trois axes principaux. Cette synthèse des différents travaux effectués sur le rhum montre toute la difficulté que l'on rencontre en voulant caractériser les rhums par rapport aux autres boissons alcoolisées. Cavazza (1975) insiste sur le fait que le rhum doit présenter avant tout les caractères organoleptiques du rhum même s'il est impossible de distinguer avec certitude les rhums des autres eaux-de-vie. En effet, il ressort de cette étude qu'il n'existe pas de composés communs à tous les types de rhums et absents des autres boissons alcoolisées. Même l'acide 2-éthyl-3-méthylbutyrique, qui a pourtant été identifié uniquement dans les rhums, ne peut servir de référence du fait de son origine probablement bactérienne. La très large répartition géographique de la production de rhum, les nombreuses variétés de canne à sucre cultivées, l'utilisation de matières premières aussi différentes que le jus de canne, les sirops, la mélasse ou la vinasse, la multiplicité de la flore impliquée dans les différentes étapes de l'élaboration du rhum ainsi que les différentes techniques de distillation utilisées, expliquent la grande variabilité rencontrée dans la composition aussi bien qualitative que quantitative des rhums.

Enfin, il nous faut ajouter que le degré de coulage ainsi que le type de colonne utilisée intervient également dans la qualité finale du rhum. Un rhum que l'on souhaite chargé en non-alcool sera distillé à plus bas degré qu'un rhum que l'on souhaite léger. Le degré de coulage peut ainsi varier de 60 degrés, pour certains rhums « Grand Arôme », à plus de 94 degrés pour les rhums légers utilisés dans la fabrication des punch. Les colonnes peuvent être en inox

lorsque l'on a la possibilité d'éliminer en tête de colonne les produits volatils indésirables tels que les composés soufrés, ou bien peuvent être en cuivre lorsque l'on désire des rhums plus chargés. Le cuivre permet alors l'oxydation de composés indésirables et ainsi leur évacuation en queue de colonne.

Le souci majeur du distillateur est la qualité du produit obtenu. Cette qualité dépend pour une grande partie de la bonne conduite de la fermentation. C'est sur cette étape essentielle que nous avons travaillé. L'objectif de notre travail était de connaître l'influence sur la qualité du rhum, de certains micro-organismes susceptibles de se développer dans le milieu rhumier. Nous avons donc sélectionné des micro-organismes appartenant aux familles les plus souvent citées dans la bibliographie sur le rhum.

Nous avons pensé que l'influence d'un micro-organisme pouvait être mise en évidence au différents stades de l'élaboration du rhum. Pendant la fermentation, le développement d'un micro-organisme peut se traduire par les variations de plusieurs paramètres. Nous en avons suivi trois qui nous paraissaient importants. Il s'agissait du temps de fermentation qui représente la productivité, le Titre Alcoométrique Volumique (T.A.V.) qui permet le calcul du rendement, et l'acidité qui est, d'après la bibliographie, un bon indicateur du développement de certaines bactéries.

A l'issue de ces fermentations, nous avons distillé les vins puis étudié la composition chimique des distillats. Cette étude devait nous permettre de différencier les souches entre elles en fonction de leur métabolisme. Mais pour connaître l'origine des composés des distillats, il était nécessaire d'entreprendre préalablement une étude de la composition de la mélasse. Nous avons donc déterminé la composition de la mélasse en composés aromatiques.

L'étude de la composition des distillats a été effectuées en deux parties. Une première étude a concerné les alcools supérieurs et l'acétate d'éthyle qui sont les composés les plus importants quantitativement des distillats. L'étude bibliographique nous a permis de choisir ensuite une méthode pour tenter de différencier les micro-organismes. La comparaison des rapports entre les différents alcools supérieurs nous a semblé être une bonne méthode.

Nous avons ensuite étudié la composition des distillats en constituants présents en faible quantité. L'identification des composés a été confirmé par une étude bibliographique. Celle-ci nous a permis également d'expliquer la présence d'un grand nombre de composés qui

peuvent avoir une influence sur la qualité organoleptique du produit. Une étude des proportions relatives de certains composés présents dans les distillats devait finalement nous permettre de différencier les micro-organismes entre eux en fonction des différentes voies métaboliques mises en évidence.

A l'issue de ce travail il devait nous être possible de distinguer parmi les micro-organismes étudiés ceux qui peuvent contribuer de manière positive à la qualité du produit et ceux qui doivent être évités pendant la fermentation.

# ETUDE DE LA MATIERE PREMIERE

## LA MELASSE

---

La mélasse est la matière première utilisée en fermentation. C'est un produit riche en sucre mais aussi en de nombreux autres composés qui interviennent également pendant la phase de la fermentation. L'ensemble des composés constitue le substrat qui permet aux micro-organismes de se développer. Une partie des constituants du substrat est alors transformée. A la fin de la fermentation, le vin est constitué de composés issus directement de la mélasse et de composés provenant de l'activité des micro-organismes. Il nous a paru donc nécessaire d'étudier dans un premier temps la composition de la mélasse.

### I- L'origine de la mélasse.

La mélasse, sous-produit de la sucrerie, est la principale matière première utilisée à la distillerie de Savanna.

Pour extraire le sucre de la canne à sucre une succession d'étapes sont nécessaires. Elles vont aboutir au sucre cristallisé d'une part et à la mélasse d'autre part. Cette mélasse correspond au jus de canne épuisé du maximum de son sucre. Toutes les étapes de transformation du jus de canne dans la sucrerie influent sur la qualité finale de la mélasse.

La canne à sucre est tout d'abord réceptionnée sur la cour à canne où l'on détermine sa richesse en sucre (comprise entre 11% et 15%). Elle est ensuite envoyée vers le shredder où elle est broyée par les 84 marteaux de l'appareil, avant d'être expédiée vers la diffusion. L'étape de la diffusion consiste à arroser la canne broyée avec de l'eau chaude à 85°C. L'eau percole progressivement et s'enrichit en saccharose ; après une quinzaine de recyclages le jus de canne brut est récupéré. Le jus est alors réchauffé à 105°C, chaulé puis dégazé avant d'être mis à décanter, après ajout de flocculants. On opère alors une série de manipulations visant à

extraire le maximum de sucre contenu dans le jus de canne. Ce sont les étapes d'évaporation (élimination d'une partie de l'eau contenue dans le jus), de cuite (aboutissant aux masses cuites A, B et C), de cristallisation, de malaxage (permettant d'épuiser au maximum en sucre la liqueur-mère) et enfin de turbinage (permettant de séparer la liqueur-mère, des cristaux de sucre destinés à la commercialisation). Ces opérations sont répétées trois fois. La liqueur-mère obtenue à l'issue du troisième cycle est la mélasse. Toutes ces étapes aboutissant à la mélasse s'effectuent la plupart du temps à température élevée ; ce qui a, comme nous le verrons plus tard, une incidence sur la qualité finale de la mélasse et notamment sur sa composition. Du fait du grand nombre d'étapes menant à la fabrication du sucre, la qualité de la mélasse peut varier d'une campagne à l'autre, voire au cours de la campagne elle-même. De plus, d'autres facteurs tels que la qualité de la canne à sucre, elle-même souvent liée aux conditions météorologiques de l'année ainsi qu'à la qualité sanitaire lors de son arrivée à l'usine, contribuent aux variations de la qualité de la mélasse pendant une même campagne.

La mélasse ainsi obtenue est envoyée dans les deux cuves de stockage de la distillerie qui ont une capacité de 2500 tonnes chacune. La mélasse, lorsqu'elle est envoyée à la distillerie, est à une température comprise entre 55°C et 60°C. A cette température, des réactions de Maillard peuvent se produire. En effet, à haute température les sucres réducteurs sont à l'origine de réactions en chaîne rendant inutilisable la mélasse et pouvant même entraîner la destruction de la cuve de stockage.

La mélasse peut avoir plusieurs utilisations :

- la production d'alcool, dans le cas qui nous intéresse.
- l'alimentation animale.
- la production de levures de boulangerie.
- les fermentations glutamiques et citriques.
- la production de lysine.

\*

Nous avons pu constater que certaines étapes de l'extraction du sucre se font à des températures élevées. Ces barèmes thermiques sont à l'origine de nombreuses réactions chimiques qui ont des conséquences sur la composition de la mélasse.

## II- La composition de la mélasse.

La mélasse a un aspect brun-noir, visqueux, une densité d'environ 1,4.

### II-1. Le brix.

Définition du brix : le % **brix** est le pourcentage de matière sèche contenue dans la mélasse. Il est déterminé au réfractomètre, après dilution au 1/6<sup>ème</sup> de la mélasse.

La valeur moyenne du brix pour la mélasse utilisée à la distillerie de Savanna est de **84,42%**, avec des variations allant de 77% à 87%.

Nous nous sommes intéressés aux composés de la matière sèche qui jouent un rôle dans la fermentation, c'est à dire les sucres, mais également les acides aminés et les minéraux qui participent au métabolisme des micro-organismes. La matière sèche comprend également tous les composés aromatiques qui interviennent dans l'élaboration de la qualité organoleptique du produit.

### II-2. Les sucres fermentescibles.

La mélasse est essentiellement composée de saccharose, de glucose et fructose. D'autres sucres, tels que le rhamnose ou l'arabinose, sont également présents en faible quantité.

Les analyses effectuées permettent d'obtenir les quantités de saccharose d'une part et des sucres réducteurs d'autre part (le glucose et le fructose principalement) dans la mélasse. On obtient la pureté Clerget qui est le pourcentage de saccharose dans la mélasse rapporté à la matière sèche. Le saccharose est le principal sucre non réducteur dans la mélasse. La composition moyenne en sucres des mélasses étudiées est la suivante :

- **40,40%** de saccharose (pureté Clerget). Cette valeur varie de 39% à 43 % au cours de la campagne.
- **12,48%** de sucres réducteurs avec des valeurs extrêmes de 11% et 14%.

### II-3. Les éléments minéraux et les acides organiques.

Les différents minéraux et acides organiques ont été dosés par électrophorèse capillaire. Les résultats sont exposés dans le tableau 3.

On peut remarquer que le bromure est présent en grande quantité puisqu'avec 40,17 mg par gramme de mélasse c'est l'anion le plus important quantitativement dans la mélasse. Son identification est confirmée par injection directe de bromure. Sa présence peut être liée à l'utilisation de produits phytosanitaires riches en ions bromures lors de la culture de la canne et à l'utilisation également de produits contenant du bromure pendant le process sucrier. Les ions sulfates représentent ensuite les anions les plus importants quantitativement. On note la présence d'une quantité assez importante de citrate (3,41 mg/g de mélasse) qui est un élément nutritif pouvant jouer un rôle sur la composition finale du rhum (Fahrasmane, 1983). La mélasse est relativement riche en chlorure (5,04 mg/g de mélasse). L'absence de phosphate dans la mélasse étudiée est confirmée après dopage. Compte tenu du rôle énergétique joué par le phosphate dans le métabolisme des levures un apport de phosphate sera donc nécessaire lors des phases de développement de la levure.

Parmi les cations, on retrouve en grande quantité le potassium (54,8 mg/g de mélasse). Ce résultat n'est pas surprenant car la canne à sucre est naturellement riche en potassium. Le calcium est le second cation présent en grande quantité. Sa présence dans ces proportions est sans doute liée à l'utilisation de chaux lors du process sucrier. Plus surprenante est l'absence d'ions ammonium. Ce résultat justifie la nécessité d'un apport azoté lors des phases de développement de la levure. En effet, l'azote a une grande importance métabolique, notamment lors la synthèse des acides aminés, constituants principaux des protéines. Le sodium, qui joue un rôle avec le potassium dans l'équilibre osmotique de la levure par rapport au milieu dans lequel elle se développe, est en quantité non négligeable (1,38 mg/g de mélasse). Les autres cations dosés existent en faible quantité mais leur rôle n'en demeure pas moins important dans le développement des différents micro-organismes. En ce qui concerne les

COMPOSITION DE LA MELASSE EN ANIONS  
en mg par gramme de mélasse

Bromure	40,17
Chlorure	5,04
Iodure	0,32
Sulfate	8,21
Citrate	3,41
Fluorure	1,28
Phosphate	0

COMPOSITION DE LA MELASSE EN CATIONS  
en mg par gramme de mélasse

Potassium	54,80
Calcium	5,24
Sodium	1,38
Magnesium	0,20
Manganèse	0,16
Chrome	0,21
Ammonium	0,00
Lithium	0,27
Cadmium	0,00
Cobalt	0,34

**Tableau 3 : Composition de la mélasse en minéraux**

proportions des différents anions et cations, ces résultats sont en accord avec ceux de Patureau (1982), mis à part le cas du bromure qui n'est pas mentionné dans les résultats de ce dernier.

Les éléments minéraux et les acides organiques sont d'une grande importance dans le métabolisme des micro-organismes. Les minéraux tels que le sodium, le potassium ou le chlorure participent à l'équilibre osmotique du micro-organisme dans le milieu par l'intermédiaire de transports actifs ou passifs de ces éléments à travers la paroi de la cellule.

Les acides organiques peuvent servir de source carbonée aux micro-organismes et être à l'origine de nombreux composés aromatiques.

Ces résultats nécessitent cependant confirmation notamment en ce qui concerne la quantité de bromure et l'absence d'ammonium et de phosphate. Des analyses seront réalisées ultérieurement.

#### **II-4. Les acides aminés.**

Nous n'avons pas réalisé d'analyses de la composition en différents acides aminés. Nous présenterons seulement les compositions citées dans la bibliographie.

Patureau (1982) a déterminé quantitativement dans la mélasse 24 acides parmi lesquels des acides aminés. Il n'a mentionné dans son ouvrage qu'une partie de ces acides dosés. Nous les avons reportés dans le tableau 4. Ces acides aminés jouent un rôle important dans le métabolisme des micro-organismes pendant la fermentation. Ils sont à l'origine d'une partie des alcools supérieurs retrouvés dans les rhums.

On peut remarquer la prédominance dans la mélasse, de l'acide glutamique et de l'acide aspartique.

#### **II-5. Les composés aromatiques.**

La mélasse présente une forte odeur avec des notes aromatiques de réglisse et de caramel. Nous avons pensé qu'il serait intéressant de connaître les différents composés aromatiques qu'elle contient.

PRINCIPAUX ACIDES AMINES PRESENTS DANS LA MELASSE.

en mg par gramme de mélasse.

Acide aspartique	0,90 - 1,65
Acide glutamique	1,02 - 1,04
Alanine	0,20 - 0,22
Acide glutamique	1,02 - 1,04
Gamma-aminobutyrique	0,06 - 0,08
Glycine	0,06 - 0,07
Leucine	0,03 - 0,05
Lysine	0,05 - 0,07
Serine	0,39 - 0,80
Thréonine	0,30 - 0,90
Valine	0,11 - 0,20

PRINCIPAUX ACIDES ORGANIQUES DE LA MELASSE.

en mg par gramme de mélasse.

Acide aconitique	1,00 - 6,00
Acide citrique	} 1,00 - 2,50
Acide malique	
Acide mésaconique	
Acide succinique	

**Tableau 4 : Composition de la mélasse en acides aminés et en acides organiques (d'après Paturau, 1982)**

Pour cela nous avons procédé à deux types d'analyses :

- une analyse de l'espace de tête qui nous a permis de séparer et d'identifier les constituants les plus volatils.
- une analyse de la mélasse après extraction au Lickens, par un mélange de 10% d'éther et 90% de pentane.

La préparation des échantillons est décrite dans le chapitre « Matériel et Méthode ».

### **II-5.1. Analyse de l'espace de tête par SPME (Solid Phase MicroExtraction).**

L'analyse par SPME a donné le profil chromatographique de la figure 18. Le chromatographe en phase gazeuse utilisé est couplé à un spectromètre de masse, ce qui nous a permis de procéder à une identification des composés détectés sur le chromatogramme. Le profil ainsi recueilli nous montre que la mélasse est constituée de très nombreux composés volatils participant activement à son arôme (Tableau 5). Nous remarquons que trois catégories de composés sont particulièrement bien représentées : les composés possédant un noyau furanne, les composés azotés et les produits de la dégradation des caroténoïdes.

#### **- Les composés possédant un noyau furanne.**

Ces composés tels que le **pentyl-furanne** ou le **dihydro-2-méthyl-(2H)-furan-3-one**, se forment lors des traitements thermiques successifs qui aboutissent à l'extraction du sucre cristallisé. Sous l'action de la chaleur des réactions de Maillard se produisent. Elles mettent en jeu des sucres et des acides aminés. Les différentes étapes de ces réactions sont mal connues. Les composés qui proviennent de ces réactions sont assez aromatiques, avec le plus souvent des notes aromatiques de caramel.

Nous remarquons qu'un certain nombre de spectres présentent un pic  $m/e = 85$  (100%) avec un profil proche de celui du dihydro-2-méthyl-(2H)-furan-3-one. Ces pics correspondent probablement à des composés possédant également un noyau furanne et issus du même type de réactions.

L'**acide 2-furancarboxylique** a été également détecté dans l'espace de tête de la mélasse.

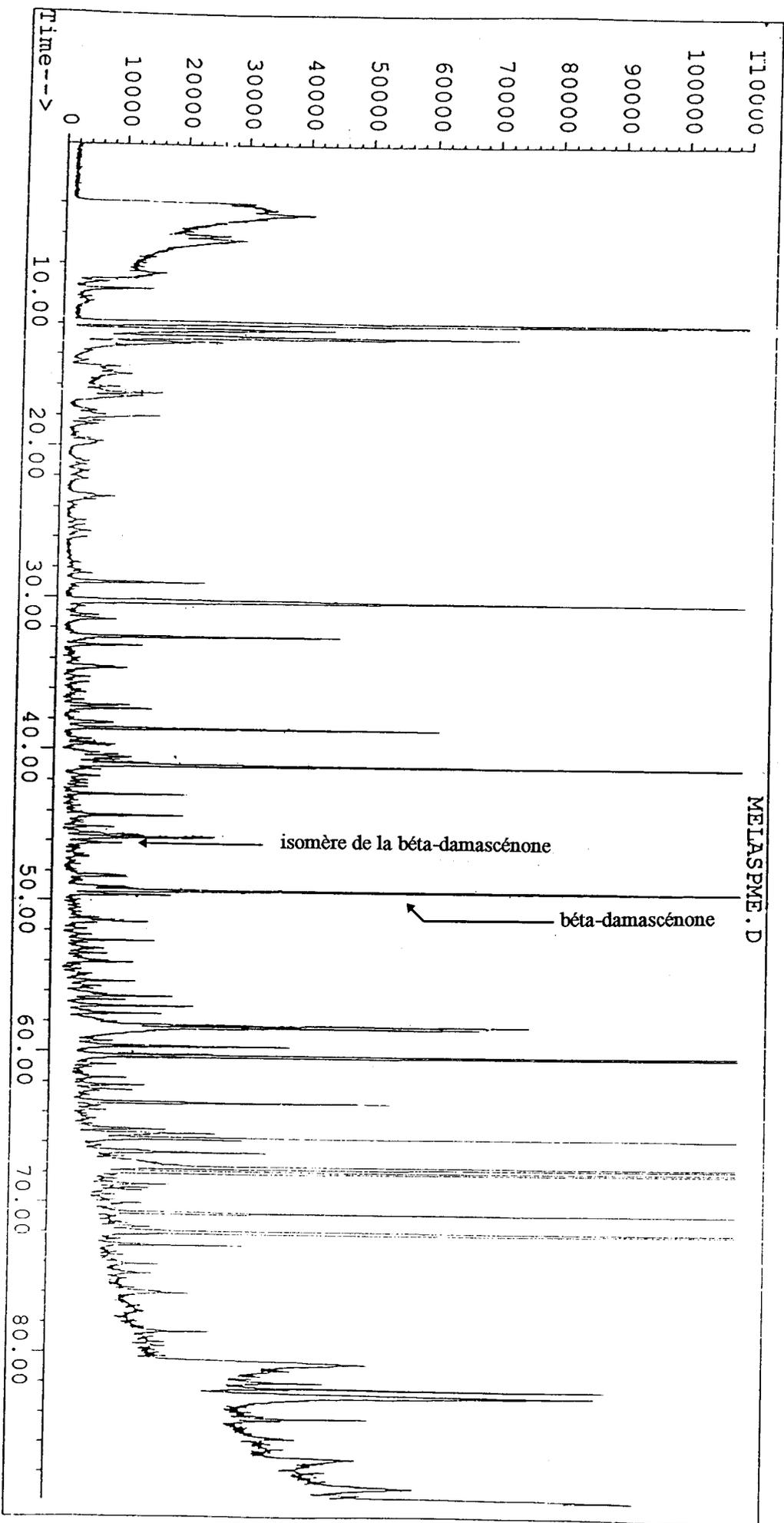


Figure 18 : Analyse de la mélasse par SPME.

Composés	Composés
Alcools	Esters
éthanol	décanoate d'éthyle
2-méthyl-1-butanol	acétate de 2-phényléthyle
3-méthyl-1-butanol	benzoate de butyle
2-éthyl-hexanol	Acides
phényl-2-propanol	acide furoïque
Phénols	acide octadécadièn-9,12-oïque
2-méthoxy-phénol	Pyrazines
4-éthyl-2-méthoxy-phénol	2,5-diméthyl-pyrazine
Terpènes	2,6-diméthyl-pyrazine
dl-limonène	2-éthyl-6-méthyl-pyrazine
géraniol	2-éthyl-5-méthyl-pyrazine
Dérivés des caroténoïdes	3-éthyl-2,5-diméthyl-pyrazine
TTN	Autres
TTN	thiobis-méthane
TTN	2-méthyl-butanal
TTN	2-pentyl-furanne
TTN	dihydro-2-méthyl-3(2H)-furanone
TDN	tétradécane
TDN	pentadécane
TDN	hexadécane
3,5,5-triméthyl-2-cyclohexèn-1-one	heptadécane
béta-cyclocitral	octadécane
béta-damascénone (isomère)	1-(1H-pyrrol-2-yl)-éthanone
béta-damascénone	acide 5-hydroxy-2-décénoïque lactone
béta-ionone	
3-(2-butényl)-2,4,4-triméthyl-2-cyclohexèn-1-one	

**Tableau 5 : Composés identifiés après analyse de l'espace de tête de la mélasse par SPME**

### - Les composés azotés.

Cinq alkylpyrazines sont présents dans l'espace de tête (Tableau 5). Ils sont le produit de réactions de condensation entre les sucres et les acides aminés (Gallois, 1984).

Nous pouvons également citer le **1-(1H-pyrrol-2-yl)-ethanone** provenant d'une réaction comparable.

Le cas des alkylpyrazines sera plus longuement traité ultérieurement.

### - Les produits de dégradation des nor-caroténoïdes (figure 19).

- La **béta-ionone** qui présente des notes de violette a été retrouvée dans la mélasse. D'après Laroe et al. (1970), on peut obtenir la béta-ionone par dégradation thermique des béta-carotènes.

- Le **trans-1-(2,6,6-triméthyl-1,3-cyclohexadien-1-yl)-2-buten-1-one** ou **béta-damascénone** est présent en relativement grande quantité dans l'espace de tête. Il a une note florale très puissante. La présence de la béta-damascénone a déjà été mentionnée dans de nombreux ouvrages sur le rhum (De Smedt et al., 1980 ; Dubois et al., 1975). D'après ces auteurs, elle pourrait caractériser les rhums car on la retrouve en assez grande quantité dans tous.

Nous avons par ailleurs détecté un composé présentant le même spectre de masse que la béta-damascénone (figure 20). Ce pourrait être un isomère de cette dernière. La présence de ce composé dans les rhums a déjà été mentionnée (Dubois et al., 1975). Ces auteurs précisent qu'il présente une note caractéristique proche du rhum. Sa présence dans la mélasse dans des proportions identiques à celles retrouvées dans les distillats indique qu'il n'est pas produit lors de la fermentation. Il pourrait être intéressant de vérifier si il est présent dans d'autres matières premières utilisées dans la fabrication de boissons alcoolisées. Sur une colonne polaire son pic est situé entre le pic du décanoate d'éthyle et celui du dodécanoate d'éthyle. Cependant ce composé a un temps de rétention légèrement inférieur à celui de la béta-damascénone. Ce composé ainsi que la béta-ionone existent en très faible quantité dans la mélasse et ne sont pas détectés lors des extractions effectuées sur les distillats. On peut penser toutefois qu'ils y sont présents. Compte tenu de leur très faible seuil de perception et de leur grande volatilité, ils peuvent intervenir dans l'arôme du produit dans lequel ils se trouvent.

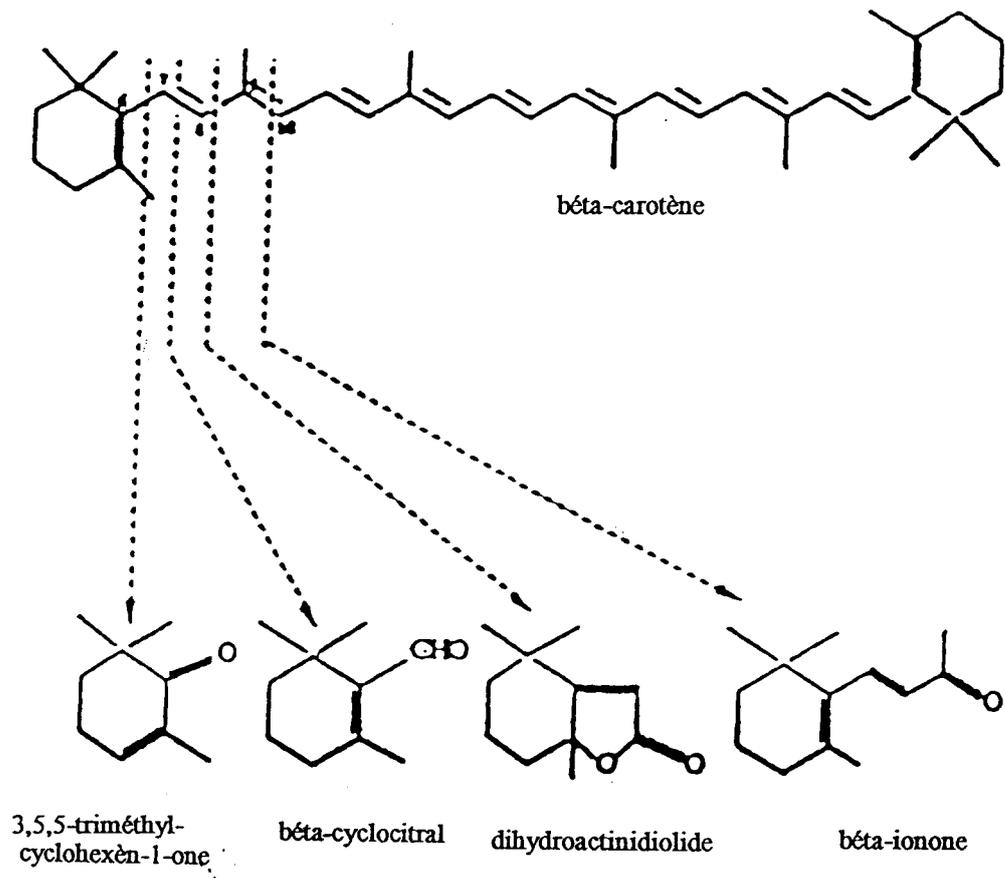
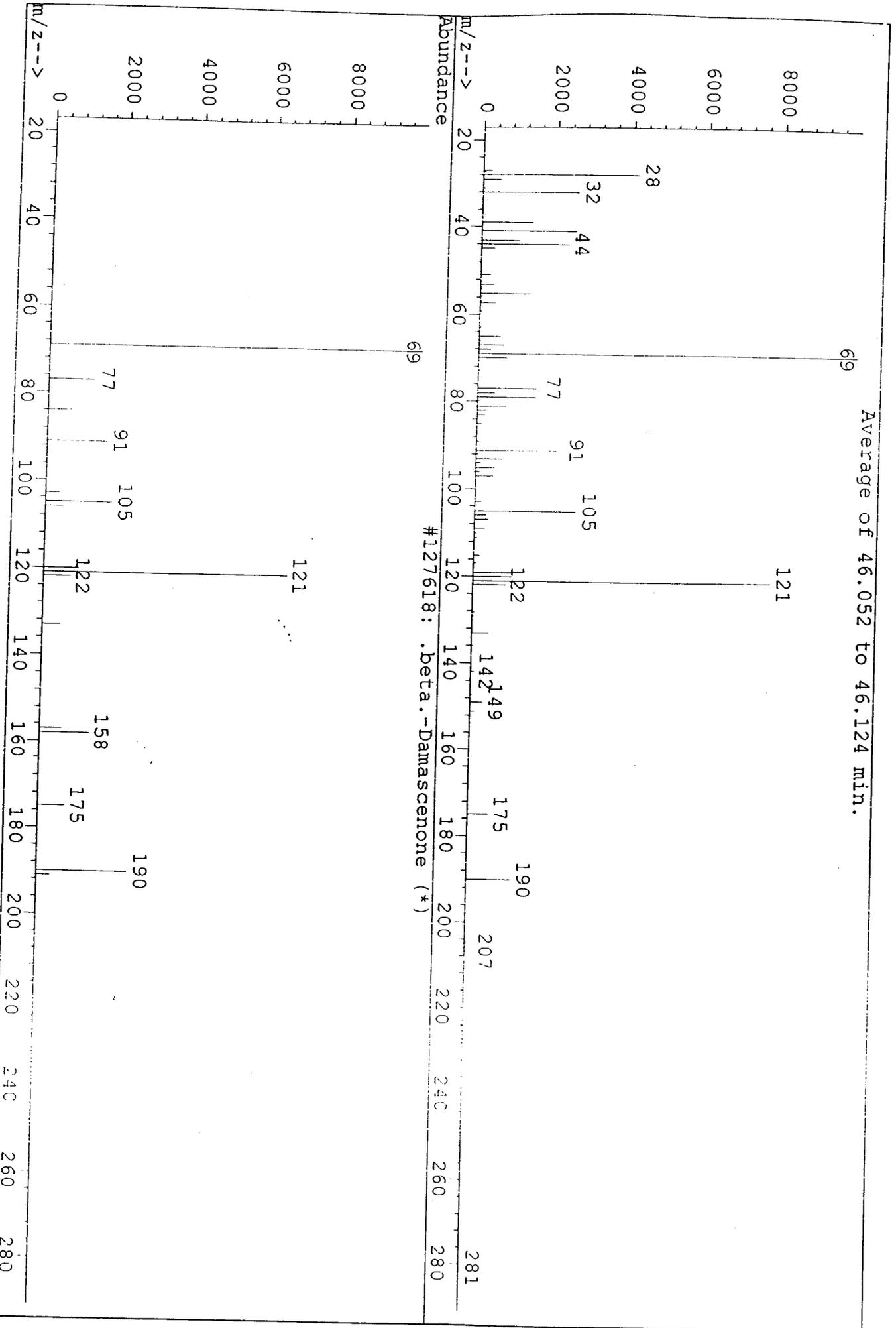


Figure 19 : Dégradation du bêta-carotène d'après Enzell (1986).

Figure 20 : Spectre de masse de l'isomère de la bêta-damascénone.



- Le **béta-cyclocitral** est lui aussi présent dans l'espace de tête de la mélasse.
- Le **3,5,5-triméthyl-2-cyclohexen-1-one** que l'on retrouve également dans les distillats est présent dans l'espace de tête de la mélasse.

- Nous avons pu déceler, dans l'espace de tête de la mélasse, cinq composés présentant le même spectre de masse que le **1,1,6-triméthyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalène (TTN)** ou **ionène**. Ce sont probablement des isomères de la ionène.

- Il en est de même du **1,1,6-triméthyl-1,2-dihydronaphthalène (TDN)** ou **déhydroionène** qui présente des notes aromatiques de kérosène et dont on observe une nette augmentation quantitative lors du vieillissement des vins (Strauss et al., 1987).

Tout comme la ionène, il est accompagné de deux isomères présentant le même spectre de masse.

De Smedt et al. (1975 ; 1980) ont déjà remarqué la présence de ces isomères de la ionène et de la déhydroionène. Ils précisent que ces composés ont été obtenus par Boget et Fourman en 1933 par déshydratation catalytique des alpha et béta-ionones.

#### - **Autres composés.**

De nombreux autres composés ont été identifiés dans l'espace de tête.

Signalons que deux composés phénoliques, le **2-méthoxy-phenol** et le **4-éthyl-2-méthoxy-phenol** (respectivement le gaïacol et le 4-éthyl-gaïacol), ont pu être identifiés. Ces composés que l'on retrouve en grande quantité dans la mélasse (cf II.2.5.2.) apportent une note aromatique de brûlé. Leur origine sera discutée ultérieurement

Le **benzoate de butyle**, composé olfactivement intéressant, n'a été retrouvé que dans l'espace de tête et dans l'extrait de mélasse, mais jamais dans les distillats.

Le **géraniol** est le seul terpénol identifié dans l'espace de tête. Il y est présent en quantité très faible. Son origine, ainsi que celle des autres composés terpéniques, sera discutée dans la dernière partie de ce chapitre.

Le seul terpène identifié dans l'espace de tête est le **limonène**, présent en très faible quantité. Nous soupçonnons la présence de l'**alpha-terpinène** par l'interprétation de son spectre de masse et de son indice de rétention.

Les autres composés identifiés ont été à chaque fois retrouvés dans les extractions que ce soit sur mélasse ou sur distillats.

\*

L'analyse de l'espace de tête statique telle que la SPME, bien que moins performante que l'analyse de l'espace de tête dynamique, nous a permis d'identifier 47 composés dont deux que l'on ne retrouve pas ultérieurement du fait de leur faible concentration et des limites qu'offrent la technique d'extraction employée par la suite.

### **II-5.2. Analyse de la mélasse après extraction au Lickens.**

L'extraction par Lickens avec un mélange initial de 10% d'éther et de 90% de pentane a donné des résultats satisfaisants. Le profil chromatographique est donné en annexe. Près de 350 pics ont été répertoriés, ce qui prouve le caractère extrêmement complexe de la mélasse. Une analyse en spectrométrie de masse nous a ensuite permis d'identifier un grand nombre de composés présents dans la mélasse. Parmi ceux-ci, la plupart ont été retrouvés par la suite dans les distillats, mais dans des proportions différentes du fait de l'intervention de certains de ces composés dans les processus biochimiques fermentaires. Nous avons reporté les composés identifiés dans les tableaux 6,7,8,9 et 10. Un certain nombre de commentaires s'impose.

#### **- Les aldéhydes.**

Ils sont globalement bien représentés dans l'extrait.

Le **2-propenal** ou acroleïne a été identifié dans la mélasse. Il peut provenir de l'action de micro-organismes lors du processus sucrier ou pendant la phase de conservation de la mélasse. En effet, Lencrerot et al. (1984) mentionnent que c'est l'un des produits de la dégradation du glycérol par certaines *Corynébactéries*. Fahrasmane (1983) le retrouve en fin de fermentation par des *Schizosaccharomyces*.

Le **2-methylbutanal** et le **3-methylbutanal** sont présents en assez grande quantité (plus de 1% de la surface totale des pics). Ce sont des précurseurs possible du 2-methyl-1-butanol et du 3-methyl-1-butanol. Cependant, comme nous l'avons déjà vu précédemment, ils ne sont à l'origine que d'une faible proportion de ces alcools supérieurs, qui sont issus essentiellement du métabolisme des sucres et des acides aminés de la levure.

	indices de rétention	
	colonne polaire	colonne apolaire
<b>Composés azotés</b>		
Méthyl-pyrazine	1268	810
2,5-diméthyl-pyrazine	1325	891
2,6-diméthyl-pyrazine	1331	899
Ethyl-pyrazine	1337	-
2,3-diméthyl-pyrazine	1349	905
2-éthyl-5-méthyl-pyrazine	1388	-
2-éthyl-6-méthyl-pyrazine	1394	-
Triméthyl-pyrazine	1407	-
3-éthyl-2,5-diméthyl-pyrazine	1448	-
2-éthyl-3,5-diméthyl-pyrazine	1464	-
2-éthényl-6-méthyl-pyrazine	1488	-
2-éthényl-5-méthyl-pyrazine	1494	-
1-(1H-pyrrol-2-yl)-éthanone	1971	-
<b>Aldéhydes</b>		
2-propénal	786	-
Méthyl-2-butanal	938	868
Méthyl-3-butanal	945	873
Hexanal	984	790
2-furancarboxaldéhyde	1462	825
Benzaldéhyde	1520	955
5-méthyl-2-furancarboxaldéhyde	1571	951
2-phényl-éthanal	1638	-
4-méthoxy-benzaldéhyde	2017	-
4-hydroxy-3-méthoxy-benzaldéhyde	>2500	-

**Tableau 6 : Composés azotés et aldéhydes identifiés dans la mélasse**

L'**hexanal**, présent en faible proportion, provient directement de la canne à sucre. Il peut conduire au 1-hexanol par réduction.

Le **benzaldéhyde**, qui présente une note aromatique d'amande amère, et le **phenyl-2-ethanal** ou phenylacetaldehyde, qui a une note aromatique proche de la jacinthe, représentent chacun près de 1% de l'extrait. Du fait de leur faible seuil de perception, ils interviennent dans l'arôme particulier de la mélasse.

Le **4-hydroxy-3-methoxy-benzaldehyde** ou vanilline est présent dans la mélasse. Le pic correspondant (0,12 % de la surface totale) se situe à la fin du chromatogramme (82,790 mn) compte tenu du caractère polaire de la phase de la colonne. Ce composé dégage la note caractéristique de la vanille. Sa présence dans la mélasse a déjà été mentionnée (Hashizume et al., 1968). Il provient de la dégradation de la lignine et se retrouve en relativement grande quantité dans les boissons alcoolisées vieillies dans les fûts de chêne. Il est généralement accompagné d'autres aldéhydes aromatiques tels que le syringaldehyde, le coniferaldehyde et le sinapaldehyde.

Le **4-methoxy-benzaldéhyde** a été identifié dans la mélasse en très faible quantité.

Le **béta-cyclocitral** dont l'origine a déjà été discutée est également présent.

Le **2-furancarboxaldehyde** ou furfural et le **5-methyl-2-furancarboxaldehyde** ou 5-methyl-furfural sont des composés majeurs de la mélasse. Le pic du furfural représente 2,83 % de la surface totale des pics. Il est formé essentiellement au cours des différents traitements thermiques conduisant à la mélasse. Le pic du 5-methyl-furfural représente quant à lui 0,99 % de la surface totale. Son origine est sans doute identique à celle du furfural. Leur présence apporte une note de caramel.

Le furfural est accompagné de l'alcool et de l'acide correspondants. Il s'agit du **2-furanmethanol** ou alcool furfurylique qui est en quantité importante (3,14 % de la surface totale des pics) et qui peut provenir en partie de la réduction du furfural ; et de l'**acide 2-furancarboxylique** (4,53 % de la surface totale des pics) ou acide furoïque qui provient également du traitement thermique subi par la mélasse.

Enfin on peut noter également l'existence dans la mélasse de l'**acétate de furfuryle** (0,1 %) issu probablement d'une réaction chimique entre l'acide acétique et le 2-furanmethanol.

Au total, le pic du furfural et ceux de ses dérivés représentent **11,59 %** de la surface totale des pics de la mélasse, attestant ainsi de leur importance dans l'arôme de la mélasse d'une part et de leur influence dans la composition finale du rhum d'autre part. Ceci explique en partie la prise en compte du furfural dans la réglementation des rhums. Ces composés apportent à la mélasse une note de caramel aisément perceptible.

#### - Les alkylpyrazines.

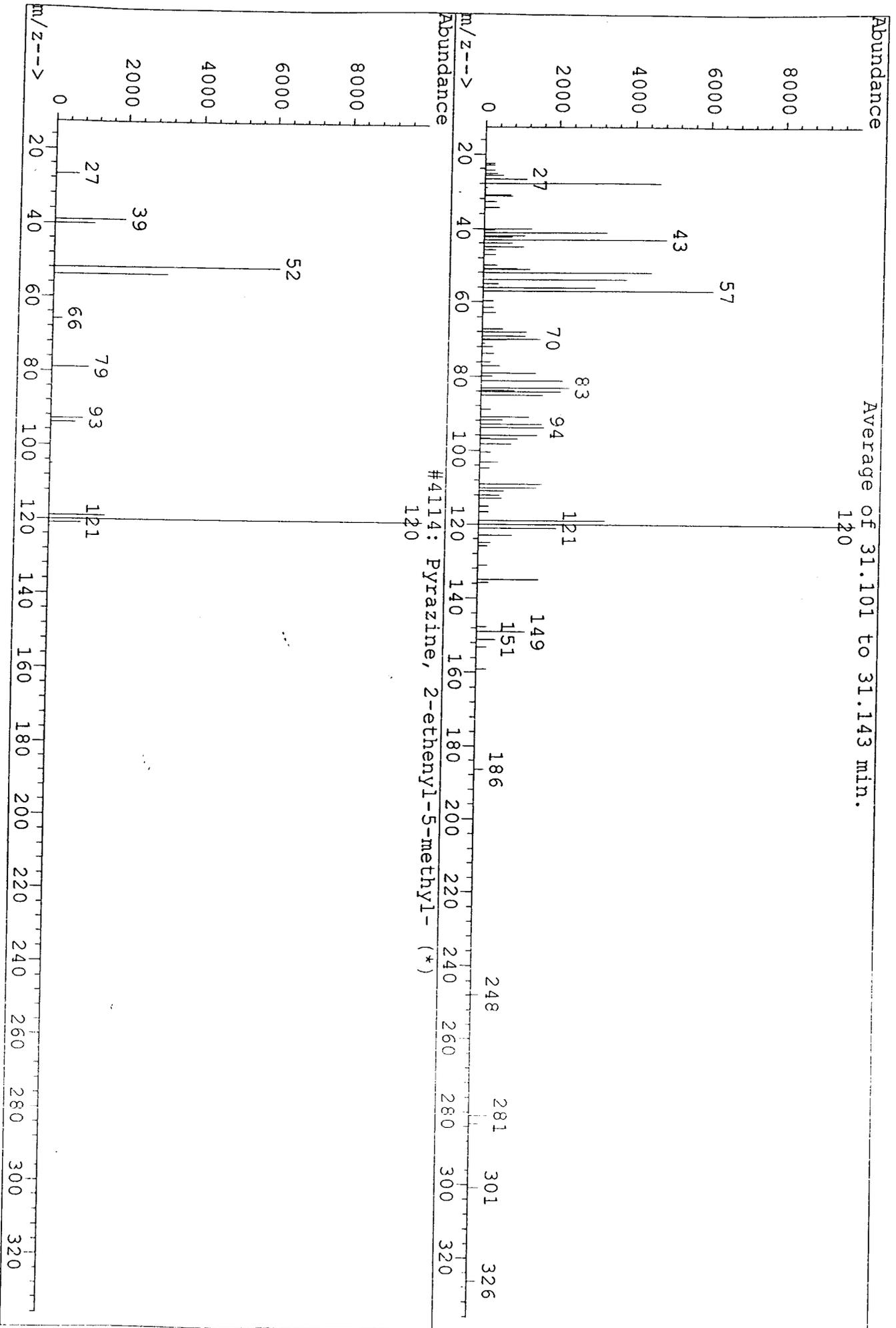
La technique d'extraction utilisée permet d'identifier un plus grand nombre d'alkylpyrazines que la technique d'espace de tête. En effet, tous les alkylpyrazines précédemment identifiés par Wobben (1971) ont été retrouvés. Au total, 13 alkylpyrazines ont pu être identifiés, c'est à dire la totalité de ceux que nous avons retrouvés dans les distillats. Leur synthèse, à l'issue d'une réaction de condensation entre les sucres et les acides aminés, intervient lors du process sucrier. Ils sont donc tous présents au stade de la préparation du moût et l'on peut penser qu'ils ne seront pas dégradés lors de la fermentation. On peut noter également la présence d'un alkylpyrazine jamais mentionné jusqu'à présent : le **2-ethenyl-5-methyl-pyrazine**, dont le spectre de masse (figure 21) est proche de celui du **2-ethenyl-6-methyl-pyrazine** mais dont le temps de rétention est légèrement supérieur.

Lorsque l'on regarde la quantité relative de ces alkylpyrazines, on s'aperçoit qu'ils ne sont pas négligeables puisqu'ils représentent chacun au moins 0,1 % de la totalité de l'extrait et jusqu'à 0,56 % pour le **2,5-dimethyl-pyrazine** et le **2,6-dimethyl-pyrazine**. L'ensemble des alkylpyrazines totalise 2,12 % de la surface des pics de la mélasse. Compte tenu de leur faible seuil de perception, on peut penser qu'ils contribuent à la note olfactive de la mélasse en apportant des notes aromatiques de brûlé.

#### - Les acides gras.

De nombreux acides gras sont présents dans la mélasse. Il est intéressant de noter la présence en quantités non négligeables d'acides gras à nombre impair d'atomes de carbone tels que l'**acide propionique** (0,06%), l'**acide 3-methyl-butyrique** ou acide isovalérique (0,44%), l'**acide pentanoïque** (0,1%), l'**acide heptanoïque** (0,08%) et l'**acide nonanoïque** (0,29%). On peut ajouter à cette liste l'**acide 2-methyl-propionique** ou acide isobutyrique (0,04%).

Figure 21 : spectre de masse du 2-éthényl-5-méthyl-pyrazine.



	indices de rétention	
	colonne polaire	colonne apolaire
<b>Acides</b>		
Acide acétique	1455	-
Acide propionique	1544	675
Acide 2-méthyl-propanoïque	1586	-
Acide butyrique	1635	746
Acide 3-méthyl-butérique	1683	-
Acide furoïque	1727	-
Acide pentanoïque	1748	874
Acide hexanoïque	1859	981
Acide heptanoïque	1964	1075
Acide octanoïque	2070	1153
Acide nonanoïque	2177	1263
Acide décanoïque	2285	1351
Acide dodécanoïque	2401	1542
Acide tétradécanoïque	>2400	1769
Acide octadécatrièn-9,12-oïque	>2400	-
<b>Alcanes</b>		
Décane	1000	1000
Undécane	1100	1100
Dodécane	1200	1200
Tridécane	1300	1300
Tétradécane	1400	1400
Pentadécane	1500	1500
Hexadécane	1600	1600
Heptadécane	1700	1700
Octadécane	1800	1800
Nonadécane	1900	1900

**Tableau 7 : Acides et alcanes identifiés dans la mélasse**

Tous ces acides sont absents ou présents seulement à l'état de traces après extractions effectuées sur les distillats. Cependant, le fait d'avoir utilisé un solvant d'extraction apolaire nous fait penser que nous sous-estimons leurs quantités dans la mélasse. Ces acides seront à l'origine d'une petite partie des esters éthyliques retrouvés par la suite dans les rhums.

Des acides gras à nombre pair d'atomes de carbone ont été identifiés. On les rencontre dans des plus grandes proportions dans les rhums que dans la mélasse. Ils ne proviennent probablement pas directement de la matière première mais plutôt de processus biochimiques intervenant lors de la fermentation. Ainsi l'**acide acétique** ne représente que 0,15% de l'extrait de mélasse. L'**acide hexanoïque** (0,2%), l'**acide octanoïque** (0,2%), l'**acide décanoïque** (0,82%), l'**acide dodécanoïque** (1,48%) et l'**acide tétradécanoïque** (0,78%) sont également présents dans les extraits de mélasse. De plus l'**acide butyrique** est présent dans la mélasse en quantité assez importante (0,37%) bien qu'il soit surtout identifié en grande quantité lors de certaines fermentations mixtes comme nous le verrons par la suite.

#### - Les alcanes.

La présence d'alcanes dans diverses boissons alcoolisées a déjà été mentionnée (Nykänen et al., 1983), mais leur origine n'a pas été élucidée. Certains pensent que ce sont des artéfacts qui proviennent de la technique d'extraction car cette dernière nécessite l'utilisation de solvants tels que le pentane ou l'hexane. Cependant, lors de l'analyse de l'espace de tête qui ne nécessite pas l'utilisation de solvant, nous avons pu détecter cinq alcanes : le **tétradécane**, le **pentadécane**, le **hexadécane**, le **heptadécane** et l'**octadécane**. Ce sont les alcanes les plus importants quantitativement dans la mélasse. On peut ainsi remarquer que le pic du tétradécane a une surface égale à **4,05%** de la surface totale des pics de la mélasse.

D'une manière générale, les alcanes n'influent pas sur la qualité organoleptique du produit dans lequel ils se trouvent. C'est le cas dans la mélasse bien qu'ils correspondent à **6,86%** de la surface totale des pics du chromatogramme de l'extrait de mélasse.

#### - Les composés issus de la dégradation des nor-caroténoïdes.

Ils sont également présents dans l'extrait, mise à part la bêta-ionone. On peut rajouter à tous ces composés le **2-cyclohexen-1-one**.

	indices de rétention	
	colonne polaire	colonne apolaire
<b>Dérivés des caroténoïdes</b>		
2-cyclohexèn-1-one	1433	-
TTN	1446	-
TTN	1479	-
TTN	1520	-
TTN	1585	-
3,5,5-triméthyl-2-cyclohexèn-1-one	1591	-
béta-cyclocitral	1619	-
TTN	1624	-
TDN	1740	-
isomère de béta-damascénone	1760	-
TDN	1816	-
béta-damascénone	1822	1362
TDN	1825	-
béta-ionone	1937	1485
<b>Composés phénoliques</b>		
2-méthoxy-phénol	1858	1059
Phénol	2004	1015
4-éthyl-2-méthoxy-phénol	2027	1250
4-éthényl-1,2-diméthoxy-benzène	2032	1328
2-méthoxy-4-(2-propényl)-phénol	2163	1326
4-éthyl-phénol	2173	1136
2,6-diméthoxy-phénol	2265	-
2-méthoxy-4-(1-propényl)-phénol	2344	1445
4-éthényl-phénol	2390	-

**Tableau 8 : Dérivés des caroténoïdes et composés phénoliques identifiés dans la mélasse.**

La bêta-damascénone représente **1,46%** de la totalité de l'extrait ce qui nous fait penser, compte tenu de son faible seuil de perception (14 ppb), que sa contribution olfactive est importante dans la mélasse. Son isomère, repéré dans l'espace de tête, a été également détecté dans l'extrait de mélasse (0,08%).

#### - Les monoterpènes et les terpénols.

Trois dérivés terpéniques ont été identifiés.

Le **linalol**, dont le pic est non négligeable (0,13% de la surface totale), se caractérise par une touche aromatique rappelant celle du coriandre. Il provient du géranyl-pyrophosphate par hydrolyse. Il est présent dans des proportions relatives proches de celles retrouvées dans les différents distillats.

Le **géraniol**, que l'on a également retrouvé dans l'espace de tête, possède une empreinte florale rappelant celle de la rose. Le pic qui lui correspond est inclus dans celui de l'acide hexanoïque. Sa présence dans les distillats est quantitativement plus importante que dans la mélasse. Nous traiterons le cas du géraniol ultérieurement.

Le **limonène** est présent en très faible quantité dans la mélasse.

#### - Les composés phénoliques.

Un grand nombre de composés phénoliques sont présents dans la mélasse. Ils présentent une importance à la fois qualitative et quantitative.

Le plus important quantitativement est le **2-methoxy-phénol** ou gaiacol dont le pic représente **2,23%** de la surface totale des pics. Il possède un seuil de perception assez faible et apporte une note phénolique et de brûlé.

On retrouve dans des proportions moindres le **4-ethyl-2-methoxy-phénol** (0,11%) qui a les mêmes caractéristiques organoleptiques.

Nous avons pu identifier le **phénol** (0,32%) qui apporte une note phénolique et pharmaceutique au produit et le **4-ethyl-phénol** (0,14%) qui présente des caractéristiques organoleptiques proches de celles du phénol.

	indices de rétention	
	colonne polaire	colonne apolaire
<b>Cétones</b>		
2,3-butanedione	962	580
Pentan-2-one	964	691
3-pentèn-2-one	1026	-
2,3-pentanedione	1053	689
Heptan-2-one	1082	885
1-(2-furanyl)-éthanone	1502	-
1-(2-furanyl)-propanone	1574	-
3-(2-butényl)-2,4,4-triméthyl-2-cyclohexèn-1-one	1980	-
<b>Terpènes</b>		
dl-limonène	1195	1036
linalol	1551	1075
géraniol	1855	1232
<b>Autres composés</b>		
Thiobis-méthane	<600	-
1,1-diéthoxy-éthane	845	714
méthyl-benzène	1041	-
1,3-diméthyl-benzène	1140	-
2-pentyl-furanne	1232	-
Dihydro-2-méthyl-3(2H)-furanone	1264	-
1,2,4-triméthyl-benzène	1280	-
diméthyl-trisulfide	1380	-
2-acétyl-5-méthyl-furanne	1600	-
3-phényl-furanne	1850	-
Acide-5-hydroxy-décèn-2-oïque lactone	2228	-

**Tableau 9 : Cétones, terpènes et divers composés identifiés dans la mélasse.**

Le **2-methoxy-4-(1-propenyl)-phénol** ou isoeugénol est retrouvé dans la mélasse avec une surface de pic correspondant à **0,22%** du total alors que le **2-methoxy-4-(2-propényl)-phénol** ou eugénol n'est présent qu'à l'état de trace dans l'extrait. Ils dégagent tous deux une odeur caractéristique de clou de girofle.

Enfin, le **2,6-dimethoxy-phenol** a été identifié. Le pic correspondant à ce composé est relativement important (0,24%).

Tous ces composés phénoliques sont généralement présents dans les boissons ayant subies une maturation. Leur formation a été étudiée. Il est clairement établi que les acides cinnamiques peuvent conduire à ces composés par dégradation thermique (Fiddler et al., 1967 cités par Albagnac, 1975) ou par décarboxylation sous l'action de micro-organismes (Albagnac, 1975).

#### - Les cétones.

Parmi les cétones rencontrées dans la mélasse, nous pouvons citer le **2,3-butanedione** (diacétyle) et le **2,3-pentanedione** qui représentent respectivement 0,98% et 0,15% de l'extrait. On les rencontre dans de nombreuses boissons alcoolisées. Leur formation a fait l'objet de multiples études, compte tenu de leur faible seuil de perception et des saveurs désagréables qu'ils peuvent engendrer quand ils sont présents en trop grande quantité. Selon leur concentration, leur saveur peut varier d'une note fruitée à une note prononcée de beurre rance.

Il est admis que le 2,3-butanedione est issu de la décomposition spontanée de l'acide alpha-acétolactique, qui est lui-même un intermédiaire dans la biosynthèse de l'alpha-oxoisovalerate. Ce dernier est pour sa part un précurseur de la valine, de la leucine ou de l'isobutanol (Nykänen et al, 1983). Il se peut que la mélasse étudiée ait été en partie contaminée par un micro-organisme qui serait à l'origine de ces composés.

De même le 2,3-pentanedione provient de l'acide alpha-aceto-alpha-hydroxybutyrique qui est un intermédiaire dans la synthèse de l'isoleucine, et de l'alcool amylique optiquement actif.

La synthèse de ces deux dicétones est accélérée par une élévation de la température. Elle se fait à l'extérieur de la cellule de levure. On peut penser que les deux précurseurs sont

déjà présents dans le milieu et que l'élévation de température pendant le process sucrier favorise leur décomposition.

#### - Les alcools.

Certains alcools identifiés peuvent provenir d'une action microbienne. C'est le cas du **2-méthyl-1-propanol**, du **2-méthyl-1-butanol** et du **3-méthyl-1-butanol** que nous avons retrouvés à l'état de traces dans la mélasse. La synthèse de ces alcools supérieurs est généralement liée à la fermentation éthanolique. Les alcools amyliques peuvent provenir également d'une simple réduction du 2-méthyl-butanal et du 3-méthyl-butanal que nous avons décelés en quantités relativement importantes dans la mélasse. La présence de l'isobutanol pourrait être rapprochée de celle du 2,3-butanedione, ces deux composés possédant un intermédiaire commun : l'alpha-oxoisovalérate.

D'autres alcools, comme l'**alcool benzylique** et le **phenyl-2-ethanol** proviennent directement de la matière première. Ils ont des propriétés olfactives intéressantes puisque le premier apporte une note de douceur et le second présente un arôme proche de celui du miel ou de la rose selon les auteurs. Bien que le phenyl-2-ethanol puisse provenir de la phénylalanine on sait également qu'il existe à l'état naturel dans divers fruits. Tout comme l'alcool benzylique, il peut également exister sous une forme glycosylée, notamment dans le raisin (Williams et al., 1983). Ces deux alcools représentent respectivement 0,12% et 0,37% de la surface totale des pics de la mélasse.

#### - Les autres composés.

Parmi les autres composés identifiés, on peut noter la présence du **4-ethenyl-1,2-dimethoxy-benzene** ou vinyl-4-anisole (0,18%).

Les esters présents sont :

- soit des acétates dérivés d'alcools présents dans la mélasse ; ce sont l'**acétate de 2-phenylethyle** (0,19%), l'**acétate de furfuryle** (0,1%) ou encore l'**acétate d'éthyle** (0,02%).

	indices de rétention	
	colonne polaire	colonne apolaire
<b>Esters</b>		
Acétate d'éthyle	840	602
Acétate de 2-furanméthanol	1537	981
Décanoate d'éthyle	1643	1380
2-hydroxy-benzoate de méthyle	1771	1189
Acétate de 2-phényl-éthanol	1816	1224
Benzoate de butyle	1861	-
Hexadécanoate de méthyle	2217	-
Octadécanoate de méthyle	>2400	-
Octadécèn-9-oate de méthyle	>2400	-
Octadécadièn-9,12-oate de méthyle	>2400	-
<b>Alcools</b>		
Ethanol	895	500
2-méthyl-propanol	1060	625
Butan-1-ol	1146	662
2-méthyl-1-butanol	1212	719
3-méthyl-1-butanol	1212	721
2-éthyl-hexanol	1494	-
Alcool benzylique	1880	1020
Phényl-2-éthanol	1914	1082
Phényl-2-propanol	2049	1201

**Tableau 10 : esters et alcools identifiés dans la mélasse.**

- soit des esters méthyliques tels que le **2-hydroxy-benzoate de méthyle** (0,1%) ou salicylate de méthyle, l'**hexadécanoate de méthyle** (0,14%), l'**octadécanoate de méthyle** (0,07%), l'**octadécadecen-9-oate de méthyle** (0,14%) et l'**octadécadien-9,12-oate de méthyle** (0,16%).

- le seul ester éthylique identifié autre que l'acétate d'éthyle est le **décanoate d'éthyle**.

\*

Nous avons pu identifier quelques uns des 350 composés présents dans la mélasse étudiée. L'identification des nombreux autres composés pourrait permettre de mieux comprendre la composition des distillats. Cependant le travail accompli nous permet déjà de voir à quel point la composition d'une matière première aussi complexe que la mélasse peut avoir une incidence sur la qualité finale du rhum. La variété de canne à sucre, le process sucrier et la région de production induisent des variations dans la composition des mélasses qui influencent ensuite de manière significative la composition finale des rhums.

On peut noter que la mélasse de la Réunion est très riche en produits de dégradation des nor-caroténoïdes et notamment en bêta-damascénone. Ces composés particuliers ne sont pas utilisés par les micro-organismes pendant la fermentation et sont présents, à priori dans des quantités similaires, à chaque étape de fabrication du rhum.

Certains composés présents dans la mélasse ont des propriétés aromatiques qui sont inhibées. C'est le cas des hétérosides qui ne sont pas volatils. Cependant, ces composés glycosylés sont considérés comme des précurseurs d'arômes : ils peuvent en effet être rendus volatils sous l'action enzymatique et dégager ainsi leur arôme. On rencontre des composés glycosylés dans de nombreux fruits et organes végétaux (raisin, abricot, pomme, géranium).

La mélasse étant d'origine végétale, nous avons voulu savoir si ces composés y étaient présents. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'action d'une bêta-glucosidase et à son effet sur la composition aromatique de la mélasse.

### **III- Cas particulier des précurseurs d'arôme.**

#### **Les terpènes glycosylés et leur potentiel aromatique.**

Deux classes de composés particulièrement intéressantes d'un point de vue organoleptique sont celle des monoterpènes et dans une moindre mesure celle des sesquiterpènes. Ces deux classes sont bien représentées dans de nombreux fruits comme le raisin. Les monoterpènes et les sesquiterpènes sont les constituants principaux des huiles essentielles issues de fleurs (ylang-ylang), de fruits (orange) ou de feuilles (géranium). Des composés appartenant à ces deux classes ont également été identifiés dans l'ensemble des boissons fermentées, qu'elles soient distillées ou non (tableau 11). Leur origine est en grande partie végétale même si l'on sait que certains micro-organismes ont la capacité de synthétiser eux-mêmes certains terpènes (Drawert et al.,1978).

#### **III-1. Les composés terpéniques.**

##### **III-1.1. Les terpènes.**

Les terpènes présentent la particularité de pouvoir être décomposés en unités isopréniques. On les classe alors selon le nombre d'unités qu'ils renferment.

On distingue ainsi :

- les hémiterpènes ( $C_5$ ) formés d'une seule unité isoprénique.
- les monoterpènes ( $C_{10}$ ) formés de deux unités isopréniques.
- les sesquiterpènes ( $C_{15}$ ) avec trois unités isopréniques.
- les diterpènes ( $C_{20}$ ).
- les sesterpènes ( $C_{25}$ ).
- les triterpènes ( $C_{30}$ ).
- les caroténoïdes ( $C_{40}$ ).
- les caoutchoucs ( $(C_5)_n$ ) : comprenant n unités isopréniques.

Terpènes	Boissons
<i>p</i> -cymène	vin, bière
<i>m</i> -cyménol	cognac
<i>p</i> -cyménol	cognac
<i>d</i> -carvone	bière
myrcène	vin, bière, gin
alpha-terpinène	gin
béta-phellandrène	gin
gamma-terpinène	gin
terpinolène	gin
alpha-phellandrène	gin
limonène	vin, bière, cognac, gin
alpha-thujène	gin
sabinène	gin
alpha-pinène	whisky, gin
béta-pinène	gin
hotriénol	vin
citral	bière
myrcénol	cognac
béta-cyclocitral	brandy
phellandral	cognac
linalol	vin, bière, cidre, cognac, rhum
nérol	vin, bière, cognac, gin
géraniol	vin, bière, cognac, gin, rhum
alpha-terpinéol	vin, bière, cognac, gin, rhum
gamma-terpinéol	cognac
1,8-cinéole	bière, cognac, gin
oxydes de linalol	vin, bière, cognac, gin, rhum
citronellol	bière, cognac, gin
menthol	rhum
damascénone	vin, bière, cognac, gin, rhum
alpha-ionone	vin, cognac, whisky
béta-ionone	vin, bière, cognac, whisky
Edulan I	cognac
nérolidol	bière, cognac, brandy
farnésol	vin, cognac, brandy

**Tableau 11 : Quelques composés terpéniques identifiés dans les boissons alcoolisées (d'après Nykänen et Suomalainen, 1983)**

Leur rôle dans la plante n'a pas été complètement élucidé à ce jour mais l'on pense qu'ils interviennent activement dans le métabolisme des végétaux.

Dans cette étude, nous nous intéresserons uniquement à la classe des monoterpènes et plus particulièrement aux alcools qui en dérivent. D'après Vasserot et al. (1995), on peut classer ces alcools en cinq groupes distincts selon qu'ils sont acycliques (géraniol, linalol, nérol, citronello), monocycliques (*l*-menthol, *d*-néomenthol, alpha-terpinéol), bicycliques, irréguliers ou tricycliques. Seuls les deux premiers groupes sont concernés par notre étude dans la mesure où ce sont les terpènes les plus représentés dans les rhums.

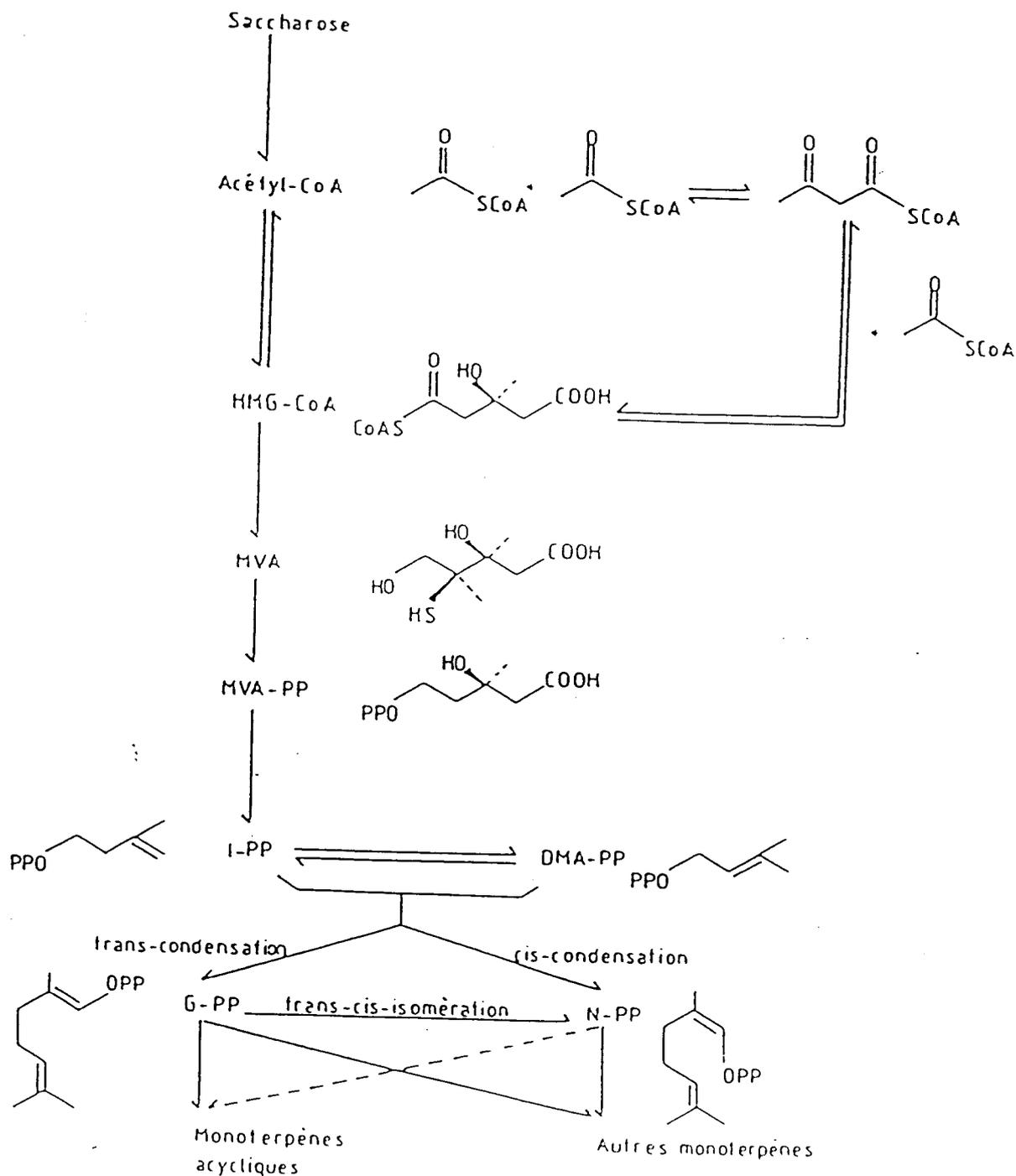
Ces terpènes sont le produit d'une succession de réactions, comme le montre la figure 22. On peut noter à nouveau le rôle joué par les acétyl-coenzyme A, déjà impliqués dans la formation des acides gras. Au départ, trois molécules d'acétyl-coenzyme A se condensent pour former le 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A. Celui-ci réagit pour donner l'acide mévalonique. L'acide mévalonique conduit ensuite au pyrophosphate d'isopentényle et au pyrophosphate de diméthylallyle, dont le mélange constitue l'isoprène actif. La condensation de ces deux composés aboutit à la formation du pyrophosphate de géranyle qui est le précurseur des monoterpènes acycliques. Pour leur part, les monoterpènes cycliques tels que le *l*-menthol ou l'alpha-terpinéol sont issus du pyrophosphate de néryle qui est obtenu par l'action d'une isomérase sur le pyrophosphate de géranyle.

Dans le cas de la formation des sesquiterpènes tels que le farnésol ou le nérolidol, une molécule de pyrophosphate d'isopentényle se condense avec le pyrophosphate de géranyle conduisant à la formation du pyrophosphate de *trans*-farnésyle.

### III-1.2. Les hétérosides terpéniques.

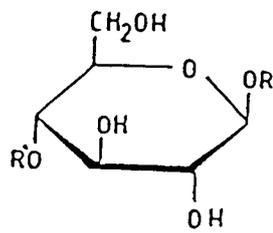
Tous les monoterpènes présents dans la plante peuvent être à l'état libre ou bien sous forme d'hétérosides monoterpéniques. Les monoterpènes glycosylés perdent leurs propriétés olfactives et ne sont pas volatils. Ils possèdent un potentiel aromatique qui ne peut être exprimé que par l'intervention d'enzymes.

Cordonnier (1956) fut le premier à soupçonner l'existence de ces hétérosides qui, par la suite, fut confirmée par divers auteurs (Cordonnier et al., 1974 ; Williams et al., 1980 ; Mulkens, 1987). Il en existe un grand nombre selon la nature du sucre qui intervient : par exemple le bêta-D-glucose, le bêta-L-arabinose ou le bêta-D-galactose (figure 23).

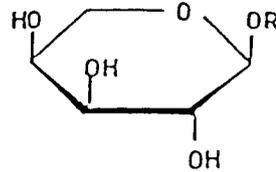


- |         |  |
|---------|--|
| HMG-CoA | : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A. |
| IPP     | : isopentényl-pyrophosphate.             |
| DMAPP   | : diméthylallyl-pyrophosphate.           |
| MVA     | : acide mévalonique.                     |
| GPP     | : géranyl-pyrophosphate.                 |
| NPP     | : néryl-pyrophosphate.                   |
| LPP     | : linalol-pyrophosphate.                 |

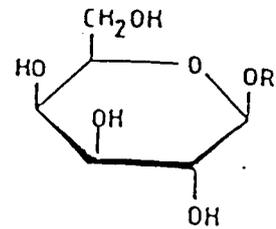
**Figure 22 : Voies de synthèse des différents monoterpènes, d'après Charlwood et Banthorpe, 1978.**



$\beta$ -D-glucopyranose.

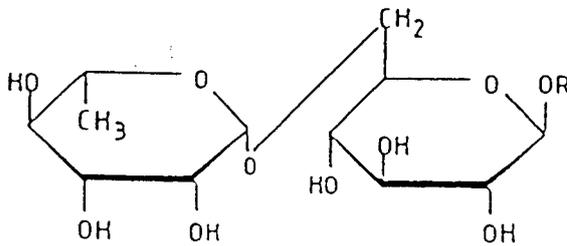


$\beta$ -L-arabinopyranose.

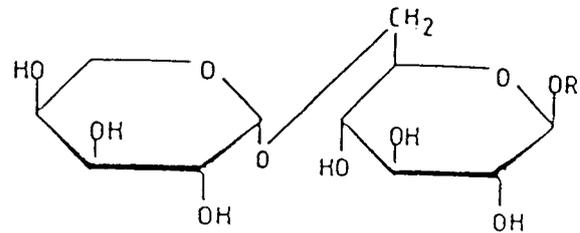


$\beta$ -D-galactopyranose.

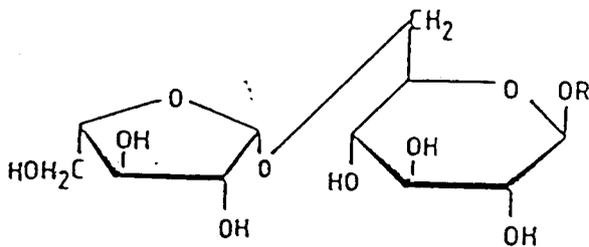
Copules monosaccharidiques.



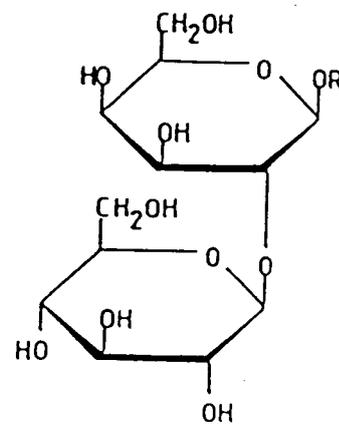
$\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1-6)-  
 $\beta$ -D-glucopyranose.



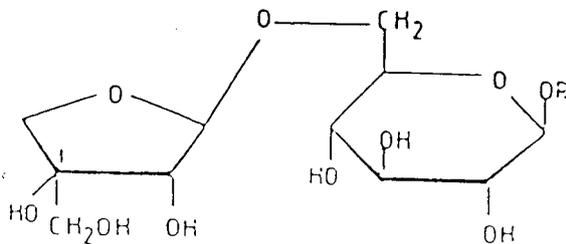
$\alpha$ -L-arabinofuranosyl-(1-6)-  
 $\beta$ -D-glucopyranose.



$\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1-6)-  
 $\beta$ -D-glucopyranose.



$\beta$ -L-glucopyranosyl-(1-2)-  
 $\beta$ -D-galactopyranose



$\beta$ -D-apiofuranosyl-(1-6)-  
 $\beta$ -D-glucopyranose.

Copules disaccharidiques.

Figure 23 : Principales copules glucidiques rencontrées au niveau des hétérosides monoterpéniques (R = monoterpènes).

Le rôle joué par ces hétérosides est mal connu et semble varier d'une espèce végétale à l'autre (Mulkens, 1987). De nombreuses enzymes sont impliquées dans la libération de ces terpènes. L'étude que nous avons menée porte uniquement sur l'action d'une bêta-glucosidase.

La libération des terpènes s'effectue par hydrolyse des hétérosides. Dans le cas des monoterpènes, elle peut s'effectuer de manière spontanée, par hydrolyse acide, comme l'ont montré Williams et al. (1982). Mais elle fait généralement intervenir un complexe enzymatique de nature glycosidasique. Le mécanisme proposé par Gunata et al. (1988) est représenté figure 24. Plusieurs glucosidases interviendraient dans la libération du terpénol.

### **III-2. Etude des hétérosides terpéniques de la mélasse.**

L'utilisation d'enzymes dans l'industrie agro-alimentaire est pratiquée depuis longtemps, que ce soit pour la fabrication de pains, de boissons ou de fromages. Les enzymes permettent d'effectuer des réactions chimiques que la simple utilisation de micro-organismes ne permet pas ou alors de manière trop lente. L'utilisation de ces enzymes a connu un essor dans le but également d'augmenter la puissance aromatique de certains produits ou d'accélérer le processus biochimique.

Nous avons voulu connaître pour notre part les conséquences sur la composition de la mélasse d'un traitement par une bêta-glucosidase.

#### **III-2.1. Mode opératoire.**

Nous avons travaillé sur une mélasse de la campagne de 1995. Celle-ci a été conservée à +4°C jusqu'au traitement enzymatique. La manipulation a consisté à faire agir une bêta-glucosidase sur cette mélasse. Après le traitement, nous avons procédé à une extraction des composés aromatiques. Nous avons ensuite comparé ces résultats à ceux obtenus avec une mélasse témoin. Cette comparaison se justifie par l'utilisation d'un étalon interne.

Nous avons suivi l'évolution de cinq terpénols (figure 25) :

- Le **3,7-diméthyl-octa-trans-2,6-dien-1-ol** ou géraniol.

Il provient de l'hydrolyse du pyrophosphate de géranyle.

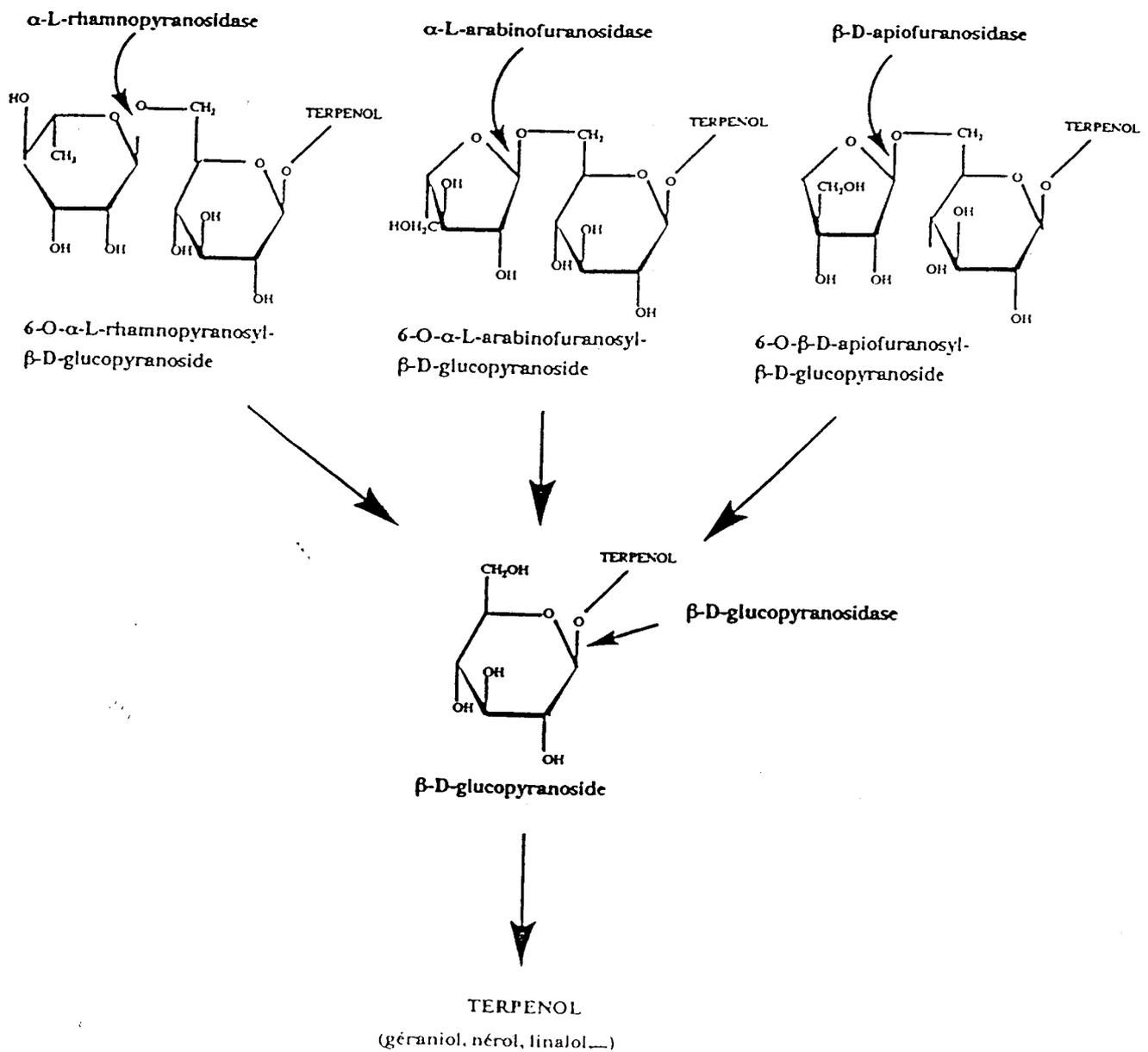
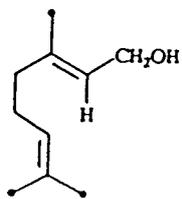
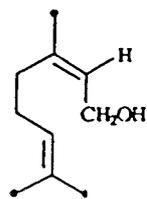


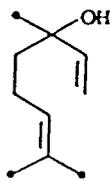
Figure 24 : Mécanisme de libération des terpénols proposé par Gunata et al., 1988.



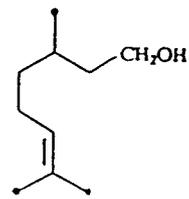
géraniol



nérol

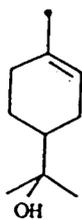


linalol



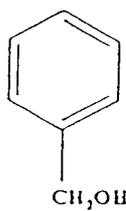
citronellool

Monoterpénols aliphatiques.

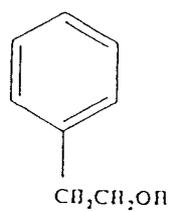


$\alpha$ -terpinéol

Monoterpénol monocyclique .



alcool benzylique



2-phényléthanol

Alcools cycliques

Figure 25 : Composés aromatiques suivis lors de l'étude des hétérosides.

- Le **3,7-diméthyl-octa-cis-2,6-dien-1-ol** ou nérol.

Trois hypothèses existent sur son mode de formation : il peut provenir de l'hydrolyse du pyrophosphate de géranyle, de l'hydrolyse directe du pyrophosphate de néryle ou de l'interconversion du géraniol par l'intermédiaire du géraniol puis du néral. Il présente une note florale.

- Le **3,7-diméthyl-octa-1,6-dien-3-ol** ou linalol.

Il dérive du pyrophosphate de géranyle par hydrolyse.

- Le **3,7-diméthyl-oct-6-en-1-ol** ou bêta-citronello.

Il provient de la réduction enzymatique du géraniol et du nérol. Il est caractérisé par une note florale.

- Le **p-menth-1-en-8-ol** ou alpha-terpinéol.

Il dérive du squelette du p-menthane par cyclisation et hydrolyse. Il présente une touche aromatique proche du lilas.

De plus, deux alcools aromatiques ont également été concernés par cette étude. Ce sont :

- L'**alcool benzylique**. Il apporte une note aromatique de douceur

- Le **phényl-2-éthanol**. Il se caractérise par une note aromatique proche de la rose ou du miel.

Ces deux composés se rencontrent également sous forme glycosylée, dans certains fruits tels que le raisin, la pêche, l'abricot ou la pomme.

L'enzyme avec laquelle les essais ont été réalisés est une bêta-glucosidase isolée à partir d'une souche mutante de *Candida molischiana* : *Candida molischiana* 35M5N (Janbon et al., 1994). Cette souche est hyperproductrice de bêta-glucosidases même en présence de glucose.

Cette enzyme a été longuement étudiée (Janbon et al., 1995, 1996). On sait que son pH optimum est de 3,5 et sa température optimale est de 55°C. Du fait du caractère légèrement acide de la mélasse (pH = 5,7), nous avons pensé qu'elle conviendrait pour des essais. Ce pH a été cependant ramené à 4 compte tenu de l'optimum d'activité de la bêta-glucosidase. L'action de cette enzyme, après fixation sur une résine Duolite A-568, avait été étudiée par Gueguen (1995) sur des jus de fruits et sur des muscats.

Les essais sur la mélasse ont été effectués à Montpellier à la Chaire de Microbiologie et de Génétique des Micro-organismes de l'E.N.S.A.M.

### III-2.2. Résultats et discussion (Tableau 12).

L'identification des composés, réalisée à l'E.N.S.A.M., se fonde uniquement sur leur indice de rétention, après injection en CPG des composés purs. De notre côté, nous avons effectué une analyse au spectromètre de masse qui a permis de confirmer ces premiers résultats.

L'utilisation d'un étalon interne (1-octanol), dont le temps de rétention est proche de celui du phényl-2-éthanol, nous fait penser que nous sous-estimons les résultats quantitatifs.

On peut observer une action très nette de la bêta-glucosidase sur la composition de la mélasse. En effet, après l'action de l'enzyme la quantité de géraniol est multipliée par 10 et celle d'un autre composé, non identifié, est multipliée par 26. Des composés qui pourraient être le limonène et l'alpha-terpinène ont quant à eux une concentration 8 fois supérieure. En revanche, les quantités de linalol et de nérol ne sont pas modifiées.

La mélasse est constituée de très nombreux autres composés. Il est donc difficile d'évaluer l'impact exact de l'enzyme à partir de l'étude des chromatogrammes.

\*

Ce travail constitue une étude préliminaire sur les précurseurs d'arôme présents dans la mélasse. Il conviendrait de compléter cette étude en déterminant la nature et la quantité exacte de ces hétérosides. On peut affirmer dès à présent qu'il existe dans la mélasse de nombreux composés sous forme glycosylée, parmi lesquels le géraniol. Ces hétérosides terpéniques pourraient constituer une forme de stockage des sucres dans la plante. Ils représentent un potentiel aromatique non négligeable et leur présence reflète le caractère complexe de la mélasse.

La plupart des souches de *Saccharomyces cerevisiae* possèdent des bêta-glucosidases qui sont peu ou pas actives dans les conditions de fermentation. De plus, elles sont généralement intracellulaires ce qui limite leur action sur les hétérosides.

Ce travail permet d'envisager la possibilité de traitements préalables de la mélasse avec une bêta-glucosidase ou d'utilisation de micro-organismes possédant une bêta-glucosidase qui

Concentration des composés (en mg par litre de mélasse diluée).

	mélasse témoin	mélasse enzymée
1	0,02	0,13
2	0,35	0,43
3	0,17	1,39
4	0,23	0,3
linalol	0,4	0,31
nérol	0,2	0,18
géraniol	0,13	1,24
5	0,17	4,57

**Tableau 12 : action d'une béta-glucosidase sur la mélasse**

- 1 : temps de rétention de l'alpha-pinène
- 2 : temps de rétention du béta-pinène
- 3 : temps de rétention du limonène et de l'alpha-terpinène
- 4 : temps de rétention du gamma-terpinène
- 5 : temps de rétention du béta-caryophyllène

**Remarque** : l'alcool benzylique, l'alpha-terpinéol et le béta-citronellool sont présents en trop faible quantité pour que les résultats puissent être interprétés.  
De plus, le phényl-2-étanol a un temps de rétention proche de l'étalon interne.  
On ne peut donc pas calculer la concentration de ce composé.

soit extracellulaire et active dans les conditions de fermentation, afin de permettre la libération de ces terpènes et donc d'augmenter la puissance aromatique du produit final.

## **Conclusion.**

Cette étude de la composition de la mélasse montre toute la complexité d'un tel produit. La présence de plus de 350 composés chimiques de natures très diverses dans la mélasse atteste d'un potentiel aromatique important. La présence de chacun de ces composés est conditionnée par la nature du matériel végétal utilisé (variété de canne à sucre cultivée, mais aussi état sanitaire de la plante, stade de maturité au moment de la récolte, etc) et par le process sucrier utilisé pour aboutir à la mélasse.

La présence de composés tels que les hétérosides terpéniques, montre que la nature des micro-organismes impliqués dans l'étape de fermentation est déterminante dans la qualité du produit final. En effet, seuls les micro-organismes possédant les enzymes qui permettent la libération de ces terpènes, pourront exploiter ce potentiel aromatique de la mélasse.

Bien que l'étape de distillation permette à la fois de classer les différents composés le long de la colonne à distiller (et ainsi d'en éliminer certains) et de provoquer certaines réactions chimiques comme les estérifications, l'étape la plus importante reste la fermentation au cours de laquelle ont lieu les principales transformations biochimiques. Le choix des souches de micro-organismes joue donc un rôle primordial. C'est ce que nous nous proposons d'étudier à présent.

# **ETUDE DE L'INFLUENCE DE QUELQUES MICRO-ORGANISMES DANS LA FERMENTATION RHUMIERE**

---

Nous avons voulu nous intéresser uniquement à des micro-organismes qui sont susceptibles d'être rencontrés dans un milieu tel que les moûts à base de mélasse. Nous avons donc choisi des levures et des bactéries dont la présence était systématiquement rapportée dans la bibliographie. Nous en avons sélectionné un certain nombre qui nous paraissait susceptibles d'avoir un impact pendant la phase de fermentation. Nous avons voulu comparer la composition des produits obtenus après l'utilisation en fermentation de différentes souches de *Saccharomyces cerevisiae* afin de montrer toute l'importance de la sélection d'une souche à l'intérieur d'une même espèce.

Au départ, l'étude a porté sur 7 souches de levures et sur 9 souches de bactéries.

## **I- Les levures étudiées.**

Les levures sont, dans le cas qui nous intéresse, les micro-organismes responsables de la fermentation alcoolique et donc de la production d'éthanol. Nous avons sélectionné 7 levures pour notre étude. Celles-ci sont réparties en deux genres.

## **I-1. Les levures du genre *Saccharomyces*.**

Les levures étudiées appartiennent à la classe des Eumycètes. Ce sont des Ascomycètes de l'ordre des Endomycétales, de la famille des *Saccharomycetaceae* et du genre *Saccharomyces*.

Nous avons retenu 6 levures appartenant à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*. Ce sont les levures les plus couramment utilisées pour les fermentations alcooliques. Parmi ces 6 levures, une appartient à l'espèce autrefois distincte des *Saccharomyces bayanus*, mais qu'aujourd'hui on inclut dans l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*.

Les 6 levures du genre *Saccharomyces* sont :

- La souche *Saccharomyces cerevisiae* sd12.
- La souche *Saccharomyces cerevisiae* sd13.
- La souche *Saccharomyces cerevisiae* sd65.

Les trois souches précédemment citées sont celles communément utilisées à la distillerie de Savanna.

- La souche *Saccharomyces cerevisiae* sm102.
- La souche *Saccharomyces cerevisiae* 71b.
- La souche *Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus* 67j.

### **I-1.1. Caractères morphologiques.**

Ce sont des cellules sphériques d'environ 11µm de diamètre. Elles se multiplient de manière asexuée par bourgeonnement multipolaire.

Lors de la reproduction sexuée, des asques contenant quatre ascospores, se forment.

Parmi ces 6 souches, la souche sd12 est la seule à flocculer.

### **I-1.2. Caractères physiologiques.**

Toutes ces levures ont la capacité d'utiliser le saccharose, le fructose et le glucose aussi bien par la voie oxydative que par la voie fermentaire. Elles sont dites anaérobies facultatives, de type fermentaire ; c'est à dire qu'en présence d'oxygène et de glucose, elle privilégie le

métabolisme fermentaire. En effet, une partie des enzymes respiratoires est réprimée par les sucres. Leur température optimale de croissance est de 30°C. On constate qu'elles résistent à des températures supérieures à 40°C, bien que leurs performances soient diminuées.

## **I-2. Les levures du genre *Schizosaccharomyces*.**

Les *Schizosaccharomyces* appartiennent à la classe des Eumycètes. Ce sont des Ascomycètes de l'ordre des Endomycétales, de la famille des *Saccharomycetaceae* et du genre *Schizosaccharomyces*.

Les levures du genre *Schizosaccharomyces* ont toujours été présentes dans la majorité des milieux de culture de rhumerie en raison de leur capacité d'adaptation aux conditions extrêmes : milieu à forte pression osmotique, acidité élevée, etc. Aujourd'hui, on les retrouve uniquement dans les cas de fabrications de rhums particuliers. Leur abandon est du à leur faible vitesse de développement et à leur faible productivité éthanolique, bien qu'elles soient très alcooligènes.

Nous avons choisi une levure de l'espèce des *Schizosaccharomyces pombe*, qui est l'espèce appartenant au genre des *Schizosaccharomyces* la plus souvent rencontrée dans les rhumeries. La levure de l'espèce *Schizosaccharomyces pombe* que nous avons étudiée nous a été fournie par ATCC.

### **I-2.1. Caractères morphologiques.**

Les levures de l'espèce *Schizosaccharomyces pombe* sont de taille légèrement inférieure aux *Saccharomyces cerevisiae*.

Leur multiplication végétative se fait par scissiparité. Les cellules, ovoïdes, s'allongent jusqu'à la formation d'une paroi transversale depuis l'extérieur vers l'intérieur. Les deux cellules obtenues ont la même taille, ce qui n'est pas le cas chez d'autres genres tels que les *Saccharomyces* (la cellule fille est alors plus petite). Compte tenu de ce mode de réplication particulier, elles se développent moins vite que les *Saccharomyces cerevisiae*. Ce sont les seules levures présentant ce type de multiplication asexuée.

La reproduction sexuée, lorsqu'elle a lieu, se fait par sporulation. Chez l'espèce *Schizosaccharomyces pombe*, chaque asque contient 4 spores.

La souche de *Schizosaccharomyces pombe* que nous avons étudiée est une levure qui floccule en formant des amas de cellules visibles au microscope.

### **I-2.2. Caractères physiologiques.**

Ces levures sont anaérobies facultatives de type fermentaire. Elles sont capables d'utiliser le saccharose, le fructose et le glucose. Elles peuvent également, à la différence des *Saccharomyces*, dégrader l'acide malique en éthanol et ont la capacité d'oxyder le citrate dans des proportions appréciables.

Les *Schizosaccharomyces pombe* ont une température de croissance optimale d'environ 30°C. Elles résistent également à des températures supérieures à 40°C. Les *Schizosaccharomyces* s'adaptent facilement aux milieux acides, dans lesquels la dégradation de l'acide malique est favorisée. De plus, ce sont des levures osmophiles résistant très bien à de fortes pressions osmotiques.

## **II- Les bactéries étudiées.**

Dans le cadre de notre étude, nous avons été amenés à sélectionner un certain nombre de bactéries, parmi celles qui appartiennent à des genres présents naturellement dans les milieux de fermentation. Partant du principe qu'il est tout aussi intéressant d'étudier des bactéries indésirables que des bactéries pouvant contribuer à une amélioration du produit, nous avons choisi :

- une souche du genre des *Acetobacter* : *Acetobacter diazotrophicus*.
- une souche du genre des *Micrococcus* : *Micrococcus luteus*.
- deux souches appartenant au genre des *Lactobacillus* : *Lactobacillus hilgardii* et *Lactobacillus pentosus*.
- trois souches appartenant au genre des *Clostridium* : deux *Clostridium beijerinckii* (nommés A et B) et un *Clostridium butyricum*.
- une souche appartenant au genre des *Bacillus* : *Bacillus subtilis*.

- une souche appartenant au genre des *Propionibacterium* : *Propionibacterium jensenii*.

Ces bactéries nous ont été fournies par ATCC.

Nous les classerons en fonction de leur métabolisme :

- les bactéries aérobies strictes ont besoin d'oxygène pour se développer.
- les bactéries aérotolérantes ou microaérophiles se développent indifféremment en présence ou non d'oxygène.
- les bactéries anaérobies strictes ne peuvent pas se développer en présence d'oxygène.

## **II-1. Les bactéries aérobies.**

### **II-1.1. Les bactéries du genre *Acetobacter*.**

Elles appartiennent à la classe des Schizomycètes, à l'ordre des Pseudomonadales, à la famille des *Pseudomonodaceae*. L'espèce étudiée est un *Acetobacter diazotrophicus*. Ce sont des bactéries gram-négatives, oxydases +, aérobies, qui ont un métabolisme de type oxydatif. Elles ont la propriété d'oxyder l'éthanol en acide acétique.

L'espèce étudiée a été isolée à partir de racines de canne à sucre. Lorsqu'elles se développent dans les vins, elles forment un voile blanchâtre à la surface.

Ce sont des bacilles de petite taille qui peuvent former des chaînettes. Ils se développent en présence d'air et a une température optimale de croissance de 30°C.

### **II-1.2. Les bactéries du genre *Micrococcus*.**

Elles appartiennent à la classe des Schizomycètes, à l'ordre des Eubactériales, à la famille des *Micrococcaceae*. L'espèce étudiée est un *Micrococcus luteus*. C'est une espèce gram-positive, aérobie. Ce caractère aérobie leur permet de se développer au cours des différents stades qui précèdent la fermentation (notamment pendant les phases de multiplication aérobie de la levure). On pense qu'elles sont à l'origine de la formation d'acide acrylique et d'alcool allylique. Elles sont globalement productrices d'acides organiques à partir des sucres.

Les bactéries du genre *Micrococcus* se rencontrent fréquemment sur les tiges de cannes à sucre et dans le moût avant la fermentation.

Ce sont des coques de très petite taille qui sont souvent en groupes de 4 à 8 coques. Sur milieu gélosé, en conditions aérobie, les *Micrococcus* forment un tapis jaunâtre.

Elles se développent très bien à 30°C sur gélose nutritive.

### **II-1.3. Les bactéries du genre *Bacillus*.**

Elles appartiennent à la classe des Schizomycètes, à l'ordre des Eubactériales et à la famille des *Bacillaceae*. L'espèce étudiée est un *Bacillus subtilis*. Au sein de la classification des *Bacillus* qui tient compte de la morphologie des spores, elle appartient au groupe I. Ce groupe est constitué des *Bacillus* dont les spores sont ovales, non déformantes et à paroi mince. C'est une bactérie aérobie de type gram-positive, catalase + et mobile.

Les *Bacillus* semblent capables de produire des acides gras, et notamment l'acide 2-ethyl-3-methyl-butyrique (Ganou-Parfait et al., 1986), à partir des sucres. Ils font partie de la flore banale présente à tous les stades précédant la fermentation. Leur activité est nettement freinée pendant la phase anaérobie. Elle peut cependant former un voile en fin de fermentation lorsque le vin est laissé au repos trop longtemps.

Ce sont des bacilles qui ne forment pas de chaînettes et qui sont facilement cultivables sur gélose nutritive ou sur bouillon nutritif, sous agitation et à 30°C. Ils sporulent facilement et résistent bien à l'éthanol.

## **II-2. Les bactéries microaérophiles.**

### **II-2.1. Les bactéries du genre *Lactobacillus*.**

Elles appartiennent à la classe des Schizomycètes, à l'ordre des Eubactériales et à la familles des *Lactobacteriaceae*. Nous avons étudié deux souches différentes : *Lactobacillus hilgardii* et *Lactibacillus pentosus*. Ce sont des bactéries gram-positives. Elles sont fortement acidifiantes et produisent de l'acide lactique D(-) et L(+) à partir des sucres. Ce sont des bactéries que l'on retrouve très fréquemment dans les milieux de fermentation. Elles peuvent provenir directement de la canne à sucre et résister aux différents traitement thermiques conduisant à la mélasse. Les *Lactobacillus* rencontrés sont généralement hétérofermentaires,

c'est à dire qu'ils produisent du CO<sub>2</sub>, de l'éthanol et de l'acide acétique sur glucose, et du mannitol sur fructose (figure 26). Nous avons choisi une souche possédant un métabolisme hétérofermentaire et une souche possédant un métabolisme hétérofermentaire facultatif.

#### **II-2.1.1. *Lactobacillus hilgardii*.**

Cette espèce appartient au groupe III des *Lactobacillus*, anciennement appelé *Betabacterium*. Elle est exclusivement hétérofermentaire, tolère l'éthanol et ne se développe qu'à un pH inférieur à 5,5. Elle se présente sous forme de bâtonnets isolés. Sa température optimale de croissance est de 26°C.

#### **II-2.1.2. *Lactobacillus pentosus*.**

Cette espèce appartient au groupe II des *Lactobacillus* anciennement appelé *Streptobacterium*. Elle a un métabolisme hétérofermentaire facultatif : le métabolisme des hexoses s'effectue par la voie d'Embden-Meyerhof conduisant à l'acide lactique, mais les pentoses peuvent être dégradés en empruntant la voie hétérofermentaire avec production d'acide lactique et d'acide acétique. Les cellules sont de longs bâtonnets assemblés en chaînettes. Leur température optimale de croissance est de 37°C.

#### **II-2.2. Les bactéries du genre *Propionibacterium*.**

Elles appartiennent à la classe des Schizomycètes, à l'ordre des Actinomycétales et à la famille des *Propionibacteriaceae*. L'espèce étudiée est un *Propionibacterium jensenii*.

Ce sont des bactéries gram-positives.

Les *Propionibacterium* se rencontrent essentiellement dans les fromages à pâte cuite. Cependant leur présence a souvent été signalée dans les fermentations rhumères. Elles ont généralement une origine tellurique.

Le *Propionibacterium jensenii* se présente, en anaérobiose, sous la forme de petits bâtonnets asporulés et immobiles. Leur température optimale de croissance est de 30°C. Bien que ces bactéries soient microaérophiles, il est préférable de les faire développer en anaérobiose.

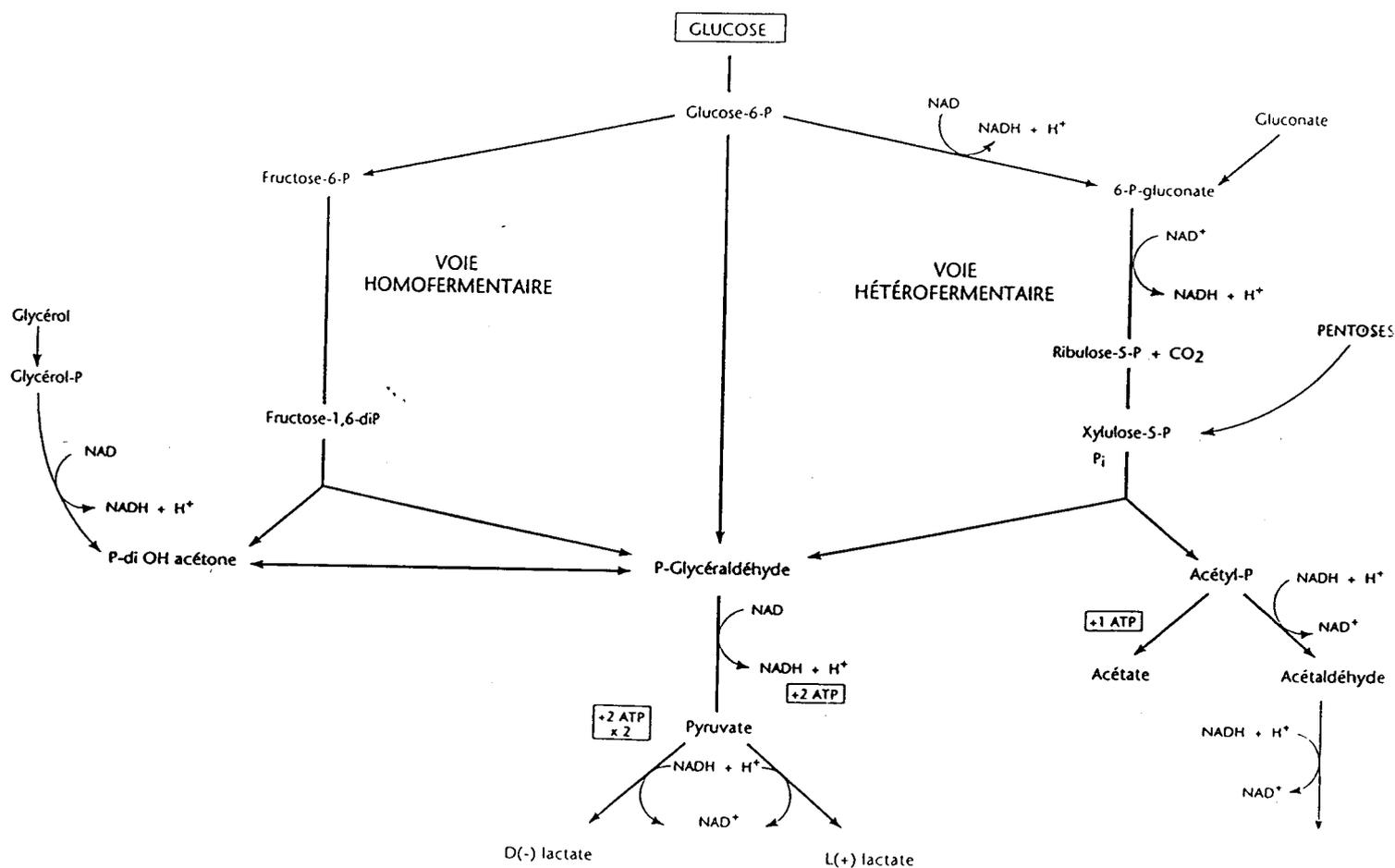


Figure 26 : Schéma des principales voies fermentaires des *Lactobacillus*.

### **II-3. Les bactéries anaérobies strictes : les bactéries du genre *Clostridium*.**

Elles appartiennent à la classe des Schizomycètes, à l'ordre des Eubactériales et à la famille des *Bacillaceae*. Nous avons choisi d'étudier trois souches appartenant à deux espèces différentes : deux *Clostridium beijerinckii* et un *Clostridium butyricum*. Parmi les deux *Clostridium beijerinckii*, l'un était auparavant rattaché à l'espèce des *Clostridium saccharobutyricum*.

Ces trois souches appartiennent au groupe I des *Clostridium* : les spores sont subterminales et la gélatine n'est pas hydrolysée. Ce sont des bacilles gram-positives. Elles sont très gazogènes avec un dégagement de H<sub>2</sub> ou de CO<sub>2</sub>.

Les *Clostridium* sont très fréquemment rencontrés en fermentation rhumière. Ils sont généralement d'origine tellurique. Du fait de leur aptitude à sporuler, ils sont très résistants et peuvent se développer sur les vinasses obtenues après distillation.

Les cellules de ces trois souches sont de grandes tailles, sporulées et mobiles. La souche de l'espèce *Clostridium butyricum* forme de longues chaînettes alors que les deux autres souches forment de petites chaînettes de deux ou trois cellules. Elles se développent à 37°C en anaérobiose.

## **III- Etude des fermentations.**

Nous avons fait développer les différentes souches dans les conditions de température préconisées et sur des milieux adaptés à leur croissance.

Nous avons réalisé un certain nombre de fermentations en essayant de ne faire varier qu'un seul paramètre : la nature des souches de micro-organismes introduites dans le milieu. Pour l'ensemble de l'étude, nous avons donc constitué les moûts à une densité toujours égale à 1100 (ce qui correspond à environ 140 g de saccharose / litre de moût). Nous n'avons ajouté aucun élément nutritif. Ce moût était alors stérilisé afin d'éliminer tout contaminant éventuel.

Les cultures, au moment de leur introduction dans le milieu de fermentation, étaient en plein développement et l'ensemencement se faisait de manière stérile. L'ensemencement était de 300 ml de culture pour 10 litres de milieu. La fermentation s'effectuait dans une pièce chauffée à 30°C. Les fermentations étaient suivies de manière continue avec des prises d'échantillons toutes les deux heures pour une fermentation avec un *Saccharomyces*. Dans le cas d'une fermentation en présence d'un *Schizosaccharomyces*, les prises d'échantillons étaient réalisées toutes les demi-journées. Nous avons suivi l'évolution du développement des micro-organismes ainsi que le degré alcoolique et l'acidité du milieu. Nous avons également noté les temps de fermentation, qui est un paramètre important pour l'industriel.

### **III-1. Evolution du degré alcoolique, du temps de fermentation et de l'acidité.**

Dans la présentation des résultats nous traiterons séparément les expériences de fermentations levuriennes pures et les expériences de fermentations mixtes, c'est à dire en présence à la fois de levures et de bactéries.

#### **III-1.1. Les fermentations par les levures du genre *Saccharomyces*.**

Nous avons reporté dans le tableau 13 les différents résultats obtenus avec les 6 souches testées. Ce tableau donne les valeurs moyennes de chacun des paramètres suivis. Nous avons réalisé un minimum de 5 expériences de fermentations par souche de levure étudiée.

L'on considère que la fermentation est terminée lorsque le degré alcoolique du vin et la densité n'évoluent plus. Nous considérerons qu'à l'issue des fermentations la totalité des sucres est consommée, même si une partie des sucres, de l'ordre de 1 à 2 g/l, n'est jamais utilisée.

Souche*	sd12	sd13	sd65	sm102	67j	71b	S.pombe
densité initiale	1102	1101	1099	1100	1101	1099	1101
densité finale	1047	1044	1042	1044	1043	1045	1048
temps de fermentation (en heures)	25	28	28	33	28	29	68
acidité initiale (en g H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /l)	1,45	1,42	1,46	1,42	1,45	1,42	1,45
acidité finale (en g H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /l)	3,71	3,27	3,45	3,28	3,75	3,25	4,70
pH initial	6,02	6,06	6,02	6,08	5,98	6,05	5,98
pH final	5,48	5,50	5,45	5,56	5,37	5,58	5,38
T.A.V. final (en °GL)	7,2	7,6	7,1	7,4	7,5	7,4	7,2

\* : Chaque souche a été testée au moins cinq fois en fermentation

**Tableau 13 : Valeurs moyennes des différents paramètres  
en début et en fin de fermentation**

### **- Le temps de fermentation.**

Le temps de fermentation nous donne des valeurs qui s'échelonnent entre 25 heures pour la souche la plus rapide (sd12) et 33 heures pour la souche la plus lente (sm102). Quatre des six souches ont un temps de fermentation presque identique. Une fermentation rapide est souhaitable lorsque l'on veut limiter les risques d'infection.

### **- Le Titre Alcoométrique Volumique (T.A.V.).**

Le T.A.V. varie de 7,1°GL pour la souche sd65 qui semble être la moins alcooligène à 7,6°GL pour la souche sd13. Certaines fermentations ont donné des vins titrant 8°GL. Nous avons indiqué seulement les valeurs moyennes pour chacune des souches.

### **- L'acidité.**

Les valeurs sont homogènes avec cependant une acidité un peu plus importante pour les vins provenant d'une fermentation avec les souches sd12 et 67j. Le métabolisme des acides gras des levures joue un rôle important dans la valeur finale de ce paramètre.

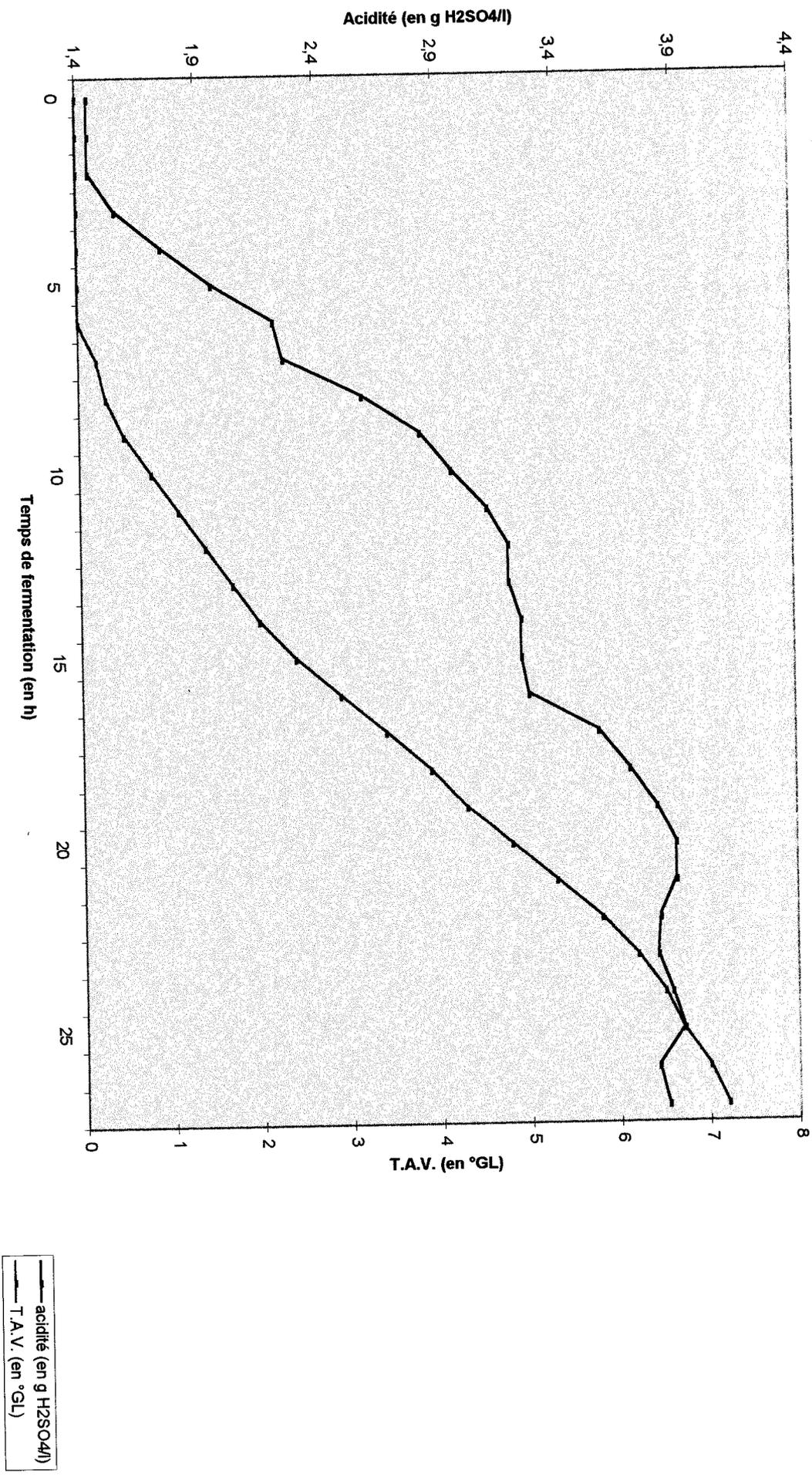
### **- Evolution des paramètres au cours de la fermentation.**

Nous avons suivi l'évolution en fonction du temps de l'acidité et du T.A.V., lors de fermentations (figure 24). Cette évolution est identique quelle que soit la souche étudiée. On remarque que l'acidité augmente 4 heures avant que l'éthanol ne soit produit. Cette augmentation de l'acidité est un signe de l'activité de la levure.

\*

Cette étude montre qu'il est impossible de distinguer de manière certaine les souches différentes de *Saccharomyces cerevisiae* entre elles, à partir de la simple analyse des paramètres de la fermentation.

Figure 27 : Evolution de l'acidité et du T.A.V. pendant la fermentation



### III. 1.2. Les fermentations par les levures *Schizosaccharomyces pombe*.

Le développement de ces levures avant la fermentation se fait dans les mêmes conditions que pour les *Saccharomyces*.

#### - Le temps de fermentation.

C'est le paramètre qui différencie le plus les deux genres de levures. Les *Schizosaccharomyces pombe* effectuent la fermentation en moyenne en 68 heures. La raison de cette « lenteur » est leur mode de multiplication végétatif : la scissiparité. Ce mode de multiplication est deux fois plus lent que le bourgeonnement, ce qui se traduit par une occupation du milieu moins importante. Ce phénomène est accentué par le fait que cette levure forme des amas de cellules.

#### - Le T.A.V.

Bien que l'on considère que les levures de l'espèce *Schizosaccharomyces pombe* sont plus alcooligènes que les *Saccharomyces cerevisiae*, nous avons observé des T.A.V. identiques. Le T.A.V. varie de 7°GL à 7,6°GL.

#### - L'acidité.

L'acidité en fin de fermentation est légèrement plus importante que pour une fermentation avec les *Saccharomyces cerevisiae*. La valeur finale est de l'ordre de 4,70 g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/l. Ces résultats ont été confirmés à chaque essai réalisé avec cette levure. Ces différences de résultats entre les deux genres de levure proviennent de leur métabolisme fermentaire différent.

L'évolution de l'acidité est la même que pour les autres levures. L'augmentation de l'acidité précède de la même façon la production d'éthanol. On observe seulement une synthèse plus tardive de l'éthanol et une augmentation plus lente du T.A.V.

### III-1.3. Les fermentations mixtes.

En ce qui concerne les fermentations mixtes, nous avons travaillé de trois manières différentes, selon les types de bactéries et de levures utilisées.

Dans le cas des fermentations avec des bactéries aérobies, nous avons préféré introduire les bactéries avant les levures.

Dans le cas des fermentations avec des bactéries microaérophiles ou anaérobies et la levure *Schizosaccharomyces pombe*, nous avons introduit simultanément les levures et les bactéries.

Dans le cas des fermentations avec des bactéries microaérophiles ou anaérobies et la levure *Saccharomyces cerevisiae*, nous avons introduit les bactéries 48 heures avant les levures. En effet, la vitesse de fermentation des *Saccharomyces cerevisiae* est telle que nous avons jugé préférable d'introduire préalablement les bactéries afin de leur permettre de bien occuper le milieu. La souche de levure utilisée est alors toujours la même : la souche sd13.

Les résultats sont indiqués dans le tableau 14.

#### III-1.3.1. L'utilisation de bactéries aérobies.

##### - La souche *Acetobacter diazotrophicus*.

Lors des essais effectués avec cette souche et quelle que soit la levure utilisée, nous n'avons pas observé de modifications des différents paramètres, pendant la phase fermentaire. En revanche, nous avons constaté une légère augmentation de l'acidité après avoir laissé reposer le vin (5,02g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/l).

Cette augmentation n'est cependant pas très significative et il est difficile de juger véritablement l'impact de cette bactérie dans les différents essais que nous avons réalisés. Les analyses de composition chimique confirmeront les difficultés que nous avons eues pour mesurer son impact.

Souche*	<i>Acetobacter</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Propionibact.</i>	<i>Cl. butyricum</i>	<i>Clostridium B</i>
temps de fermentation (en heures)	70	74	85	80	82	85	75
acidité initiale (en g H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /l)	1,42	1,45	1,46	1,52	1,48	1,55	1,48
acidité finale (en g H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /l)	5,02	12,34	4,85	11,36	8,21	11,38	5,50
pH initial	5,98	6,02	5,99	6,06	6,08	5,96	6,03
pH final	5,29	4,35	5,39	4,37	4,78	4,57	5,12
T.A.V. final (en °GL)	7,1	6,8	6,9	5,2	5,7	7,1	6,9

Tableau 14 : Valeur moyennes des différents paramètres en début et en fin de fermentation mixte avec un Schizosaccharomyces pombe

**- La souche *Bacillus subtilis*.**

La souche de *Bacillus subtilis* a été testée avec deux levures différentes. En présence de la souche sd13, elle affecte légèrement le rendement de la fermentation puisque les vins obtenus titrent en moyenne 6,8°GL. L'action du *Bacillus subtilis* se traduit surtout par une augmentation très sensible de l'acidité : elle atteint 10,81 g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/l. En revanche, le temps de fermentation n'est pas modifié.

Lorsque l'on associe le *Bacillus subtilis* et le *Schizosaccharomyces pombe* en fermentation, on observe également une baisse du rendement (6,8°GL), ainsi qu'une augmentation de l'acidité (12,34 gH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/l). En revanche, le temps de fermentation est majoré de 6 heures en moyenne.

**- La souche *Micrococcus luteus*.**

Cette souche n'a été testée qu'avec un *Schizosaccharomyces pombe*. La fermentation s'est déroulée en moyenne en 85 heures, soit près de 20 heures de plus qu'une fermentation levurienne pure de *Schizosaccharomyces*. Le T.A.V. final est de 6,9°GL. L'acidité du vin, de 4,85 g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/l, n'est que faiblement supérieure à celle d'un vin issu d'une fermentation avec un *Schizosaccharomyces pombe*.

\*

L'action des bactéries aérobies étudiées se traduit surtout par une augmentation du temps de fermentation et par une augmentation de l'acidité. Il est impossible d'évaluer d'après ces mesures le véritable impact des bactéries utilisées sur la composition des vins.

**III-1.3.2. L'utilisation de bactéries microaérophiles.**

**- Les souches de *Lactobacillus*.**

Les résultats obtenus avec les deux souches de *Lactobacillus* étant identiques, nous ne les traiterons pas séparément.

Leur action est beaucoup plus prononcée que celles des bactéries aérobies. On observe tout d'abord une baisse de rendement : les vins ne titrent plus que 5,2°GL en fin de fermentation. Le développement des *Lactobacillus* est accompagné d'une hausse très sensible de l'acidité tout au long de la fermentation. Le vin obtenu a en moyenne une acidité de 11,36 g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/l. Le temps de fermentation est de 80 heures avec un *Schizosaccharomyces pombe*.

#### - La souche de *Propionibacterium jensenii*.

L'introduction du *Propionibacterium jensenii* en fermentation a également pour conséquence une forte augmentation de l'acidité (8,21g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/l) et une baisse du T.A.V. (5,7°GL en moyenne). Le temps de fermentation est de 82 heures en moyenne.

#### III-1.3.3. L'utilisation de bactéries anaérobies : les souches de *Clostridium*.

Les bactéries du genre *Clostridium* ont été testées avec les deux types de levure : *Saccharomyces cerevisiae* sd13 et *Schizosaccharomyces pombe*.

Les trois souches de bactéries ont sensiblement le même comportement en fermentation. Le T.A.V. final est plus élevé qu'avec les bactéries microaérophiles. Il est compris entre 6,5°GL et 7,1°GL. Le temps de fermentation est assez grand : entre 75 heures et 85 heures.

L'acidité est un facteur qui différencie l'une des souches par rapport aux deux autres. En effet, il semblerait que la souche *Clostridium beijerinckii* B produise moins d'acides (5,50 g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/l) que les souches *Clostridium butyricum* et *Clostridium beijerinckii* A (respectivement 11.38 g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/l et 12.35 g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/l).

\*

Il ressort que la présence des bactéries ralentit systématiquement les fermentations. La production d'éthanol est généralement plus faible et l'acidité est un bon indicateur de l'infection bactérienne. Cependant tous ces paramètres ne témoignent pas de l'impact que peuvent avoir ces bactéries sur la composition des vins et par la suite celle des distillats.

A l'issue de ces analyses il semble difficile, compte tenu des variations des différents paramètres observées d'une fermentation à l'autre, de pouvoir caractériser chaque souche de bactérie par rapport aux autres. Une étude de la composition des différents vins est donc nécessaire afin d'évaluer plus précisément l'impact de chaque bactérie en fermentation.

### **III-2. Etude de la composition chimique des distillats.**

Nous avons donc étudié la composition du vin après l'action de chacune de ces bactéries. Cette étude a été menée en deux parties.

Dans un premier temps, nous avons distillé les vins et recueilli des échantillons à environ 35°GL. Ces échantillons ont ensuite été analysés au Chromatographe en Phase Gazeuse (CPG). Une étude quantitative des alcools supérieurs et de l'acétate d'éthyle a été effectuée. Cette étude présente, outre le fait que ce soit une analyse quantitative, l'avantage de porter sur des composés synthétisés exclusivement au cours de la fermentation. La méthode utilisée est fiable et rapide. En revanche, son inconvénient majeur est qu'elle ne témoigne pas de tous les phénomènes biochimiques mis en jeu lors des fermentations. En effet, cette étude ne porte que sur un nombre restreint de composés.

Dans un second temps, nous avons procédé à une extraction liquide-liquide avec du pentane. Les extraits ont été ensuite injectés sur une CPG couplée à un Spectromètre de Masse (SM). Nous avons alors identifié les composés présents et déterminé leur importance relative. A l'inverse de la précédente, cette méthode est plus difficile à mettre en place. De plus, tout dosage précis est difficilement réalisable. En effet le dosage est rendu difficile par la présence dans les extraits d'un nombre très élevé de composés et par le caractère sélectif du solvant d'extraction employé. En revanche, cette méthode permet de mieux se rendre compte de tous les phénomènes biochimiques impliqués dans la fermentation.

#### **III-2.1. Composition en méthanol, en alcools supérieurs et en acétate d'éthyle.**

Les alcools supérieurs et l'acétate d'éthyle sont les composés majoritaires du non-alcool. Les alcools supérieurs sont issus du métabolisme des sucres et des acides aminés par les

micro-organismes. L'acétate d'éthyle est l'ester principal dans les distillats et contribue, par sa présence, à la qualité organoleptique du produit considéré. Le méthanol, qui n'est pas considéré comme un constituant du non-alcool, provient de la matière première, notamment des pectines. Compte tenu de son origine, la teneur des distillats en méthanol ne varie pas sensiblement quelle que soit les micro-organismes utilisés en fermentation.

Les alcools supérieurs étudiés dans ce chapitre sont : le propan-1-ol, le butan-1-ol, le butan-2-ol, le 2-méthyl-1-propanol, le 2-méthyl-1-butanol et le 3-méthyl-1-butanol. Ces deux derniers ne sont pas séparés au CPG ; nous les regrouperons sous le terme alcools amyliques.

Tous ces alcools supérieurs ont été systématiquement dosés.

### III-2.1.1. Etude des fermentations levuriennes (Tableau 15).

Les différences entre les levures de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* et la levure de l'espèce *Schizosaccharomyces pombe* sont telles que nous traiterons cette dernière à part.

#### - Les souches de *Saccharomyces cerevisiae*.

On remarque que l'acétate d'éthyle est produit en faible quantité par toutes les souches de *Saccharomyces cerevisiae* avec cependant quelques différences. Les trois souches sd12, sd13 et sd65 synthétisent moins d'acétate d'éthyle (respectivement 28 g/HLAP, 28 g/HLAP et 25 g/HLAP) que les souches sm102, 71b et 67j (respectivement 51 g/HLAP, 46 g/HLAP et 50 g/HLAP).

Le taux de méthanol dans les distillats ne varie pas de manière significative en fonction des souches utilisées. Nous pouvons noter que ce taux est très faible. Le rhum est en effet une des eaux-de-vie qui contient le moins de méthanol.

Lorsque l'on regarde la composition des distillats en alcools supérieurs, on remarque tout d'abord l'absence de butan-1-ol et de butan-2-ol. Il est admis que la présence de butan-2-ol est le signe d'une activité bactérienne.

	Acétate d'éthyle	Méthanol	Butan-2-ol	Propan-1-ol	Isobutanol	Amyliques
<i>S. cerevisiae</i> sd12	28	7,74	0	82	24	157
<i>S. cerevisiae</i> sd13	28	7,07	0	95	59	168
<i>S. cerevisiae</i> sd65	25	7,76	0	74	52	163
<i>S. cerevisiae</i> 71b	46	6,82	0	104	50	168
<i>S. cerevisiae</i> 67j	50	4,6	0	108	38	169
<i>S. cerevisiae</i> sm102	51	5,79	0	130	57	143
mélange sd12, sd13 et sd65	28	7,25	0	92	52	185
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	220	6,68	0	46	2	7

Tableau 15 : Quantité d'alcools supérieurs et d'acétate d'éthyle  
après une fermentation levurienne (en g/HLAP)

Les quantités des autres alcools supérieurs varient sensiblement en fonction des souches utilisées. La souche sd65 est celle qui produit le moins de propan-1-ol (74 g/HLAP). La souche sm102 produit 130 g/HLAP de propan-1-ol, c'est à dire environ le double.

Les variations d'une souche à l'autre sont également marquées en ce qui concerne l'isobutanol. La souche sd12 n'en produit que 24 g/HLAP en moyenne, contre 59 g/HLAP pour la souche sd13.

La production d'amyliques est comprise entre 143 g/HLAP pour la souche sm102 et 169 g/HLAP pour la souche 67j.

La quantité des différents alcools supérieurs formés par les différentes souches peut varier d'une campagne à l'autre selon la composition de la mélasse. En revanche, l'on peut remarquer que les différents rapports entre les alcools supérieurs varient peu pour la même souche (Tableau 16). Les écarts type sont de l'ordre de 1%. Nous avons réalisé une Analyse des Composantes Principales (ACP) sur ces différents rapports en fonction de la nature des souches de levure *Saccharomyces cerevisiae* (figure 28). On remarque que les valeurs correspondant à la même souche sont bien groupées. Les rapports entre les différents alcools supérieurs formés pendant la fermentation semblent donc être de bons critères de différenciation des levures entre elles.

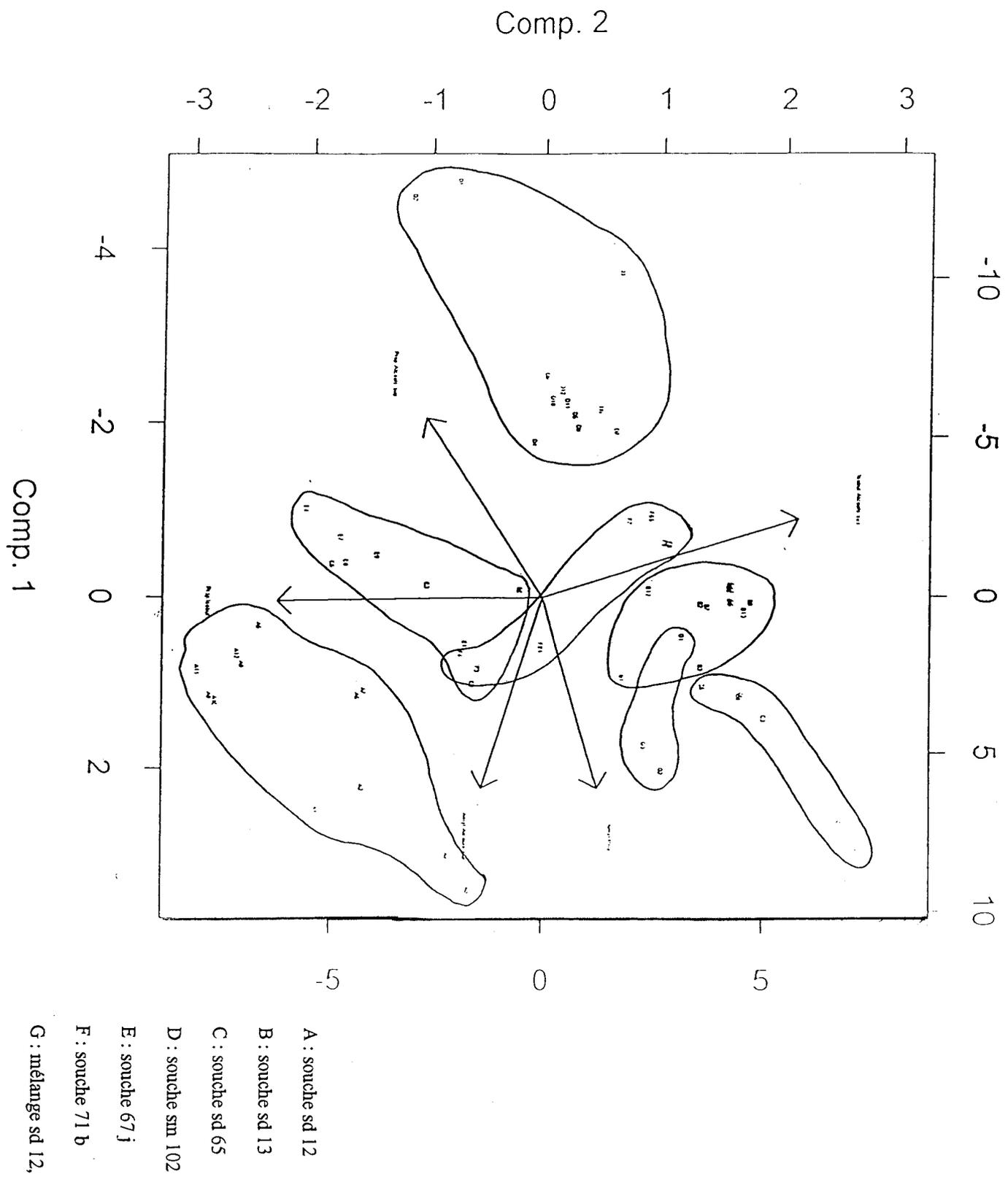
#### **- La souche *Schizosaccharomyces pombe*.**

Cette souche se différencie très nettement des autres souches de levures étudiées (Tableau 15). En effet, elle entraîne une forte production d'acétate d'éthyle (220 g/HLAP en moyenne), pouvant atteindre un maximum de 411 g/HLAP. Nous avons remarqué que cette production d'acétate d'éthyle avait lieu essentiellement à la fin de la fermentation. En effet, pendant la fermentation le taux d'acétate d'éthyle demeure de 46 g/HLAP en moyenne. Puis, lorsque la fermentation est terminée, on observe une nette augmentation du taux d'acétate d'éthyle : en 12 heures, ce taux passe de 46 g/HLAP à 220 g/HLAP. Nous pouvons supposer qu'une ou plusieurs enzymes du *Schizosaccharomyces pombe* sont réprimées par le glucose pendant la fermentation. Une fois le milieu épuisé en sucres, ces enzymes seraient produites, ce qui se traduirait par une augmentation du taux d'acétate d'éthyle.

	Propanol/Isobutanol	Amyliques/Propanol	Propanol/Total Alc. sup	Isobutanol/Total alc. sup	Amyliques/Total Alc. sup.
S. cerevisiae sd12	3,52	1,92	0,32	0,09	0,59
S. cerevisiae sd13	1,62	1,76	0,31	0,18	0,52
S. cerevisiae sd65	1,41	2,23	0,26	0,18	0,56
S. cerevisiae 71b	2,11	1,62	0,32	0,18	0,52
S. cerevisiae 67j	2,96	1,55	0,35	0,12	0,53
S. cerevisiae sm102	2,30	1,11	0,39	0,17	0,43
mélange sd12, sd13 et sd65	1,75	2,04	0,31	0,15	0,56

**Tableau 16 : rapports entre les différents alcools supérieurs  
(moyennes effectuées sur un minimum de 10 échantillons)**

Figure 28 : Influence des souches de levures sur les différents rapports entre les alcools supérieurs.



Le taux d'alcools supérieurs est également différent de celui trouvé avec les *Saccharomyces cerevisiae*. Nous avons obtenu en moyenne 46 g/HLAP de propan-1-ol, c'est à dire moitié moins qu'avec les autres levures testées. La quantité moyenne d'isobutanol dans les distillats est de 2,2 g/HLAP et le taux d'amyliques est de 6,7 g/HLAP. Ces quantités très faibles d'alcools supérieurs formés sont en accord avec les résultats obtenus par Fahrasmane (1983).

La levure *Schizosaccharomyces pombe* se distingue donc très facilement des levures *Saccharomyces cerevisiae* par le profil chromatographique des alcools supérieurs et de l'acétate d'éthyle.

### **III-2.1.2. Etude des fermentations mixtes.**

Dans la mesure où les différences entre les *Saccharomyces cerevisiae* et le *Schizosaccharomyces pombe* sont importantes nous traiterons les fermentations mixtes en deux parties.

#### **III-2.1.2.1. Fermentation mixte avec la souche *Saccharomyces cerevisiae* sd13 (Tableau 17).**

Plusieurs bactéries ont été testées en présence de la souche sd13.

##### **- Analyse de la fermentation en présence du *Bacillus subtilis*.**

La principale conséquence de l'introduction du *Bacillus subtilis* est une hausse très sensible de la teneur en acétate d'éthyle dans les vins. La moyenne évolue de 28 g/HLAP à 125 g/HLAP. Ceci traduit une forte activité estérasique de la bactérie.

En même temps, la teneur en alcools supérieurs a diminué. La différence la plus importante concerne les amyliques dont la moyenne est passée de 168 g/HLAP à 96 g/HLAP. Une quantité moindre, par rapport à une fermentation levurienne pure, de propan-1-ol (74 g/HLAP) et d'isobutanol (40 g/HLAP) produits entraîne une modification de tous les rapports quantitatifs entre les différents alcools supérieurs (Tableau 18).

	Acétate d'éthyle	Méthanol	Butan-2-ol	Propan-1-ol	Isobutanol	Butan-1-ol	Amyliques
<i>Clostridium beijerinckii</i> A	45	9	0	57	31	24	74
<i>Clostridium beijerinckii</i> B	34	7	0	45	45	26	108
<i>Clostridium butyricum</i>	25	6	0	41	31	0	97
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	92	5	0	79	50	0	142
<i>Bacillus subtilis</i>	125	10	0	74	40	0	96
<i>S. cerevisiae</i> sd13 seul	28	7	0	95	59	0	168

Tableau 17 : Quantité d'alcools supérieurs et d'acétate d'éthyle après une fermentation mixte en présence de *Saccharomyces cerevisiae* sd 13 (en g/HLAP)

	Propanol/Isobutanol	Amyliques/Propanol	Propanol/Total Alc. sup	Isobutanol/Total alc. sup	Amyliques/Total Alc. sup.
<i>Clostridium beijerinckii</i> A	1,83	1,29	0,31	0,17	0,40
<i>Clostridium beijerinckii</i> B	1,00	2,40	0,20	0,20	0,48
<i>Clostridium butyricum</i>	1,32	2,37	0,23	0,18	0,57
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	1,58	1,80	0,29	0,18	0,52
<i>Bacillus subtilis</i>	1,85	1,30	0,35	0,19	0,46
<i>S. cerevisiae</i> sd13	1,62	1,76	0,31	0,18	0,52

**Tableau 18 : rapports entre les différents alcools supérieurs  
(moyennes effectuées sur un minimum de 10 échantillons)**

#### **- Analyse de la fermentation en présence d'un *Lactobacillus*.**

L'impact du *Lactobacillus hilgardii* sur la production d'acétate d'éthyle et d'alcools supérieurs au cours de la fermentation est le même.

La quantité d'acétate d'éthyle synthétisé est importante et atteint une valeur moyenne de 92 g/HLAP. L'impact du *Lactobacillus hilgardii* sur la formation des alcools supérieurs est moins prononcé que celui du *Bacillus subtilis*, puisque la quantité de propan-1-ol synthétisé est de 79 g/HLAP et celle d'isobutanol est de 50 g/HLAP. La quantité d'amyliques synthétisés demeure élevée (142 g/HLAP).

Le métabolisme du *Lactobacillus hilgardii* semble donc moins affecter la production d'alcools supérieurs par la levure, que celui du *Bacillus subtilis*. Les différents rapports quantitatifs entre les alcools supérieurs présentent de ce fait des modifications moins importantes (Tableau 18).

#### **- Analyse de la fermentation en présence d'un *Clostridium*.**

Parmi les différentes souches de *Clostridium* testées en fermentation en présence de la souche levurienne sd13, la souche *Clostridium butyricum* se différencie des deux autres.

Examinons tout d'abord les résultats concernant les deux souches de *Clostridium beijerinckii*. Nous avons constaté que 24g/HLAP de butan-1-ol étaient présents dans les distillats provenant de la fermentation mixte avec la souche *Clostridium beijerinckii* A. De même, après une fermentation avec la souche *Clostridium beijerinckii* B, la quantité de butan-1-ol présent dans les distillats est de 26g/HLAP. En parallèle, la production de propan-1-ol par la levure n'est plus que de 57g/HLAP. Nous avons observé que les teneurs en isobutanol (respectivement 31 g/HLAP et 45 g/HLAP après une fermentation mixte en présence des souches A et B) et en amyliques (respectivement 74 g/HLAP et 108 g/HLAP après une fermentation mixte en présence des souches A et B) sont également plus faibles que celles trouvées après une fermentation strictement levurienne par la souche *Saccharomyces cerevisiae* sd13.

La présence du butan-1-ol est une preuve que les deux souches de *Clostridium beijerinckii* A et B ont la faculté d'effectuer la fermentation butanolique (figure 29). Cette fermentation est une particularité de certaines bactéries.

La synthèse en faible quantité de propan-1-ol pendant la fermentation mixte peut être le résultat d'un besoin pour la bactérie d'isoleucine et de thréonine. En effet, ces deux acides aminés et le propan-1-ol ont un précurseur commun : l'acide alpha-cétobutyrique. L'utilisation par les bactéries, au cours de leur développement, de l'un ou même de ces deux acides aminés peut déplacer l'équilibre qui existe entre la formation de propan-1-ol d'une part et de thréonine et d'isoleucine d'autre part. Les levures privilégieraient alors la formation de ces deux acides aminés au détriment de la formation de propan-1-ol.

On peut expliquer la présence en faible quantité d'isobutanol et d'amyliques dans les distillats provenant d'une fermentation mixte avec les bactéries *Clostridium beijerinckii*, en employant le même raisonnement. L'acide alpha-céto isovalérique est un intermédiaire commun dans la formation de l'isobutanol et du 3-méthyl-1-butanol. Cet acide alpha-cétonique intervient également dans la voie métabolique conduisant à la formation de la valine. Une utilisation ou un besoin de la part des bactéries de valine peut déplacer l'équilibre existant entre la formation de l'isobutanol et du 3-méthyl-1-butanol d'une part et la formation de la valine d'autre part. La levure privilégierait la formation de la valine au détriment des deux alcools supérieurs.

La quantité d'acétate d'éthyle synthétisé, pendant une fermentation mixte avec les souches bactériennes *Clostridium beijerinckii* A et B (respectivement 45 g/HLAP et 34 g/HLAP), est légèrement supérieure à la quantité d'acétate d'éthyle présente après une fermentation levurienne avec la souche sd13 (28g/HLAP). Les souches de bactéries *Clostridium beijerinckii* A et B ne sont donc pas à l'origine d'une grande quantité d'acétate d'éthyle.

La souche bactérienne qui appartient à l'espèce *Clostridium butyricum* ne synthétise pas de 1-butanol. Sa présence se traduit plutôt par une quantité moindre d'alcools supérieurs formés au cours de la fermentation. Tous les alcools supérieurs sont concernés puisque l'on obtient seulement 41g/HLAP de propan-1-ol, 31g/HLAP d'isobutanol et 97 g/HLAP d'amyliques. Etant donné que la majeure partie des alcools supérieurs provient de la transformation des sucres sous l'action de la levure, nous pouvons supposer que les bactéries



rajoutées ont utilisé ces sucres différemment. De plus, l'utilisation par les bactéries des acides aminés tels que la thréonine, l'isoleucine et la valine peut engendrer un déplacement de l'équilibre entre la formation des alcools supérieurs et celle de certains acides aminés. La levure privilégierait alors la formation des acides aminés au détriment de celle des alcools supérieurs.

La quantité d'acétate d'éthyle formé en présence de la souche *Clostridium butyricum* (25 g/HLAP) est sensiblement la même qu'après une fermentation strictement levurienne avec la souche *Saccharomyces cerevisiae* sd13 (28g/HLAP).

\*

Les bactéries entrent en compétition avec les levures pour l'assimilation des nutriments présents dans le milieu. Les sucres et les acides aminés, qui sont à l'origine d'une grande partie des alcools supérieurs, suivent alors des voies métaboliques propres aux bactéries.

La consommation par les bactéries d'une grande partie des acides aminés présents dans le milieu, conduit les levures à synthétiser une plus grande quantité d'acides aminés nécessaires à leur métabolisme. Cette synthèse se fait au détriment de celle des alcools supérieurs. La présence de ces bactéries se traduit donc essentiellement par une quantité moindre d'alcools supérieurs synthétisés par les levures *Saccharomyces cerevisiae* pendant la fermentation. Ce phénomène est surtout marqué avec les levures du genre *Clostridium*.

La synthèse de butan-1-ol par les deux souches de *Clostridium beijerickii* provient de leur capacité à réaliser la fermentation butanolique.

Nous avons constaté également que l'introduction de bactéries dans le milieu de fermentation se traduit parfois par des quantités différentes d'acétate d'éthyle produit lors de la fermentation. Les *Lactobacillus* et les *Bacillus* semblent être à l'origine de la formation d'une grande quantité d'acétate d'éthyle. En revanche les *Clostridium* ne modifient pas la teneur en acétate d'éthyle des vins par rapport des fermentations strictement levuriennes par des *Saccharomyces cerevisiae*.

### III-2.1.2.2. Fermentation mixte avec la souche *Schizosaccharomyces pombe*

(Tableau 19).

L'impact des différentes bactéries est plus difficile à mettre en évidence lorsque la levure utilisée est le *Schizosaccharomyces pombe*. En effet, cette levure ne produit que de faibles quantités d'alcools supérieurs.

Cependant, l'action des bactéries telles que les *Clostridium beijerinckii* peut être mise en évidence par la présence du butan-1-ol dans les distillats. La souche A produit 35 g/HLAP de butan-1-ol et la souche B produit 28 g/HLAP de butan-1-ol. Les autres alcools supérieurs sont synthétisés dans les mêmes quantités que pour une fermentation levurienne pure.

Nous avons observé dans les distillats provenant d'une fermentation mixte avec la souche *Clostridium butyricum*, une moindre quantité de propan-1-ol (27g/HLAP) par rapport à un distillat issu d'une fermentation strictement levurienne (46g/HLAP).

On peut noter que le volume d'ensemencement bactérien joue un rôle dans la quantité d'alcools supérieurs formés. Nous avons fait un essai avec les deux bactéries productrices de butan-1-ol. Elles ont été introduites dans un milieu de culture identique, dans des quantités correspondant au double des ensemencements réalisés dans les expériences précédentes. En fin de fermentation, nous avons observé que la quantité de butan-1-ol avait triplé (110 g/HLAP) sans que la quantité de propan-1-ol formé par la levure (48 g/HLAP) diminue. La production de propan-1-ol par la levure est donc indépendante de la production du butan-1-ol par les bactéries.

La quantité d'acétate d'éthyle ne varie pas lorsque c'est un *Clostridium* (220 g/HLAP) ou un *Bacillus* (202 g/HLAP) que l'on introduit en fermentation avec le *Schizosaccharomyces pombe*. En revanche, on observe une quantité moindre d'acétate d'éthyle avec un *Acetobacter* (143 g/HLAP) et un *Micrococcus* (114 g/HLAP).

A l'inverse nous avons noté une teneur plus importante d'acétate d'éthyle dans les distillats après une fermentation mixte en présence du *Propionicum* (241 g/HLAP) et surtout des *Lactobacillus* (364 g/HLAP). Les *Lactobacillus* ont donc une action qui s'ajoute à celle du *Schizosaccharomyces pombe* en ce qui concerne la synthèse d'acétate d'éthyle.

	Acétate d'éthyle	Méthanol	Butan-2-ol	Propan-1-ol	Isobutanol	Butan-1-ol	Amyliques
<i>Clostridium beijerinckii</i> A	220	7	0	48	1	35	3
<i>Clostridium beijerinckii</i> B	235	7	0	43	2	28	11
<i>Clostridium butyricum</i>	214	10	0	27	0	0	3
<i>Acetobacter diazotrophicus</i>	143	8	0	53	1	0	9
<i>Micrococcus luteus</i>	114	11	0	42	3	0	12
<i>Lactobacillus pentosus</i>	364	10	0	42	2	0	3
<i>Bacillus subtilis</i>	202	7	0	48	3	0	14
<i>Propionicum jensenii</i>	241	9	0	35	1	0	7
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	220	7	0	46	2	0	7

Tableau 19 : Quantité d'alcools supérieurs et d'acétate d'éthyle après une fermentation mixte en présence de *Schizosaccharomyces pombe* (en g/HLAP)

\*

L'étude de l'influence des bactéries sur la formation des alcools supérieurs est rendue difficile du fait de la faible production de ces composés par le *Schizosaccharomyces pombe*. C'est seulement lorsqu'une bactérie produit un composé particulier tel que le butan-1-ol que l'on peut mettre en évidence son activité. L'acétate d'éthyle est à l'inverse formé en grande quantité par la levure *Schizosaccharomyces pombe* ce qui rend difficile la mise en évidence de l'impact bactérien sur la production de ce composé pendant la fermentation.

### **III-2.1.3. Conclusion sur la composition en alcools supérieurs et en acétate d'éthyle.**

Nous avons vu tout au long de cette étude qu'il est possible de distinguer les levures étudiées par l'analyse de la composition en alcools supérieurs et en acétate d'éthyle. Ces différences mettent en évidence l'importance du matériel enzymatique des micro-organismes responsables de la formation de nombreux produits secondaires lors de la fermentation.

La souche *Schizosaccharomyces pombe* se différencie très nettement des souches *Saccharomyces cerevisiae*, car elle synthétise moins d'alcools supérieurs mais des quantités plus importantes d'acétate d'éthyle.

L'introduction de bactéries dans le milieu de fermentation entraîne une compétition entre les différents micro-organismes, pour l'occupation du milieu. Les nutriments suivent chez les levures et les bactéries des voies métaboliques différentes. Par exemple, cela se traduit en fin de fermentation par des teneurs en alcools supérieurs et en acétate d'éthyle différentes de celles obtenues avec des levures. Cela se traduit également par la présence de composés nouveaux, normalement absents après une fermentation levurienne.

L'étude des fermentations a porté jusqu'à présent sur les variations des différents paramètres tels que l'acidité ou le temps de fermentation et sur la composition du distillat en composés majoritaires. Ceci ne reflète qu'une partie du travail des micro-organismes. Parmi les composés formés lors de la fermentation, la plus grande partie n'apparaît pas lors de l'analyse chromatographique en phase gazeuse de la composition des distillats en alcools supérieurs et en

acétate d'éthyle par. Il est donc nécessaire de procéder à une extraction avec un solvant. On pourra ainsi mieux évaluer les différences de composition à l'issue des différentes fermentations. Ce travail passe par une identification des principaux composés présents. On déterminera alors les proportions relatives de ces composés pour en étudier les variations en fonction des micro-organismes introduits dans le milieu de fermentation.

### **III-2.2. Composition des distillats obtenus après fermentations.**

Dans un premier temps, nous avons étudié les fermentations levuriennes pures. Une première liste de composés présents dans les distillats a alors été établie. Nous avons ensuite réalisé une étude de la composition des distillats issus des fermentations mixtes. La dernière partie concerne les variations des proportions relatives d'un certain nombre de composés entre les différents distillats.

#### **III-2.2.1. Etude de la composition des distillats obtenus après des fermentations par les levures.**

Les différentes extractions effectuées à partir des distillats issus des fermentations levuriennes nous ont permis de mettre en évidence la présence de plus de 250 composés différents.

##### **III-2.2.1.1. Composition des distillats obtenus après fermentation par les souches de *Saccharomyces cerevisiae*.**

Nous avons testé les 6 souches. Nous n'avons pas remarqué de différences qualitatives entre les distillats, en ce qui concerne leur composition.

Nous aborderons la composition de ces distillats en classant les composés chimiques identifiés d'après leur appartenance aux différentes classes.

### - Les alcools aliphatiques (Tableau 20).

Ils sont présents en grande quantité dans les rhums. Nous en avons recensé 34. On retrouve l'ensemble des alcools linéaires primaires, de C<sub>1</sub> à C<sub>12</sub>, ainsi que de nombreux alcools secondaires. Parmi ces 34 composés, 3 n'ont jamais été mentionnés dans les précédentes études concernant la composition des rhums. Il s'agit du **undécan-1-ol**, du **dodécan-1-ol** et du **tétradécan-1-ol** (figure 30, 31 et 32). Cependant, la présence de ces trois composés a déjà été mise en évidence dans le cognac, le whisky et les eaux-de-vie de fruits (Nykänen et al., 1983).

Les aldéhydes, par l'intermédiaire d'une réduction, sont à l'origine des alcools primaires aliphatiques possédant six carbones ou plus.

L'**hexan-1-ol** peut cependant avoir d'autres origines. Il peut provenir de la dégradation de l'acide 9,12,15-octadécatriénoïque ou acide linoléique selon un mécanisme proposé par Drawert et al.<sup>1</sup> qui conduirait à l'hexén-2-al puis à l'hexan-1-ol. Crouzet (1991) quant à lui, propose un mécanisme différent. L'hexan-1-ol proviendrait de la dégradation de l'acide octadécadiène-9,12-oïque ou acide linoléique par l'intermédiaire de l'hexanal. L'acide linoléique conduirait pour sa part au *cis*-hexen-3-ol et au *trans*-hexen-2-ol par l'intermédiaire des aldéhydes correspondants.

### - Les terpénols (Tableau 21).

Nous avons relevé la présence de 10 terpénols. Parmi ces 10 composés, deux composés n'ont jamais été mis en évidence dans les rhums. Il s'agit du **nérol** (figure 32), qui est l'isomère

*cis* du géraniol, et du **3,7,11-triméthyl-6,10-dodécadiène-1-ol** (figure 33), qui ne diffère du farnésol que par l'absence d'une liaison alcène en C<sub>2</sub>. Leurs pics correspondants représentent respectivement 0,07% et 0,21% de la surface totale des pics des chromatogrammes.

---

<sup>1</sup> cité par Nykänen et al. (1983).

	indices de rétention		indices de rétention		
méthanol	820	-	heptan-2-ol	1324	892
éthanol	895	500	octan-2-ol	1424	994
propan-1-ol	1025	545	1-octèn-3-ol	1454	975
2-buten-3-ol	1045	831	heptan-1-ol	1460	963
2-méthyl-1-propanol	1060	625	2-éthyl-hexanol	1494	-
3-méthyl-2-pentanol	1062	761	nonan-2-ol	1525	1095
3-méthyl-2-butanol	1065	682	octan-1-ol	1563	1064
2-penten-3-ol	1105	882	trans-2-octénol	1619	-
pentan-2-ol	1121	695	nonan-1-ol	1665	1168
butan-1-ol	1146	662	undécane-2-ol	1725	1299
hexan-2-ol	1201	794	décane-1-ol	1767	1267
2-méthyl-1-butanol	1212	719	cis-5-undécèn-2-ol	1785	-
3-méthyl-1-butanol	1212	721	undécane-1-ol	1871	1372
pentan-1-ol	1224	775	tridécane-2-ol	1935	1505
4-méthyl-1-pentanol	1295	845	dodécane-1-ol	1973	1475
hexan-1-ol	1357	863	tétradécane-1-ol	2176	1682
cis-3-hexèn-1-ol	1365	864	hexadécane-1-ol	2386	1890
cis-2-hexèn-1-ol	1370	867			

Tableau 20 : Alcools identifiés après une fermentation levurienne

Figure 30 : Spectre de masse du undécane-1-ol.

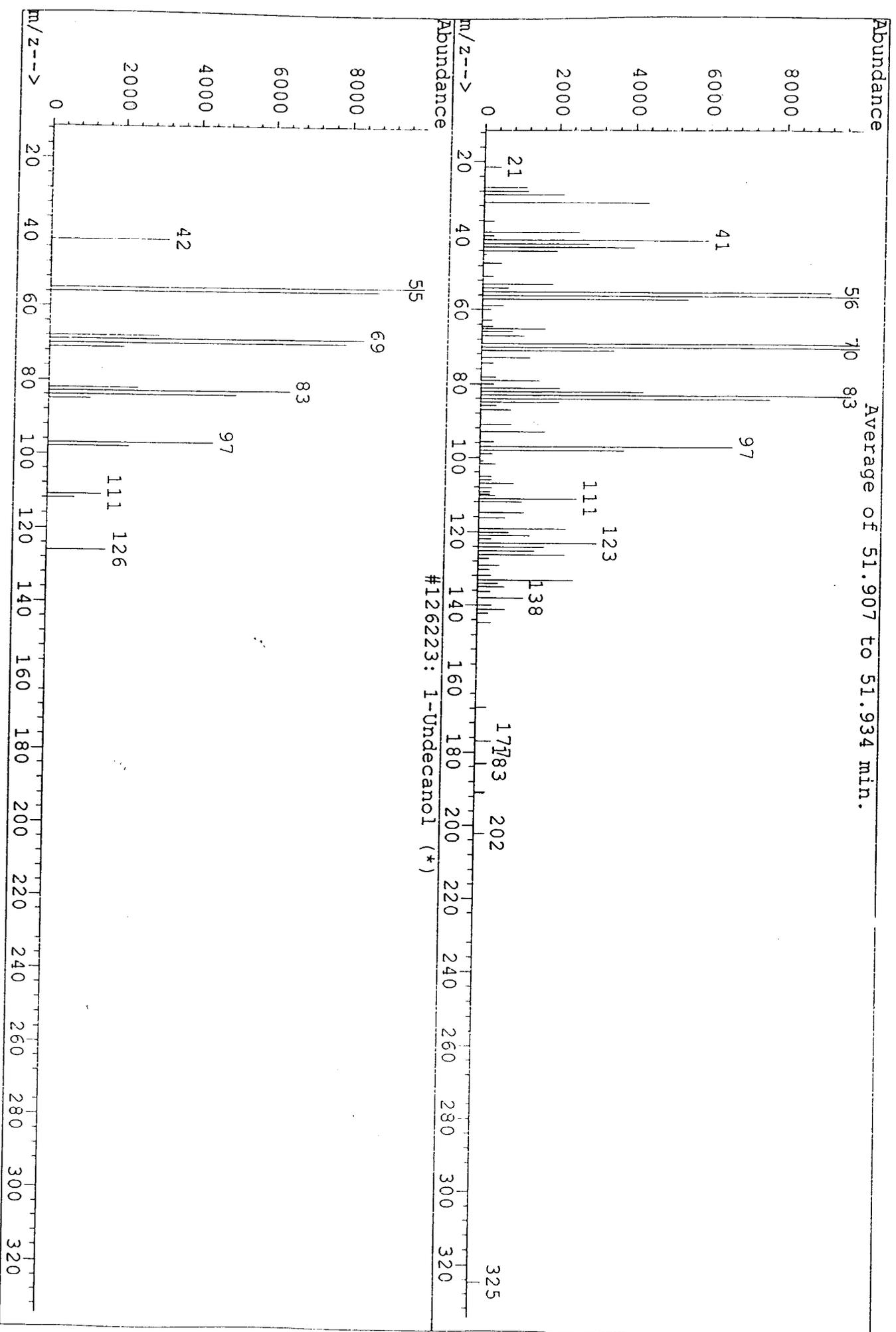


Figure 31 : Spectre de masse du dodécane-1-ol.

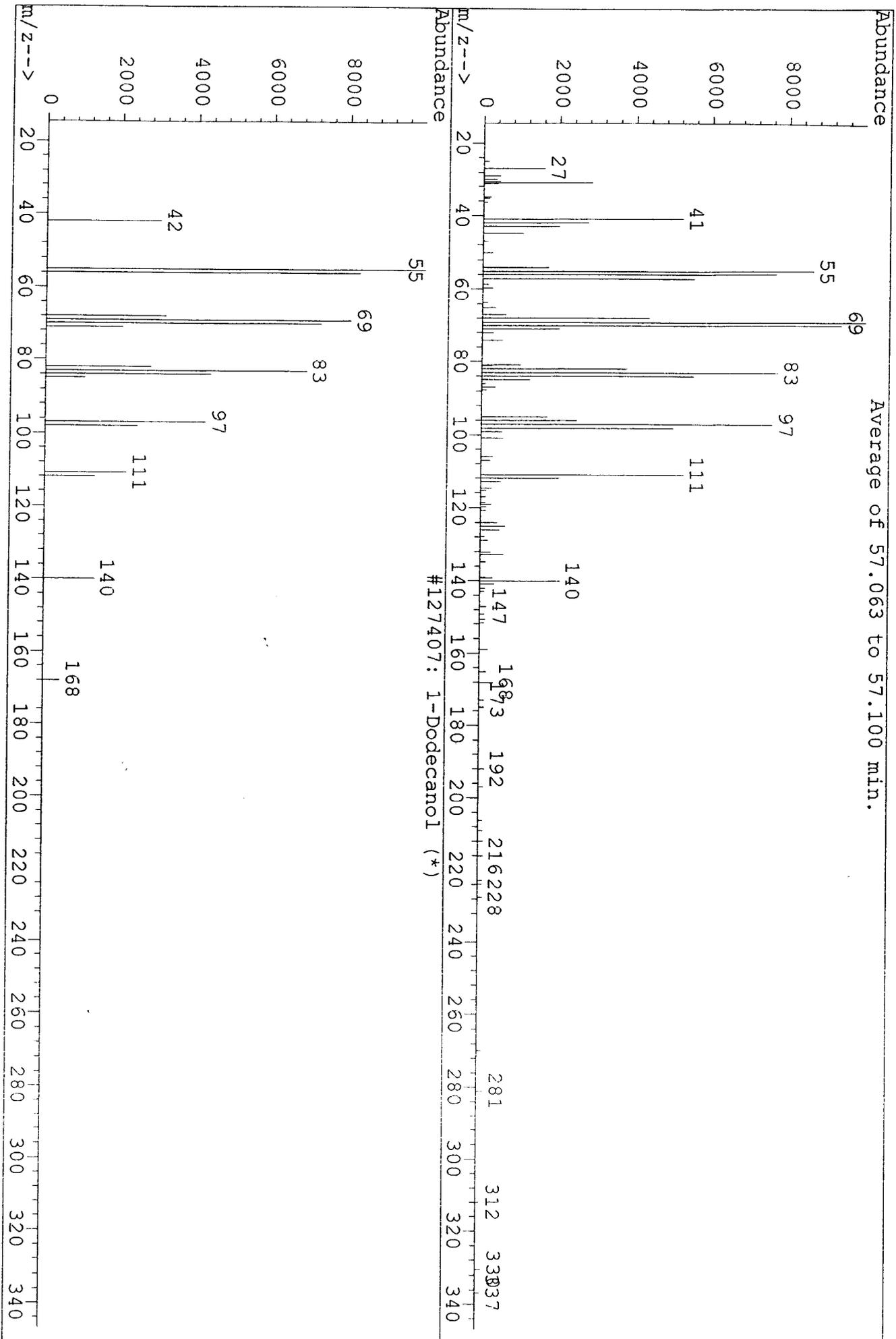
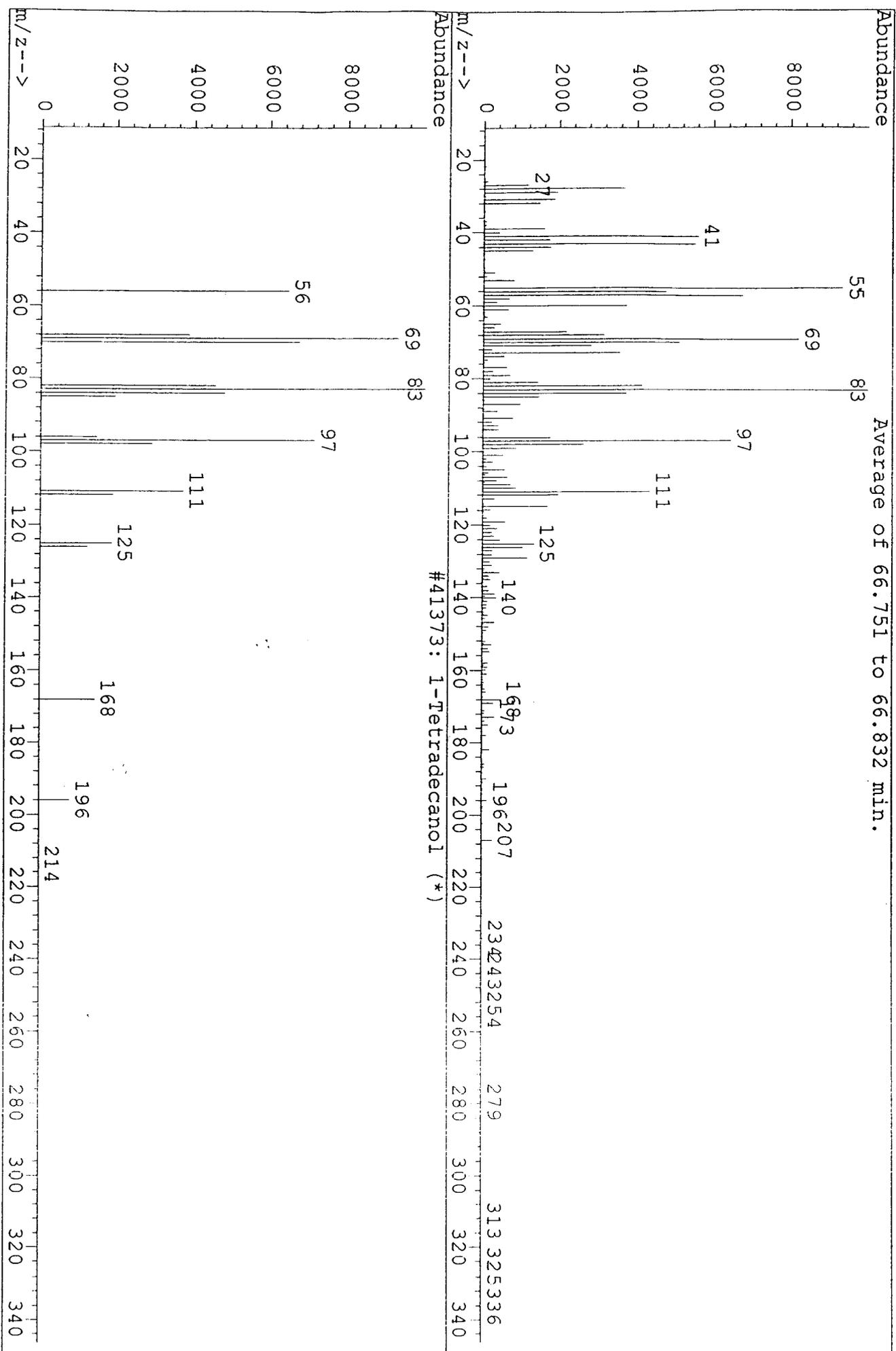


Figure 32 : Spectre de masse du tétradécane-1-ol.



	indices de rétention	
linalol	1551	1075
néomenthol	1599	1133
menthol	1644	1138
alpha-terpinéol	1700	1173
bétra-citronello	1771	1207
nérol	1804	-
géraniol	1855	1232
néroïdol	2045	1528
3, 7, 11-triméthyl-6, 10-dodécadièn-1-ol	2272	-
farnésol	2360	1697

Tableau 21 : Terpénols identifiés après une fermentation levurienne.

	indices de rétention	
2-furan-méthanol	1664	832
alcool benzylique	1880	1020
2-phényléthanol	1914	1082
2-phénylpropanol	2049	1201

Tableau 22 : Alcools cycliques identifiés après une fermentation levurienne.

Figure 33 : Spectre de masse du nérol.

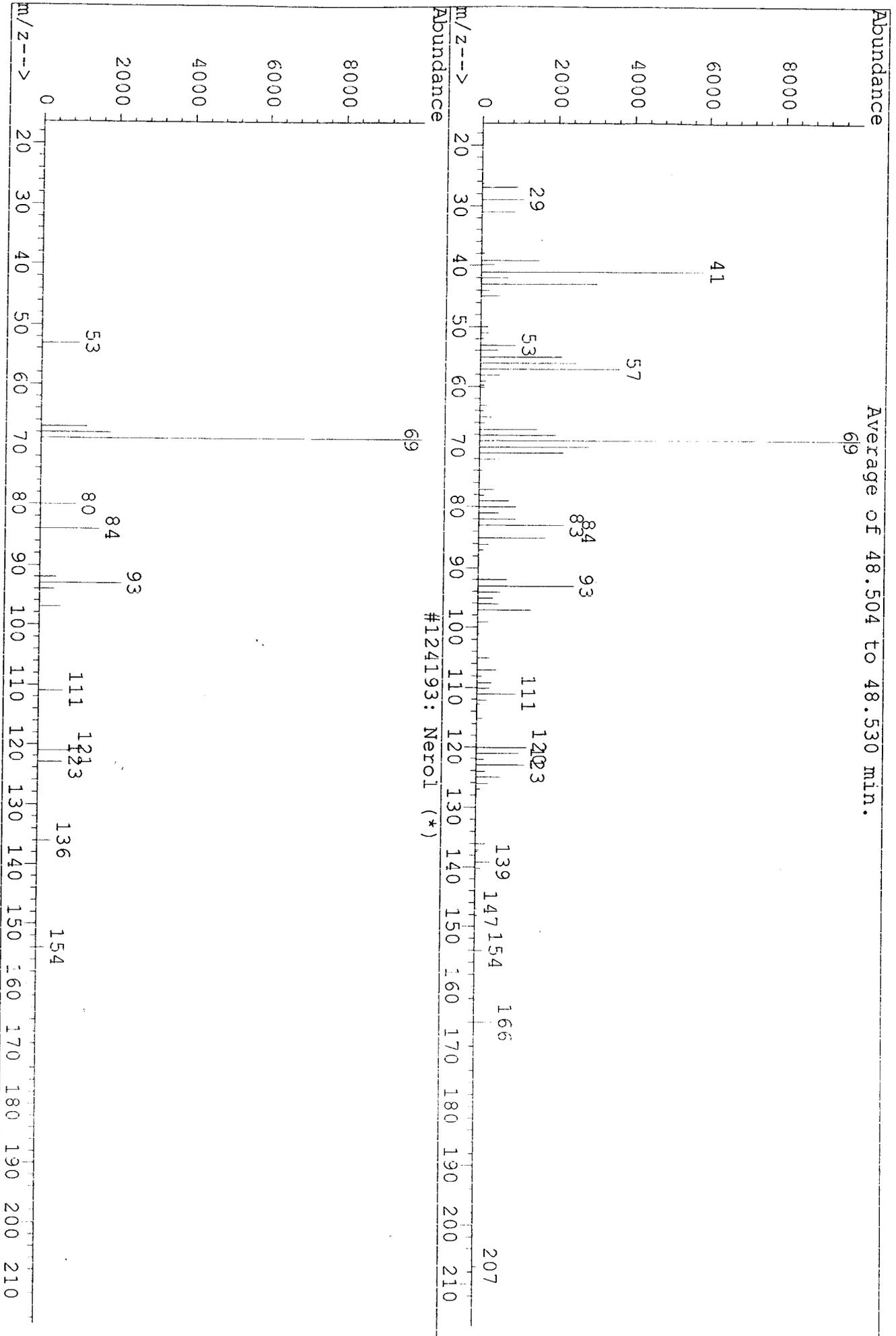
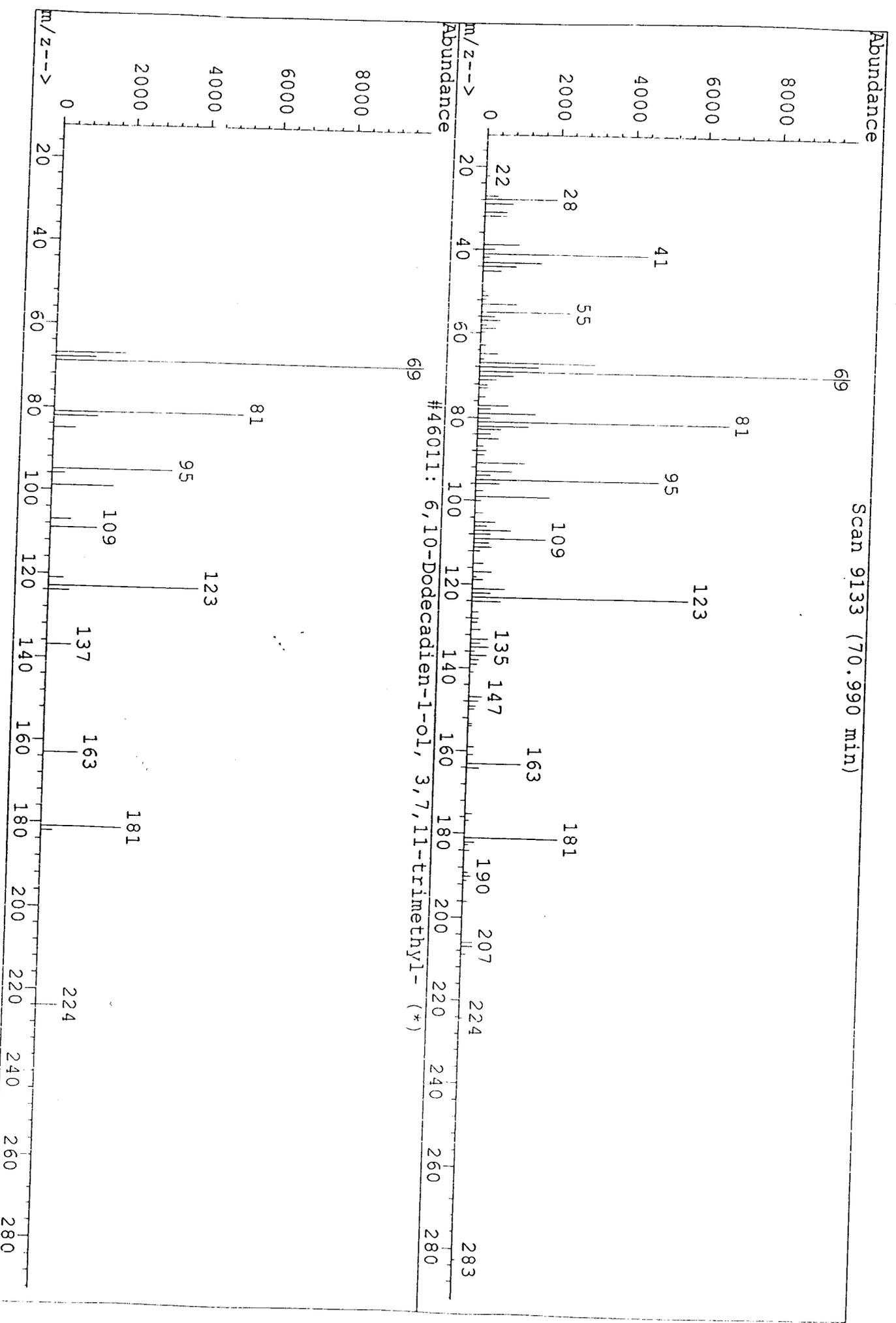


Figure 34 : Spectre de masse du 3,7,11-triméthyl-6,10-dodécadièn-1-ol.



### - Les alcools cycliques (Tableau 22).

Nous avons retrouvé quatre alcools cycliques dans les distillats. Ils ont tous été identifiés dans la mélasse mais dans des proportions différentes. Le **2-phényléthanol** représente en moyenne 3,74% de la surface totale des pics pour les distillats. Cependant, ce composé est présent en faible quantité dans la mélasse. Le 2-phényléthanol présent dans les distillats peut avoir deux origines. Le 2-phényléthanol peut exister dans la mélasse sous une forme glycosylée. L'action de béta-glucosidases de la levure permettrait la libération du 2-phényléthanol dans le milieu. Le 2-phényléthanol peut également provenir de la transformation par la levure de la phénylalanine (figure 35). Dans la mesure où les béta-glucosidases des *Saccharomyces cerevisiae* sont généralement intracellulaires et que leur synthèse est réprimée par le glucose, nous pensons que le 2-phényléthanol provient essentiellement de la transformation par la levure de la phénylalanine. Le **2-furanméthanol** provient directement de la mélasse où il est présent en quantité relativement importante. Les pics correspondants à l'**alcool benzylique** et au **2-phénylpropanol** ne représentent respectivement que 0,06% et 0,05% de la surface totale des pics. Ces composés sont issus également de la mélasse.

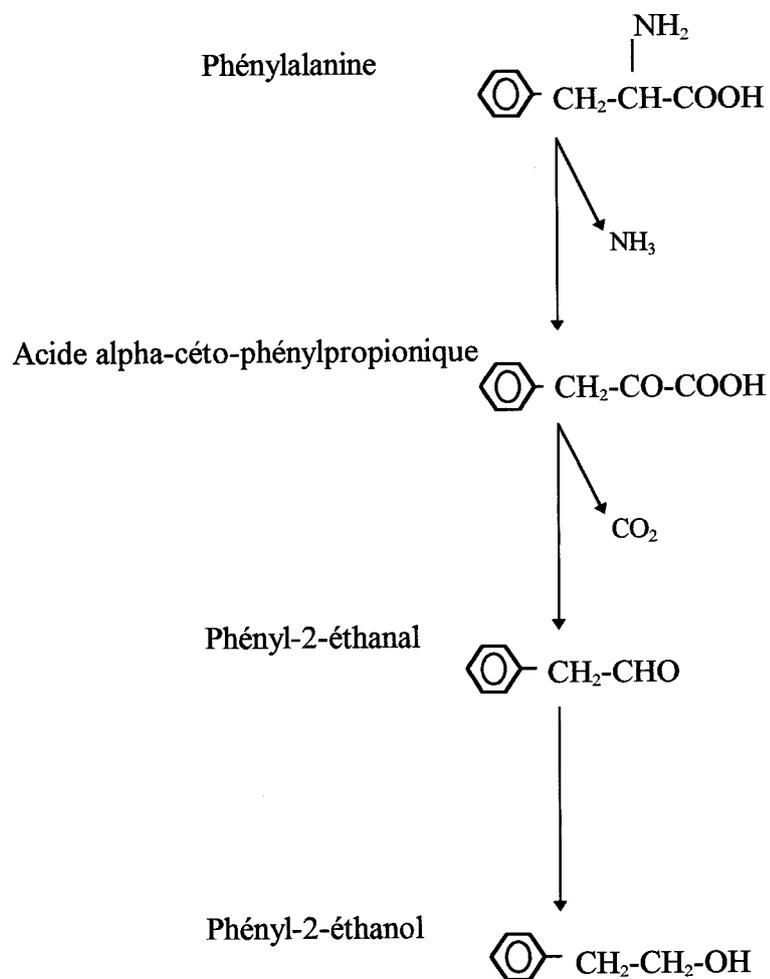
### - Les composés phénoliques (Tableau 23).

Douze composés phénoliques ont été identifiés dans nos extraits. La présence du **2-méthoxy-phénol**, du **4-méthyl-2-méthoxy-phénol**, du **4-éthyl-2-méthoxy-phénol** et du **2-méthoxy-4-(2-propényl)-phénol** dans la mélasse ne suffit pas à expliquer leur présence en relativement grande quantité dans les distillats (leurs pics représentent respectivement 1,01%, 0,02%, 0,18% et 0,48% de la surface totale des pics des chromatogrammes). Ils proviennent également de la décarboxylation des acides aminés substitués par la levure (Albagnac, 1975).

Parmi les 12 composés phénoliques identifiés, deux n'ont jamais été mentionnés dans les précédentes études concernant la composition des rhums. Il s'agit du **4-éthényl-phénol** ou *p*-vinyl-phénol et du **4,5-diméthoxy-2-(propényl)-phénol**. Ils sont eux aussi issus de la décarboxylation des acides cinnamiques par les levures. Par exemple, le *p*-vinyl-phénol dérive de l'acide 4-hydroxy-cinnamique ou acide *p*-coumarique.

	indices de rétention	
	colonne polaire	colonne apolaire
2-méthoxy-phénol	1858	1059
4-méthyl-2-méthoxy-phénol	1954	-
phénol	2004	1015
4-éthyl-2-méthoxy-phénol	2027	1250
4-propyl-2-méthoxy-phénol	2105	-
2-méthoxy-4-(2-propényl)-phénol	2163	1326
4-éthyl-phénol	2173	1136
4,5-diméthoxy-2-(propényl)-phénol	2237	-
4-propyl-phénol	2264	-
2,6-diméthoxy-phénol	2265	-
2-méthoxy-4-(1-propényl)-phénol	2344	1445
4-éthényl-phénol	2390	-

Tableau 23 : Phénols identifiés après une fermentation levurienne



**Figure 35 : Formation du phényl-2-éthanol à partir de la phénylalanine.**

Deux éthers de phényl identifiés dans les distillats, le **4-éthényl-1,2-diméthoxy-benzène** (0,84%) et le **1-éthényl-4-méthoxy-benzène** (1,59%), proviennent également de la décarboxylation des acides cinnamiques substitués par la levure

#### - Les acides gras (Tableau 24).

Les acides gras présents dans les distillats sont les mêmes que ceux présents dans la mélasse. Seules, leurs proportions relatives ont changé. Les acides gras saturés, à nombre de carbones pair et supérieur à 4, sont en quantités plus importantes que les autres acides. Cette particularité trouve son explication dans le mécanisme de synthèse des acides gras par la levure (figure 36). Les acides gras à nombre de carbones impair ne sont synthétisés qu'en faible quantité par la levure lors de la fermentation. L'intermédiaire nécessaire pour leur synthèse est alors le propionyl-CoA (et non pas l'acétyl-CoA).

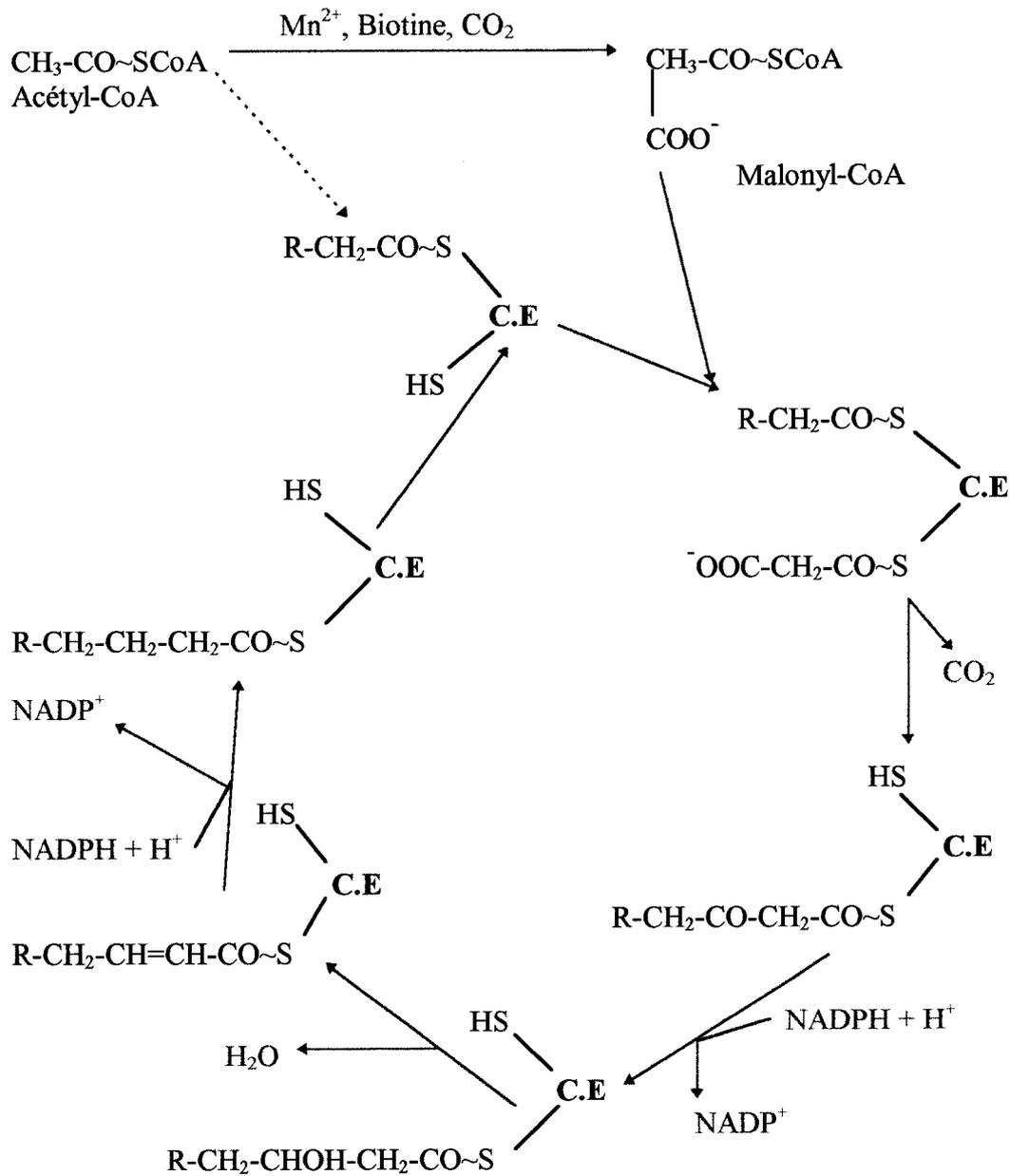
#### - Les esters (Tableau 25).

C'est la famille la mieux représentée. Nous avons identifié 46 composés. Les esters ont généralement des notes aromatiques agréables. Les fermentations avec les levures de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* conduisent à la formation des mêmes esters quelle que soit la souche.

On retrouve la série d'esters éthyliques depuis le **formiate d'éthyle** jusqu'au **dodécanoate d'éthyle**, à laquelle se rajoute le **tétradécanoate d'éthyle**, le **pentadécanoate d'éthyle**, l'**hexadécanoate d'éthyle** et l'**octadécanoate d'éthyle**. Tout comme les acides gras, ce sont les esters éthyliques à nombre de carbones pair et supérieur à 4 qui sont quantitativement les mieux représentés. Ce résultat s'explique par le métabolisme particulier de synthèse des esters éthyliques (figure 13). Des intermédiaires de la synthèse des acides gras sont à l'origine d'une grande partie des esters éthyliques produits au cours de la fermentation. La plupart de ces intermédiaires ont un nombre de carbones pair et conduisent donc à un plus grand nombre d'esters à nombre de carbones pair.

	indices de rétention	
	colonne polaire	colonne apolaire
acide acétique	1455	-
acide propionique	1544	675
acide 2-méthyl-propionique	1586	-
acide butyrique	1635	746
acide 3-méthyl-butyrique	1683	-
acide 2-furancarboxylique	1727	-
acide pentanoïque	1748	874
acide hexanoïque	1859	981
acide heptanoïque	1964	1075
acide octanoïque	2070	1153
acide nonanoïque	2177	1263
acide décanoïque	2285	1351
acide dodécanoïque	2401	1542
acide tétradécanoïque	>2400	1769
acide hexadécanoïque	>2400	1982

Tableau 24 : Acides identifiés après une fermentation levurienne



C.E : complexe enzymatique

Dans le cas des acides gras à nombre impair d'atomes de carbone, l'acétyl-CoA est remplacé par le propionyl-CoA.

Figure 36 : formation des acides gras d'après Lynen (1967).

	indices de rétention			indices de rétention	
	colonne polaire	colonne apolaire		colonne polaire	colonne apolaire
formiate d'éthyle	815	500	acétate de propyle	963	702
acétate d'éthyle	840	602	acétate de 2-méthyl-1-propanol	1012	-
propionate d'éthyle	932	689	acétate de 2-méthyl-1-butanol	1120	852
butyrate d'éthyle	1034	777	acétate de 3-méthyl-1-butanol	1122	856
pentanoate d'éthyle	1137	879	acétate d'hexyle	1275	1003
hexanoate d'éthyle	1234	977	acétate d'heptanyle	1372	1098
formate de furfuryle	1287	-	hexanoate de 2-méthyl-1-butanol	1458	1263
heptanoate d'éthyle	1334	1081	hexanoate de 3-méthyl-1-butanol	1460	1265
octanoate d'éthyle	1436	1178	acétate d'octyle	1476	1194
nonanoate d'éthyle	1536	1277	acétate de 2-furaméthanol	1537	969
2-hydroxy-4-méthyl-pentanoate d'éthyle	1545	-	octanoate de 2-méthyl-1-butanol	1661	1468
décanoate d'éthyle	1643	1382	octanoate de 3-méthyl-1-butanol	1662	1470
undécanoate d'éthyle	1742	1479	benzoate d'éthyle	1664	1143
2-phénylacétate d'éthyle	1786	1211	acétate de benzyle	1701	1130
2-hydroxybenzoate d'éthyle	1795	1220	acétate de phénylméthanol	1727	-
dodécanoate d'éthyle	1847	1576	2-hydroxybenzoate de méthyle	1771	1150
tétradécanoate d'éthyle	2050	1775	acétate de 4-éthyl-phénol	1784	-
pentadécanoate d'éthyle	2152	1875	acétate de 2-phényl-éthanol	1816	1224
hexadécanoate d'éthyle	2258	1976	décanoate de 2-méthyl-1-butanol	1863	1675
octadécanoate d'éthyle	>2400	2178	décanoate de 3-méthyl-1-butanol	1864	1677
octadécèn-9-oate d'éthyle	>2400	2131	3-phényl-propionate d'éthyle	1885	-
octadécadièn-9,12-oate d'éthyle	>2400	2137	acétate de 2-phényl-propanol	1940	1352
1,2-benzènedicarboxylate de dibutyle	>2400	-	dodécanoate de 3-méthyl-1-butanol	2067	1877

Tableau 25 : Esters identifiés après une fermentation levurienne

D'autres esters proviennent de l'estérification des alcools supérieurs. Ce sont par exemple l'**acétate de propyle**, l'**acétate d'isobutyle**, l'**acétate de 2-méthyl-1-butanol** et l'**acétate de 3-méthyl-1-butanol**. Ils sont directement issus des alcools supérieurs correspondants. En effet, leur importance relative dans les distillats est proportionnelle à celle des alcools supérieurs correspondants. Les autres acétates identifiés proviennent également des alcools correspondants et leur proportion relative est en rapport avec celle de leur alcool. L'**acétate de 2-phényléthanol** représente 0,42% de la surface totale des pics alors que l'**acétate de phénylméthanol** n'est présent qu'à l'état de traces.

De nombreux autres esters dérivent des alcools amyliques. Ce sont l'**hexanoate de 2-méthyl-1-butanol**, l'**hexanoate de 3-méthyl-1-butanol**, l'**octanoate de 2-méthyl-1-butanol**, l'**octanoate de 3-méthyl-1-butanol**, le **décanoate de 2-méthyl-1-butanol** et le **décanoate de 3-méthyl-1-butanol**. Tous ces composés sont formés lors de la réaction entre les alcools amyliques et les acides gras synthétisés par la levure. Cette réaction nécessite l'intervention d'enzymes de la levure. Le 3-méthyl-1-butanol étant plus abondant dans les distillats que le 2-méthyl-1-butanol, il est logique que les esters qui en dérivent soient eux-mêmes plus abondants que ceux qui dérivent du 2-méthyl-1-butanol.

Le **3-phénylpropionate d'éthyle**, qui provient de la décarboxylation des acides cinnamiques substitués, a été identifié dans tous les distillats, quelle que soit la levure utilisée.

Le seul ester dérivé de composés phénoliques que nous ayons identifié est l'**acétate de 4-éthylphénol**.

L'**acétate de furfuryle** (0,23%) provient de l'estérification par la levure du 2-furanméthanol, dont la proportion relative a été divisée par 12 par rapport à la mélasse.

Compte tenu de leur diversité, de leur faible seuil de perception et de leur présence en relativement grande quantité, les esters contribuent de manière importante à l'arôme du rhum.

#### - Les aldéhydes et les acétals (Tableau 26).

Nous avons regroupé les aldéhydes et les acétals car ces derniers sont issus d'une réaction entre les alcools et les aldéhydes. Misselhorn a étudié la cinétique de formation des acétals. Ils sont en équilibre avec les aldéhydes (figure 17). Les acétals semblent ne pas avoir d'influence significative sur la qualité organoleptique des rhums.

	indices de rétention	
	colonne polaire	colonne apolaire
<b>Aldéhydes</b>		
éthanal	693	<500
propanal	795	<500
2-méthylbutanal	938	868
3-méthylbutanal	945	873
2-furancarboxaldéhyde	1462	825
benzaldéhyde	1520	955
5-méthyl-2-furancarboxaldéhyde	1571	951
béta-cyclocitral	1619	-
2-phényléthanal	1638	-
2,4-décadiénal	1807	-
<b>Acétals</b>		
1,1-diéthoxy-éthane	845	714
1,1-diéthoxy-propane	929	-
1-(1-éthoxyéthoxy)-propane	949	-
1,1-diéthoxy-2-méthyl-propane	966	-
1,1-diéthoxy-butane	1043	-
1,1-diéthoxy-2-méthyl-butane	1074	-
1,1-diéthoxy-3-méthyl-butane	1078	-
1-(1-éthoxyéthoxy)-pentane	1109	-
1,1-diéthoxy-pentane	1141	-

Tableau 26 : Aldéhydes et acétals identifiés après une fermentation levurienne

La présence dans les extraits de **1,1-diéthoxy-2-méthyl-propane**, **1,1-diéthoxy-butane** et de **1,1-diéthoxy-pentane** permet de supposer que le 2-méthyl-propanal, le butanal et le pentanal sont présents dans les distillats.

La formation de l'**acétaldéhyde** est la dernière étape avant celle de l'éthanol dans le processus de fermentation. On remarque d'ailleurs que la quantité d'acétaldéhyde chute brutalement en fin de fermentation. Il est cependant l'aldéhyde le plus important quantitativement dans les rhums.

Parmi tous les aldéhydes identifiés dans les distillats, seul le **2,4-décadiénal** est absent de la mélasse.

Les proportions relatives du **benzaldéhyde** (0,12%), du **2-phényléthanal** (0,11%), du **2-furancarboxaldéhyde** (0,12%), du **5-méthyl-2-furancarboxaldéhyde** et du **béta-cyclocitral** (0,02%) sont plus faibles que dans la mélasse. L'emploi d'un solvant moins polaire que pour la mélasse et la réduction de ces aldéhydes pendant la fermentation expliquent en partie ces différences.

#### - Les alkympyrazines (Tableau 27).

On rencontre dans les distillats les mêmes alkympyrazines que dans la mélasse mais dans des proportions relatives légèrement inférieures. Ils ne subissent aucune modification durant la fermentation. Ce sont des composés volatils pouvant participer à l'élaboration de l'arôme des rhums.

#### - Les cétones (Tableau 28).

Parmi les cétones identifiées nous pouvons citer le **3-méthyl-cyclopentanone** (figure 37) dont la présence dans les rhums n'avait jusqu'à présent jamais été mentionnée.

La plupart des cétones proviennent directement de la mélasse. Seuls les méthylcétones tels que le **pentan-2-one**, le **undécan-2-one**, le **tridécan-2-one** et le **pentadécan-2-one** sont issus de la fermentation. Ils sont formés par bêta-oxydation des acides gras suivie d'une décarboxylation des cétoacides intermédiaires. Une grande partie de ces cétones peut être réduite par la suite en alcools secondaires.

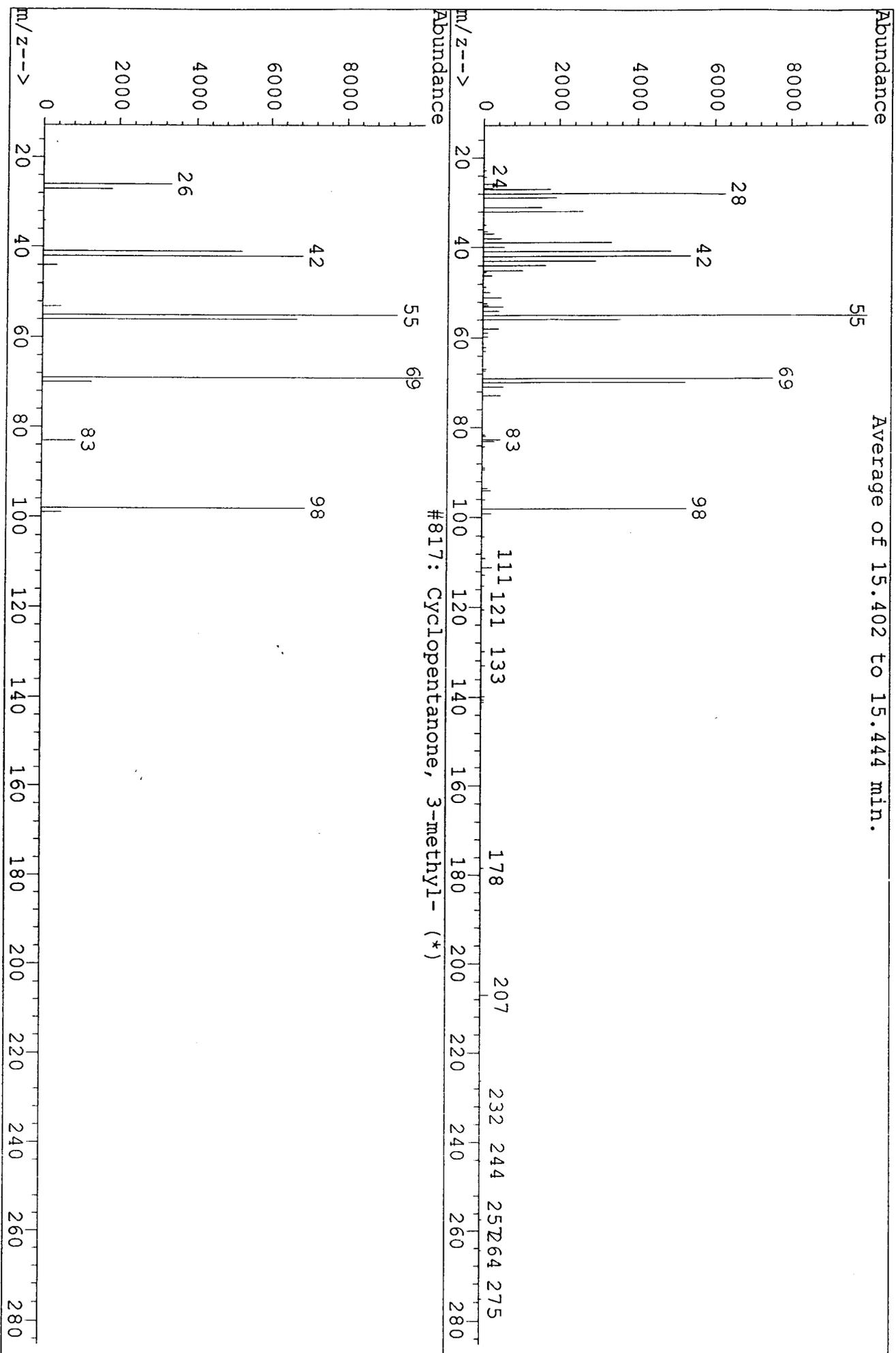
	indices de rétention	
	colonne polaire	colonne apolaire
méthyl-pyrazine	1268	810
2,5-diméthyl-pyrazine	1325	891
2,6-diméthyl-pyrazine	1331	899
éthyl-pyrazine	1337	-
2,3-diméthyl-pyrazine	1349	905
2-éthyl-5-méthyl-pyrazine	1388	-
2-éthyl-6-méthyl-pyrazine	1394	-
triméthyl-pyrazine	1407	-
3-éthyl-2,5-diméthyl-pyrazine	1448	-
2-éthyl-3,5-diméthyl-pyrazine	1464	-
2-éthényl-6-méthyl-pyrazine	1488	-
1-(1H-pyrrol-2-yl)-éthanone	1971	-

Tableau 27 : Composés azotés identifiés  
après une fermentation levurienne

Cétones	indices de rétention	
	colonne polaire	colonne apolaire
2-méthyl-furanne	872	621
pentan-2-one	964	680
3-penten-2-one	1026	-
cyclopentanone	1188	812
2-méthyl-cyclopentanone	1194	-
3-méthyl-cyclopentanone	1215	-
dihydro-2-méthyl-3(2H)-furanone	1264	-
1-(2-furanyl)-éthanone	1502	-
1-(2-furanyl)-propanone	1574	-
2-acétyl-5-méthyl-furanne	1600	-
undécan-2-one	1604	1298
4-(5-méthyl-2-furanyl)-2-butanone	1712	-
tridécan-2-one	1809	1505
2-éthényl-benzofuranne	1837	-
1-(1H-pyrrol-2-yl)-éthanone	1971	-
3-(2-butényl)-2,4,4-triméthyl-2-cyclohexèn-1-one	1980	-
pentadécan-2-one	2020	1715
3-(1,3-butadiényl)-2,4,4-triméthyl-2-cyclohexèn-1-one	2152	-
Cétones issues de la dégradation des caroténoïdes		
3,5,5-triméthyl-2-cyclohexèn-1-one	1591	-
béta-damascénone	1822	1362

Tableau 28 : Cétones identifiées après une fermentation levurienne

Figure 37 : Spectre de masse du 3-méthyl-cyclopentanone.



La **béta-damascénone** et le **3,5,5-triméthyl-2-cyclohexèn-1-one** sont présents dans des proportions relatives légèrement plus faibles que dans la mélasse. Ces composés ne sont pas utilisés pendant la fermentation.

#### - Les hydrocarbures (Tableau 29).

On retrouve tous les alcanes identifiés dans la mélasse. Ils ne sont pas utilisés par les levures. Leurs proportions relatives sont légèrement diminuées.

Les dérivés des caroténoïdes sont présents dans les distillats. Sept composés présentant le même spectre de masse que le **1,1,6-triméthyl-1,2,3,4-tétrahydronaphthalène** (TTN) et trois composés présentant le même spectre de masse que le **1,1,6-triméthyl-1,2-dihydronaphthalène** (TDN) ont été relevés. Ils n'interviennent pas dans le métabolisme de la levure.

Nous avons mis en évidence la présence dans les distillats du **styrène** (0,12%) Il provient de la décarboxylation par les levure des acides cinnamiques substitués (Albagnac, 1975).

Nous avons identifié quelques composés benzéniques qui sont également présents dans la mélasse.

Deux composés présentent un spectre de masse caractéristique des sesquiterpènes, avec un poids moléculaire de 204.

#### - Les composés soufrés.

Nous avons identifié un seul composé soufré, le diméthyl-trisulfide. Il est présent dans la mélasse.

\*

L'étude des fermentations par les levures de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* nous a permis de dresser une première liste de 201 composés chimiques présents dans les distillats. Certains proviennent de la mélasse et n'ont pas subi de transformation. D'autres, absents de la

	indices de rétention	
	colonne polaire	colonne apolaire
<b>Alcanes</b>		
décane	1000	1000
undécane	1100	1100
dodécane	1200	1200
tridécane	1300	1300
tétradécane	1400	1400
pentadécane	1500	1500
hexadécane	1600	1600
heptadécane	1700	1700
octadécane	1800	1800
nonadécane	1900	1900
eïcosane	2000	2000
<b>Dérivés des caroténoïdes</b>		
1,1,6-triméthyl-1,2,3,4-tétrahydronaphthalène (TTN)	1446	-
TTN	1479	-
1,5,7-triméthyl-1,2,3,4-tétrahydronaphthalène (TTN)	1520	-
TTN	1585	-
TTN	1595	-
1,6,8-triméthyl-1,2,3,4-tétrahydronaphthalène (TTN)	1624	-
TTN	1666	-
1,1,6-triméthyl-1,2-dihydronaphthalène (TDN)	1740	-
2,5,8-triméthyl-1,2-dihydronaphthalène (TDN)	1816	-
1,5,8-triméthyl-1,2-dihydronaphthalène (TDN)	1825	-
TTN	2014	-
<b>Composés benzéniques</b>		
méthyl-benzène	1041	-
1-éthyl-2-méthyl-benzène	1225	-
styrène	1255	-
1-méthyl-4-(1-méthyléthyl)-benzène ( <i>p</i> -cymène)	1269	1026
1,2,4-triméthyl-benzène	1280	-
1-méthyl-3-propyl-benzène	1304	-
butyl-benzène	1313	-
1-éthyl-3,5-diméthyl-benzène	1483	-

Tableau 29 : Alcanes, dérivés des caroténoïdes et composés benzéniques identifiés après une fermentation levurienne

mélasse, sont issus du métabolisme de la levure. L'étude de différentes souches de *Saccharomyces cerevisiae* n'a pas fait apparaître de différences qualitative dans la composition des distillats.

Nous avons procédé ensuite à l'analyse de distillats provenant de fermentations avec un *Schizosaccharomyces pombe*. La liste des composés chimiques que nous avons établie va nous permettre de mieux apprécier les modifications qualitatives du distillat engendrées par l'utilisation du *Schizosaccharomyces pombe* pendant la fermentation.

### III-2.2.1.2. Composition des distillats obtenus après fermentation avec la souche de *Schizosaccharomyces pombe* (Tableau 30).

La plupart des composés mis en évidence dans les distillats obtenus après fermentation avec les *Saccharomyces cerevisiae* sont également présentes dans les distillats obtenus après fermentation avec *Schizosaccharomyces pombe*. Dans ce chapitre, nous nous contenterons donc d'aborder les différences qualitatives observées. Elles concernent exclusivement les alcools et les esters.

Six nouveaux esters ont été identifiés : le **2-hydroxy-propionate d'éthyle** ou lactate d'éthyle, le **butanedioate de diéthyle**, le **4-méthoxy-benzoate d'éthyle**, le **3-(4-méthoxyphényl)-propionate d'éthyle**, l'**hexadécène-9-oate d'éthyle** ou palmitoléate d'éthyle (1,17% de la surface totale des pics) et l'**octadécatriène-9,12,15-oate d'éthyle** ou linoléate d'éthyle (5% de la surface totale des pics).

Le lactate d'éthyle peut avoir deux origines. Il peut provenir de la **fermentation malo-lactique**, c'est à dire de la dégradation de l'acide malique en acide lactique, puis en lactate d'éthyle, par la levure *Schizosaccharomyces pombe*. On fait intervenir cette particularité biochimique lors de l'utilisation des bactéries dans la désacidification des vins. Il peut également provenir de la transformation du pyruvate d'éthyle en lactate d'éthyle par la voie de la **fermentation lactique**. Bien qu'il soit admis que les levures du genre *Schizosaccharomyces* ont la capacité de dégrader la totalité de l'acide malique présent dans le milieu par le biais de la **fermentation malo-alcoolique** et donc de conduire à l'éthanol, la présence systématique de

	indices de rétention	
	colonne polaire	colonne apolaire
2-hydroxy-propionate d'éthyle	1345	-
butanedioate de diéthyle	1680	-
4-méthoxy-benzoate d'éthyle	2129	-
3-(4-méthoxyphényl)-propionate d'éthyle	2307	-
hexadécèn-9-oate d'éthyle	>2400	-
octadécatrièn-9,12,15-oate d'éthyle	>2400	-

Tableau 30 : Esters identifiés uniquement après une fermentation avec le *Schizosaccharomyces pombe*

lactate d'éthyle dans les distillats obtenus après fermentation avec le *Schizosaccharomyces pombe* nous fait penser qu'une partie de l'acide malique est dégradé en acide lactique puis en lactate d'éthyle par la levure. Pour connaître la voie empruntée par les *Schizosaccharomyces pombe* pour former l'acide lactique, il faudrait réaliser des expériences en utilisant des substrats constitués d'une seule source carbonée : soit l'acide malique, soit le saccharose.

A l'inverse, de nombreux esters mis en évidence après les fermentations par les *Saccharomyces cerevisiae*, n'ont pas été retrouvés. Nous avons vu auparavant que le *Schizosaccharomyces pombe* synthétise très peu de 2-méthyl-1-butanol et de 3-méthyl-1-butanol. Les teneurs des vins en amyliques sont insuffisantes pour que les réactions d'estérification entre ces alcools et les acides gras se produisent. L'hexanoate de 2-méthyl-1-butanol, l'hexanoate de 3-méthyl-1-butanol, l'octanoate de 2-méthyl-1-butanol, l'octanoate de 3-méthyl-1-butanol, le décanoate de 2-méthyl-1-butanol et le décanoate de 3-méthyl-1-butanol sont donc absents des distillats obtenus après fermentation avec un *Schizosaccharomyces pombe*.

Certains alcools tels que le nonan-1-ol, le décan-1-ol, l'undécan-1-ol, le dodécan-1-ol et le tétradécan-1-ol n'ont pas été retrouvés dans les distillats.

Les autres différences observées sont d'ordre quantitatif.

\*

L'étude qualitative des distillats obtenus après fermentation avec les levures nous offre un nouvel aperçu sur les différences de composition des distillats qui existent entre ceux obtenus après fermentation avec les *Saccharomyces cerevisiae* et ceux obtenus avec le *Schizosaccharomyces pombe*.

Nous nous sommes ensuite attachés à étudier les différences d'ordre quantitatif. Cette étude peut permettre de mettre en évidence d'autres particularités de nature biochimique chez les levures étudiées.

Pour rendre cette étude claire et interprétable, nous avons préféré choisir un nombre restreint de composés. Nous avons sélectionnés ceux qui étaient suffisamment importants à la fois qualitativement et quantitativement (cf Matériels et Méthodes).

### III-2.2.1.3. Comparaison des proportions relatives de quelques composés communs aux deux types de fermentation (Figures 38,39,40 et 41).

Les raisons du choix des différents composés étudiés et le mode de calcul de leurs proportions relatives sont décrits dans le chapitre « Matériel et Méthodes ».

Nous avons choisi pour cette étude 22 composés de nature diverse. Nous avons observé que les différences entre les six souches de *Saccharomyces cerevisiae* sont insuffisantes pour justifier une étude détaillée de chacune d'entre elles. Nous nous sommes donc limités à l'étude de trois souches de *Saccharomyces cerevisiae* (sd12, sd13 et 71b) et de la souche de *Schizosaccharomyces pombe*.

#### - Les esters éthyliques d'acides gras (figure 38).

Le profil de répartition des différents esters éthyliques est identique pour toutes les souches de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*. La souche de *Schizosaccharomyces pombe* se distingue des autres souches de levure par la présence d'une plus grande proportion d'esters lourds (esters constitués d'un nombre de carbones supérieur à 14). L'**hexadécanoate d'éthyle** (14,92%) et le **linoléate d'éthyle** (13,42%) sont les composés principaux rencontrés dans l'extrait des distillats provenant de la fermentation des *Schizosaccharomyces pombe*. En revanche, le décanoate d'éthyle est le composé principal (12,9% pour la souche sd13) pour les *Saccharomyces cerevisiae*. Le métabolisme de formation des esters éthyliques à nombre pair de carbones consiste en une série de cycles au cours desquels les chaînes s'allongent par addition successive de deux carbones. Le métabolisme du *Schizosaccharomyces pombe* comporte un plus grand nombre de cycles ; ce qui entraîne la formation d'esters éthyliques plus lourds.

Les esters éthyliques d'acides gras insaturés sont issus des intermédiaires de la synthèse des acides gras à longue chaîne. L'intermédiaire concerné dans la formation de l'**oléate d'éthyle** et du **linoléate d'éthyle** est le stéaryl-CoA. Une molécule d'oxygène est nécessaire à l'oxydation du stéaryl-CoA en présence de NADPH ou de NADH. Cette oxydation est suivie d'une perte d'une molécule d'eau. Le thioester subit alors une alcoololyse qui conduit à la formation de l'oléate d'éthyle. La particularité de cette réaction réside dans le fait que le site réactionnel et le site actif sont séparés par neuf atomes de carbone.

Figure 38 : proportions relative de quelques esters éthylliques



### - Les acides gras (figure 39).

Les différences sont moins nettes que pour les esters éthyliques. L'acide dodécanoïque (5,53%) est l'acide gras le plus important quantitativement dans les extraits provenant d'une fermentation par un *Schizosaccharomyces pombe*. En revanche, c'est l'acide décanoïque qui est l'acide gras le plus important dans les extraits provenant des fermentations par les *Saccharomyces cerevisiae*. La raison de cette différence est la même que pour les esters éthyliques d'acides gras.

### - Les autres composés.

Le **phényl-2-éthanol** est l'un des composés majoritaires formés par les *Saccharomyces cerevisiae* (figure 40). Il est issu du métabolisme de la phénylalanine. En revanche, il est absent des distillats issus de la fermentation par *Schizosaccharomyces pombe*. Cette dernière ne synthétise pas de 2-phényléthanol. Il est possible que cette levure soit déficiente en une des enzymes permettant la transformation de l'acide hydroxyphényl pyruvique en 2-phényléthanol.

Les différences que nous pouvons observer entre les différents distillats, concernant la proportion d'acétate d'isoamyle, sont à mettre en relation avec les teneurs des distillats en alcools amyliques. Les distillats obtenus après fermentation avec les *Saccharomyces cerevisiae* contiennent des quantités importantes d'alcools amyliques. Ces distillats ont également une proportion importante d'acétate d'isoamyle. A l'inverse, le *Schizosaccharomyces pombe* synthétise peu d'amyliques et les distillats issus des fermentations avec cette levure contiennent une faible proportion d'acétate d'isoamyle.

Un certain nombre de composés sont issus de la décarboxylation des acides cinnamiques substitués par les levures. On peut voir sur la figure 41 que les levures *Saccharomyces cerevisiae* produisent une grande quantité de **4-éthényl-1,2-diméthoxy-benzène** (1,4% pour la souche sd12) et dans une moindre mesure de **4-éthyl-gaïacol** (0,15% pour la souche sd12). Ce n'est pas le cas du *Schizosaccharomyces pombe* (0,1% de 4-éthényl-1,2-diméthoxy-benzène et 0,06% de 4-éthyl-gaïacol).

La proportion relative de **3-phénylpropionate d'éthyle** est légèrement plus élevée dans l'extrait issu d'une fermentation de *Schizosaccharomyces pombe*.

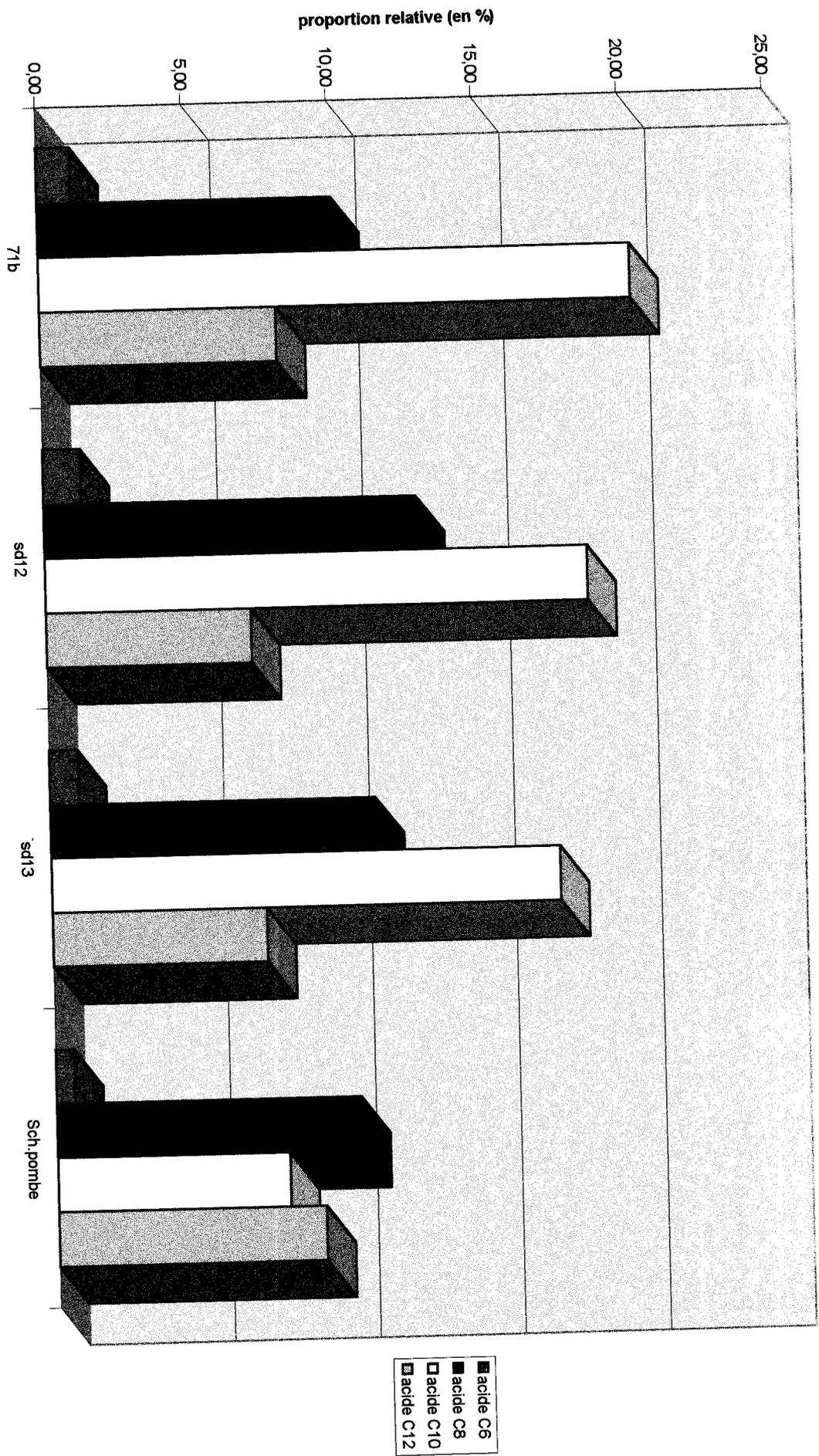


Figure 39 : Proportions relatives de quelques acides gras

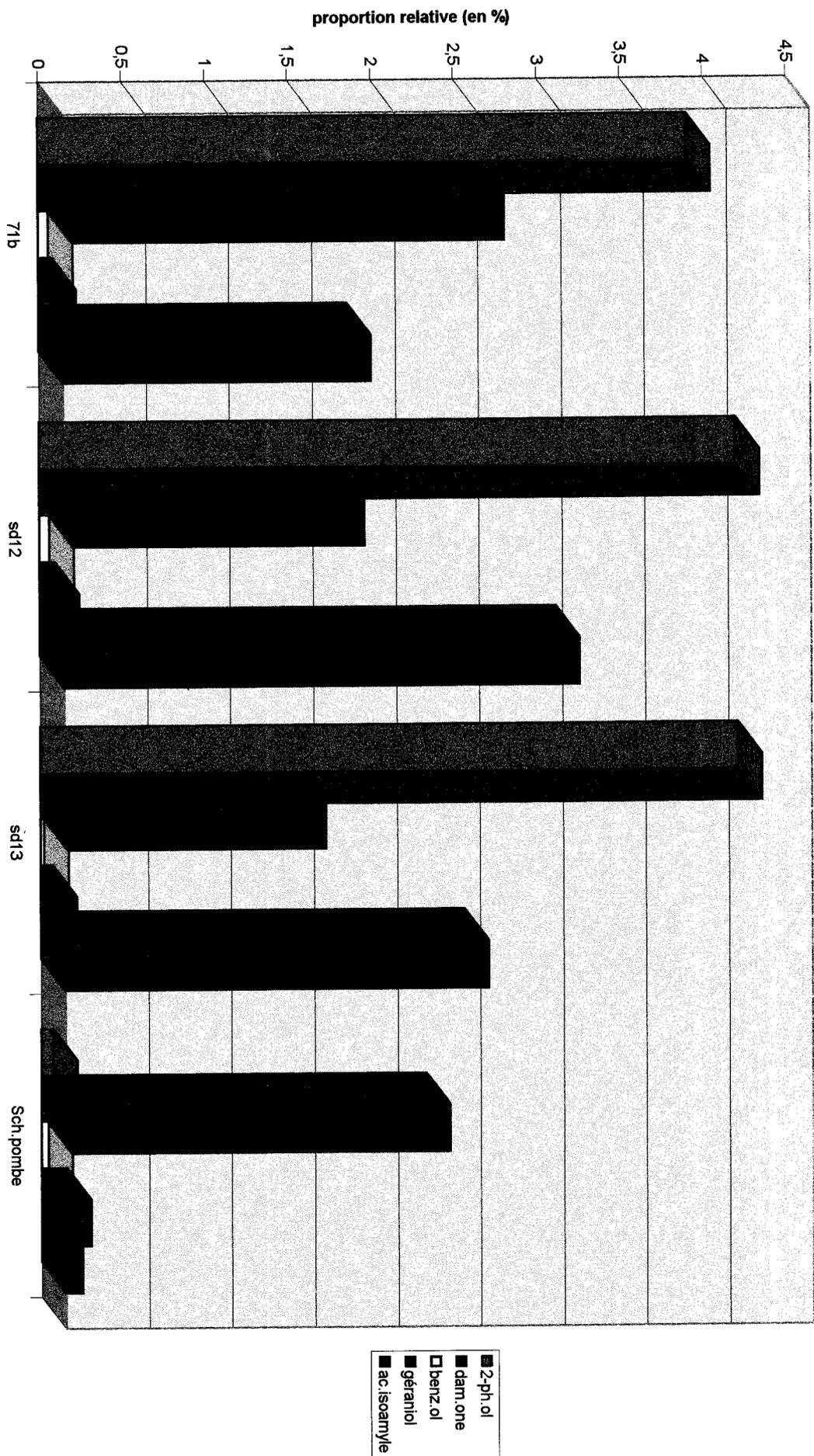


Figure 40 : Proportions relatives de quelques composés aromatiques

Figure 41 : proportions relatives de quelques composés aromatiques



La décarboxylation des acides cinnamiques substitués est plus importante chez les souches de *Saccharomyces cerevisiae*. Il apparaît donc que ces dernières utilisent ce substrat en plus grande quantité que les *Schizosaccharomyces pombe*.

Les alcools à longue chaîne carbonée, parmi lesquels l'**octan-1-ol**, sont présents en très faible quantité dans les extraits provenant d'une fermentation par un *Schizosaccharomyces pombe*.

La proportion relative de **géraniol** est la même et reste faible dans tous les extraits de distillat. L'ensemble des levures ne semble donc pas posséder de bêta-glucosidase qui soit active dans les conditions de fermentation.

L'importance relative de la **béta-damascénone** est identique dans tous les extraits. On retrouve la même valeur dans la mélasse. Ce composé n'est donc pas modifié lors des différentes étapes de la fabrication des rhums.

L'étude de la composition chimique des distillats permet de mettre en évidence de nombreuses différences dans le métabolisme des deux genres de levures. Ces différences sont à la fois qualitatives et quantitatives.

En revanche, les différences sont moins nettes à l'intérieur d'une même espèce. Tous les distillats issus des fermentations effectuées par des *Saccharomyces cerevisiae* ont sensiblement la même composition quelle que soit la souche utilisée.

\*

Les différentes études menées sur la fermentation de la mélasse par les levures nous ont permis de montrer que l'impact de la levure est complètement différent selon le genre auquel elle appartient. Les *Schizosaccharomyces pombe* réalisent la fermentation plus lentement que les *Saccharomyces cerevisiae* et leur métabolisme est très différent. Ceci se traduit par des différences qualitatives et quantitatives dans la composition des distillats.

Si la distinction entre une fermentation par une levure du genre *Saccharomyces* et une levure du genre *Schizosaccharomyces* est aisée à mettre en évidence, il n'en est pas de même pour des souches de levure appartenant à la même espèce. Un des moyens pour y parvenir consiste à comparer les quantités produites d'alcools supérieurs.

Il est intéressant de constater qu'un grand nombre de composés chimiques ne sont pas utilisés par les levures. On les retrouve à l'issue de la fermentation dans les mêmes proportions qu'au départ. Leur présence et leur importance relative dans les distillats est donc essentiellement fonction de la matière première utilisée.

Cette étude a permis d'identifier 207 composés chimiques présents dans les distillats, parmi lesquels 6 n'avaient jusqu'à présent jamais été retrouvés dans les rhums. Ce travail facilite l'étude suivante qui consiste à déterminer les composés présents dans les distillats après des fermentations en présence de bactéries sélectionnées.

### **III-2.2.2. Etude de la composition des distillats après des fermentations mixtes.**

Nous avons réalisé des extractions sur les distillats obtenus après fermentations mixtes. Les conséquences de l'introduction de chaque bactérie ont été évaluées en comparant la composition de ces différents distillats. L'analyse des extraits en chromatographie en phase gazeuse a fait apparaître environ 350 pics différents par chromatogramme. Parmi ces 350 pics, 45 correspondent à des composés qui étaient absents des distillats obtenus après fermentations strictement levuriennes (Tableaux 31, 32 et 33). Dans cette partie, nous traiterons exclusivement des composés nouvellement identifiés. Certains sont présents dans tous les distillats étudiés. D'autres ne sont présents que dans le cas de fermentations avec des souches particulières.

#### **III-2.2.2.1. Les composés nouvellement identifiés.**

##### **- Les alcools aliphatiques (tableau 31).**

Neuf alcools aliphatiques supplémentaires ont été identifiés. Le **butan-2-ol** est présent à l'état de traces dans les extraits. La présence de ce composé en grande quantité dans les distillats est généralement le signe pour les industriels d'un accident de fermentation. Nous avons remarqué que le développement des différentes bactéries testées en fermentation n'est jamais accompagné d'une teneur importante de ce composé. Ces bactéries forment donc très

	indices de rétention	
	colonne polaire	colonne apolaire
Alcools		
butan-2-ol	1025	610
2-méthyl-3-pentanol	1155	-
hexan-2-ol	1201	790
3-méthyl-3-buten-1-ol	1251	-
heptan-4-ol	1287	882
cis-4-hepten-2-ol	1346	-
octan-3-ol	1398	-
levo-2,3-butanediol	1545	-
meso-2,3-butanediol	1582	-
Dérivés terpéniques		
cis-oxyde de linalol	1445	1074
trans-oxyde de linalol	1473	1085
époxyllinalol	1767	-
gamma-isogéranol	1791	-
isogéranol	1817	-
acétate de farnésyle	2005	-

Tableau 31 : alcools et dérivés terpéniques identifiés après une fermentation mixte

peu de butan-2-ol. Le butan-2-ol est formé depuis la forme *meso*- du 2,3-butanediol (Nykänen et al., 1983).

Deux formes de **2,3-butanediol** ont par ailleurs été identifiées. Ce sont les formes *méso*- et *lévo*- du 2,3-butanediol. Le 2,3-butanediol est un intermédiaire de la formation du 3-hydroxy-2-butanone (ou acétoïne) et du 2,3-butanedione. L'acétoïne est également présent dans ces extraits et le 2,3-butanedione a été identifié dans la mélasse.

Le **cis-4-hepten-2-ol** retrouvé dans les distillats peut provenir de l'acide octanoïque. C'est le cas également de l'heptan-2-one et du pentan-2-one (Tressl et al. cités par Crouzet, 1992). La présence du cis-4-hepten-2-ol dans les distillats témoigne une fois de plus de l'importance du métabolisme lipidique qui est à l'origine de nombreux composés volatils.

Nous avons identifié l'**heptan-4-ol** (figure 42) ainsi que la cétone correspondante, l'**heptan-4-one**. La présence de ces deux composés dans les rhums n'avait encore jamais été mentionnée jusqu'à présent.

#### - Les dérivés terpéniques.

Six nouveaux dérivés terpéniques ont été identifiés. Parmi ceux-ci, quatre n'ont jamais été mis en évidence dans les rhums. Il s'agit du **gamma-isogéranol** (figure 43), de l'**isogéranol** (figure 44), d'un **époxylinolol** (figure 45) et de l'**acétate de cis,cis-farnésyle** (figure 46). Ces quatre composés sont présents uniquement dans les distillats issus des fermentations en présence de *Clostridium* ou du *Propionibacterium*. Le gamma-isogéranol et l'isogéranol sont deux isomères du géranol. Ils ont été détectés dans les distillats qui contiennent de relativement grandes quantités de géranol.

L'acétate de farnésyle a été identifié après l'étude de l'espace de tête d'un vin de fermentation mixte. Il provient d'une réaction d'estérification du farnésol, présent en relativement grande quantité dans tous les distillats.

L'époxylinolol est un précurseur naturel des **oxydes de linalol** (Winterhalter, 1991). Nous avons effectivement identifié dans les extraits deux oxydes de linalol qui semblent être les formes furannoïdes d'oxyde de linalol. Cette hypothèse repose sur l'interprétation de leur indice de rétention.

Figure 42 : Spectre de masse du heptan-4-ol.

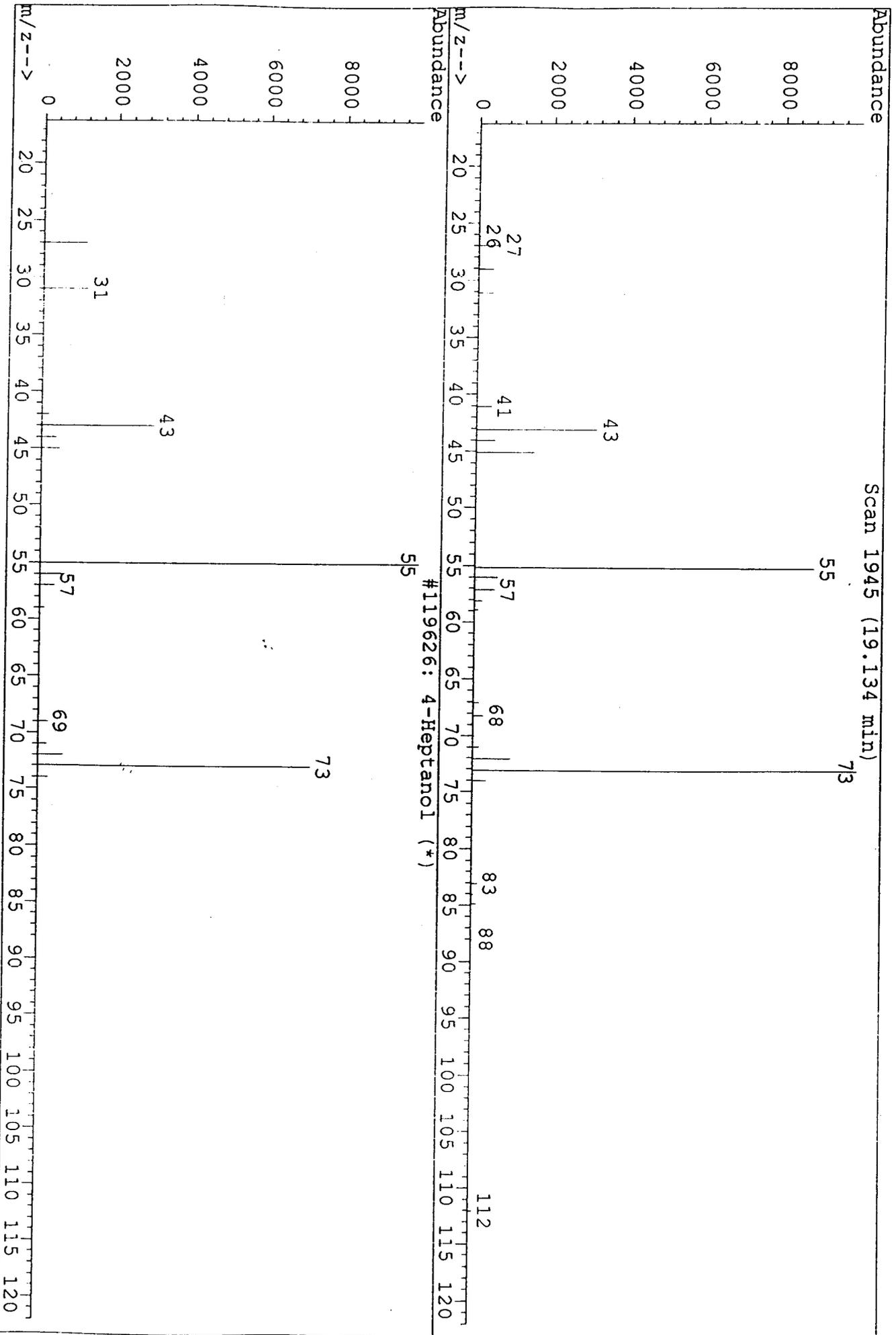


Figure 43 : Spectre de masse du gamma-isogéraniol.

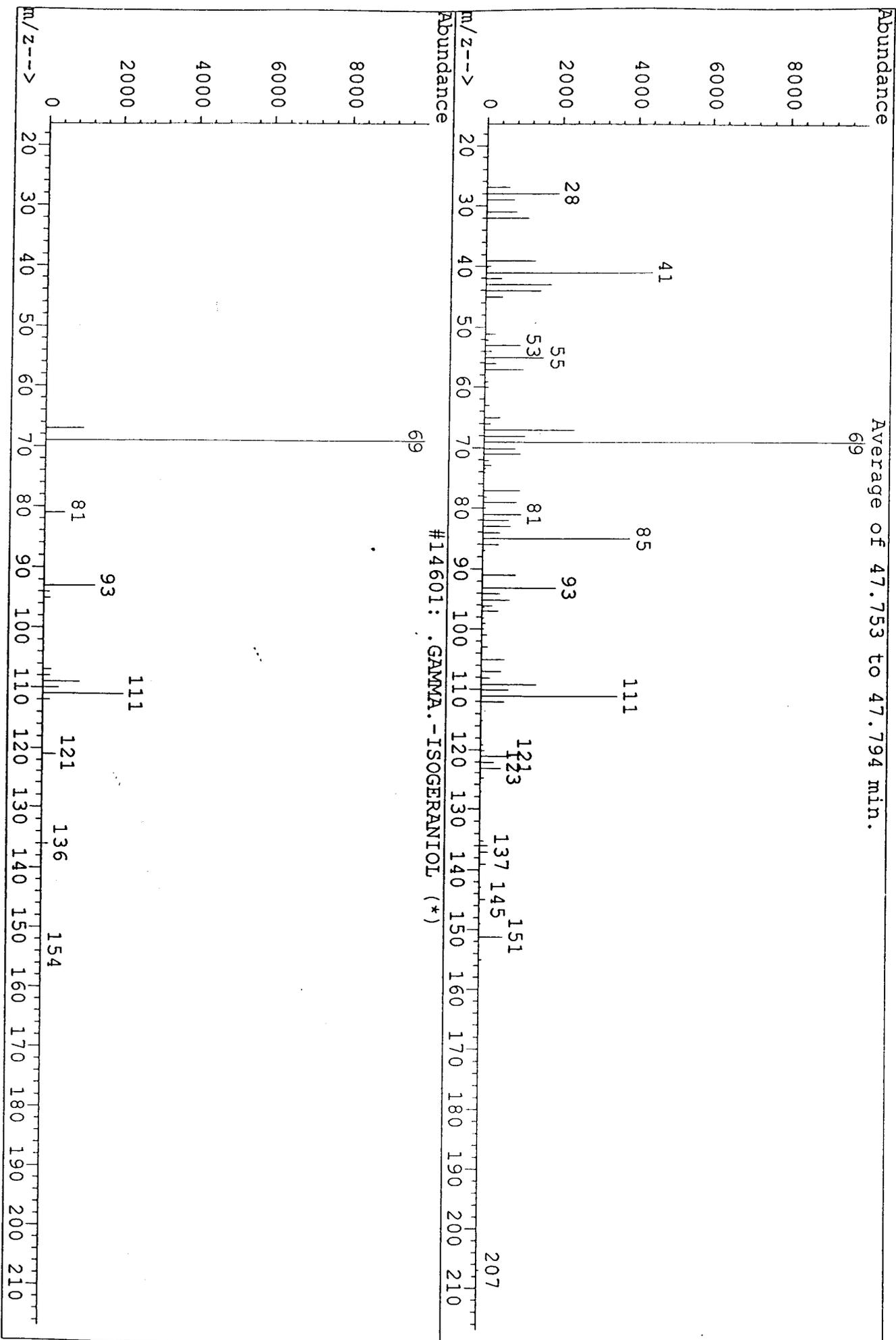


Figure 44 : Spectre de masse de l'isogéranol.

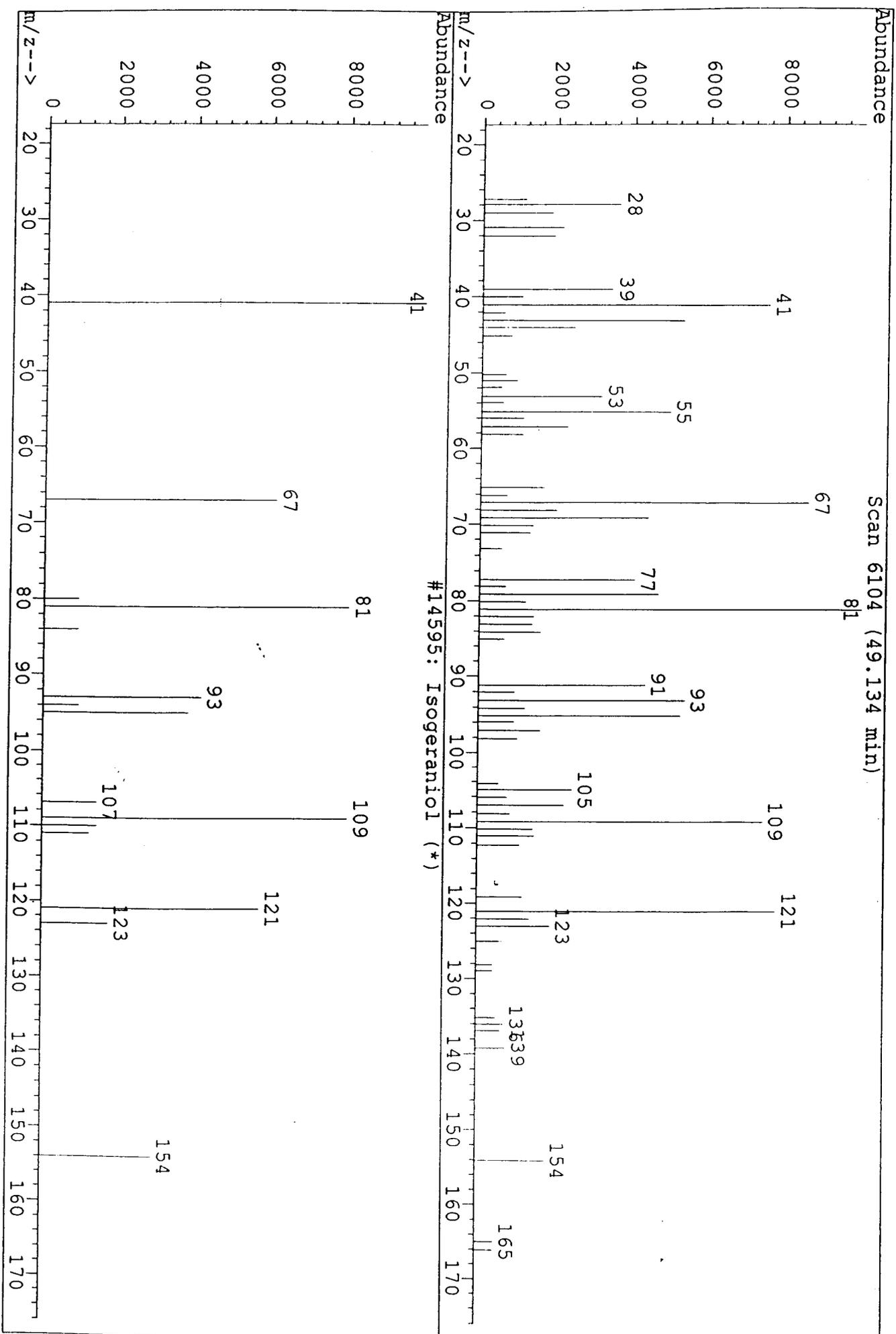


Figure 45 : Spectre de masse de l'époxylinalol.

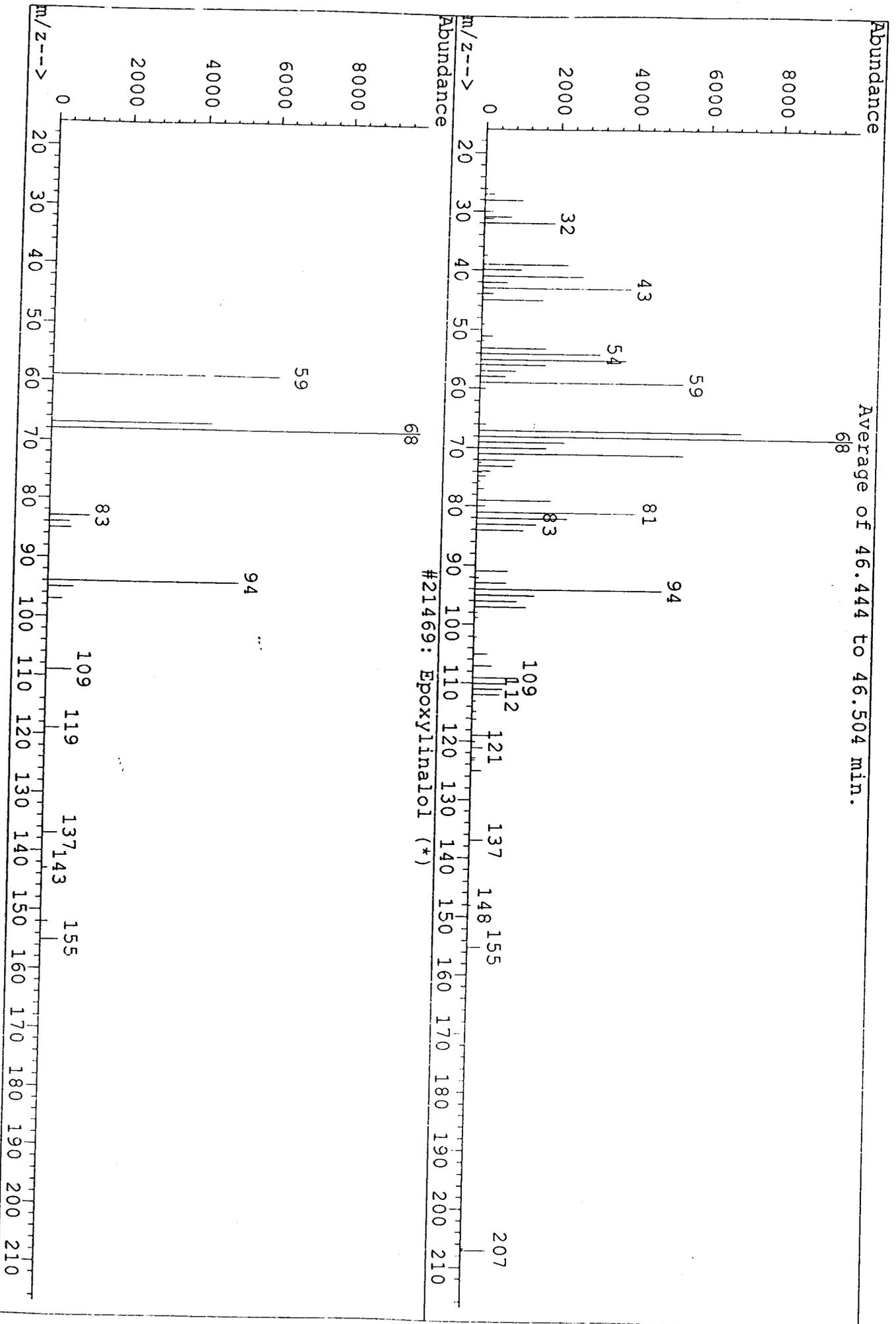
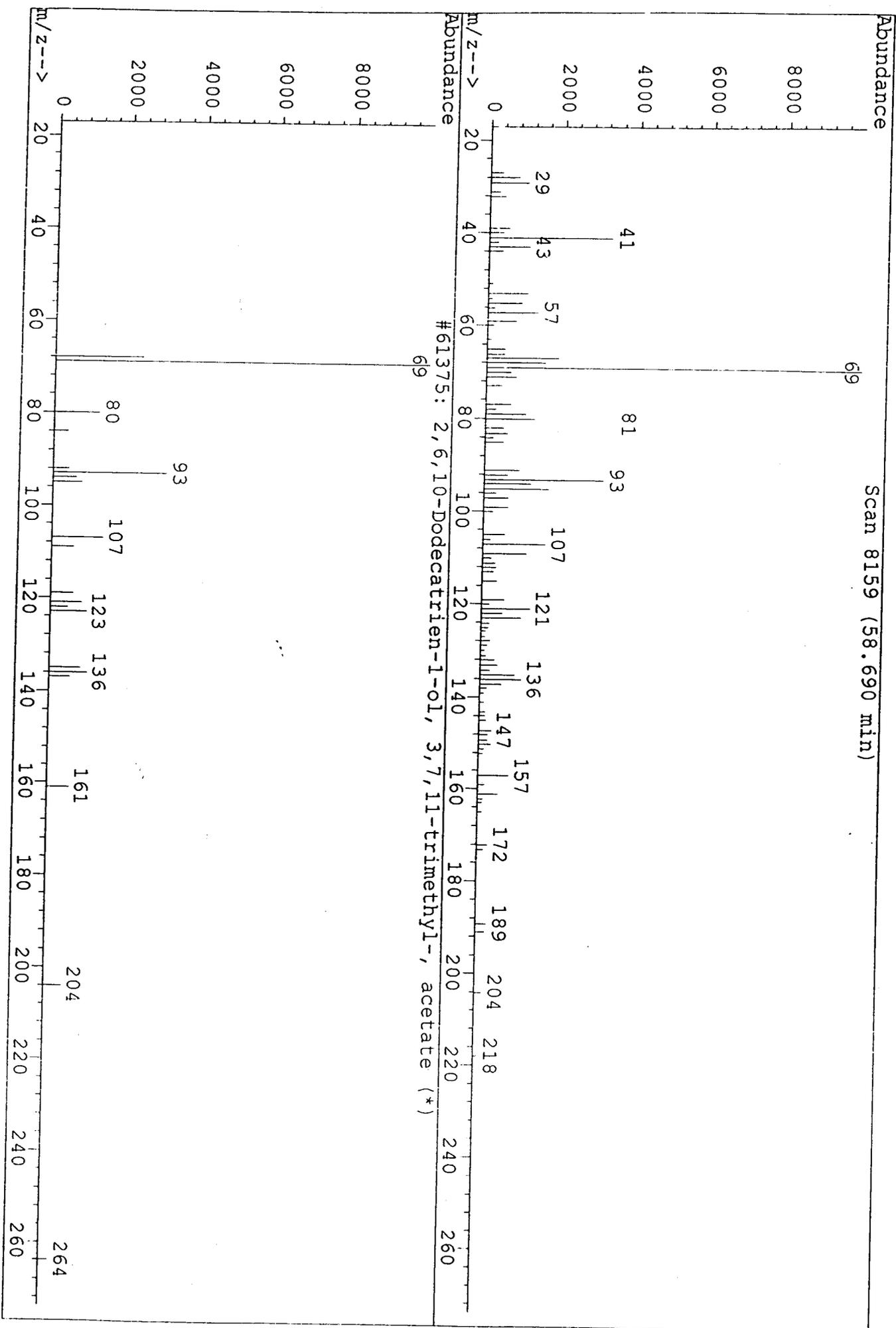


Figure 46 : Spectre de masse de l'acétate de farnésyle.



### - Les cétones (Tableau 32).

Douze nouvelles cétones ont été identifiées. Les bactéries testées ont une activité cétogène plus intense que les levures. Une grande partie de ces cétones sont réduites par la suite en alcools. Ceci explique que les alcools secondaires soient présents dans les distillats obtenus après fermentations mixtes dans des proportions relatives plus importantes qu'après une fermentation levurienne.

La présence du **3-hydroxy-2-butanone** ou acétoïne est généralement associée aux fermentations mixtes en présence de *Clostridium*. L'acétoïne et le butanediol peuvent provenir de l'acide alpha-cétovalérique. Cet acide est également un produit intermédiaire de la synthèse de la valine. Nous avons constaté la présence de l'acétoïne et du butanediol exclusivement dans les distillats provenant d'une fermentation mixte.

Nous avons également relevé la présence dans les distillats issus de fermentations mixtes du **dihydroédulan I**, du **dihydroédulan II** et de l'**édulan I**. D'après de Smedt et al. (1980), l'édulan I provient de la dégradation des caroténoïdes. Nous pensons que c'est le cas également du dihydroédulan I (figure 47) et du dihydroédulan II (figure 48). Ces deux derniers n'ont auparavant jamais été signalés dans les rhums.

### - Les esters.

Onze nouveaux esters ont été identifiés dans les distillats provenant d'une fermentation mixte. Ces onze esters ne sont présents que dans les distillats obtenus après fermentation avec des *Clostridium*. Leur présence traduit une importante activité d'estérification chez ces bactéries. Les principaux nouveaux esters identifiés proviennent de réactions entre les alcools supérieurs et des acides gras présents dans le milieu.

### - Autres composés identifiés (Tableau 33).

Sept autres composés chimiques supplémentaires ont été identifiés dans les distillats. Le **1,1,3-triéthoxy-propane** n'a été identifié qu'après une fermentation en présence de *Clostridium*. Cet acétal provient de la réaction entre le 1-propèn-2-ol (ou alcool allylique) et

	indices de rétention	
	colonne polaire	colonne apolaire
<b>Cétones</b>		
heptan-4-one	1125	832
octan-3-one	1141	-
heptan-2-one	1182	875
octan-2-one	1286	995
3-hydroxy-2-butanone	1291	-
nonan-2-one	1389	1097
dihydroédulan II	1492	-
dihydroédulan I	1519	-
édulan I	1610	-
1-phényl-2-propanone	1725	-
1-(2-hydroxyphényl)-éthanone	1794	-
1-(4-méthoxyphényl)-éthanone	2132	-
<b>Esters</b>		
2-méthyl-propionate d'éthyle	946	753
acétate de 1-méthylpropyle	986	-
propionate de propyle	1044	742
2-méthyl-butyrates d'éthyle	1053	841
3-méthyl-butyrates d'éthyle	1069	845
acétate de butyle	1071	803
butyrates de propyle	1125	891
butyrates de butyle	1219	985
butyrates de 3-méthylbutyle	1268	1028
4-hepténoate d'éthyle	1373	-
benzoate de méthyle	1618	1085

Tableau 32 : Cétones et esters identifiés après une fermentation mixte

Figure 47 : Spectre de masse du dihydroédulan I.

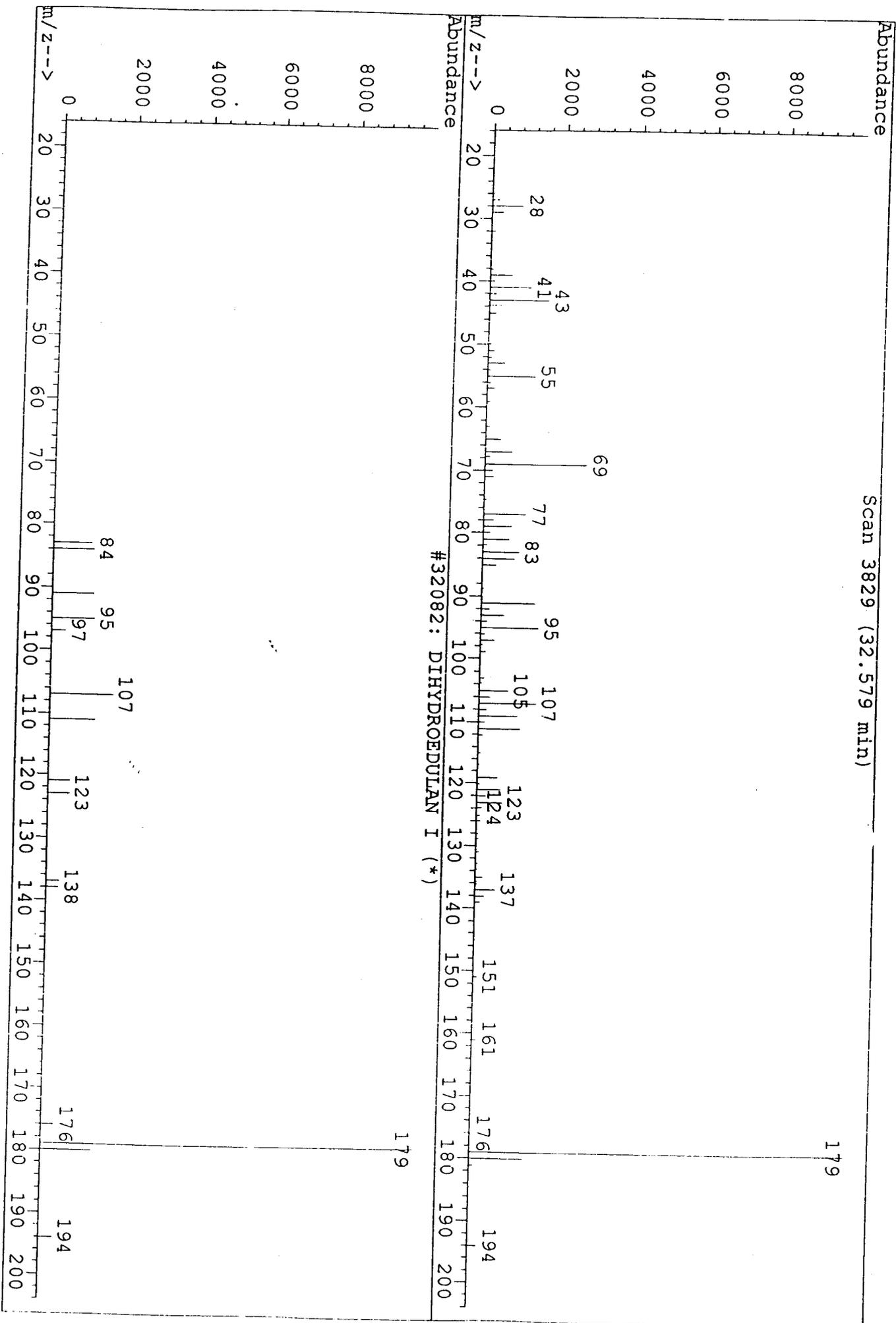
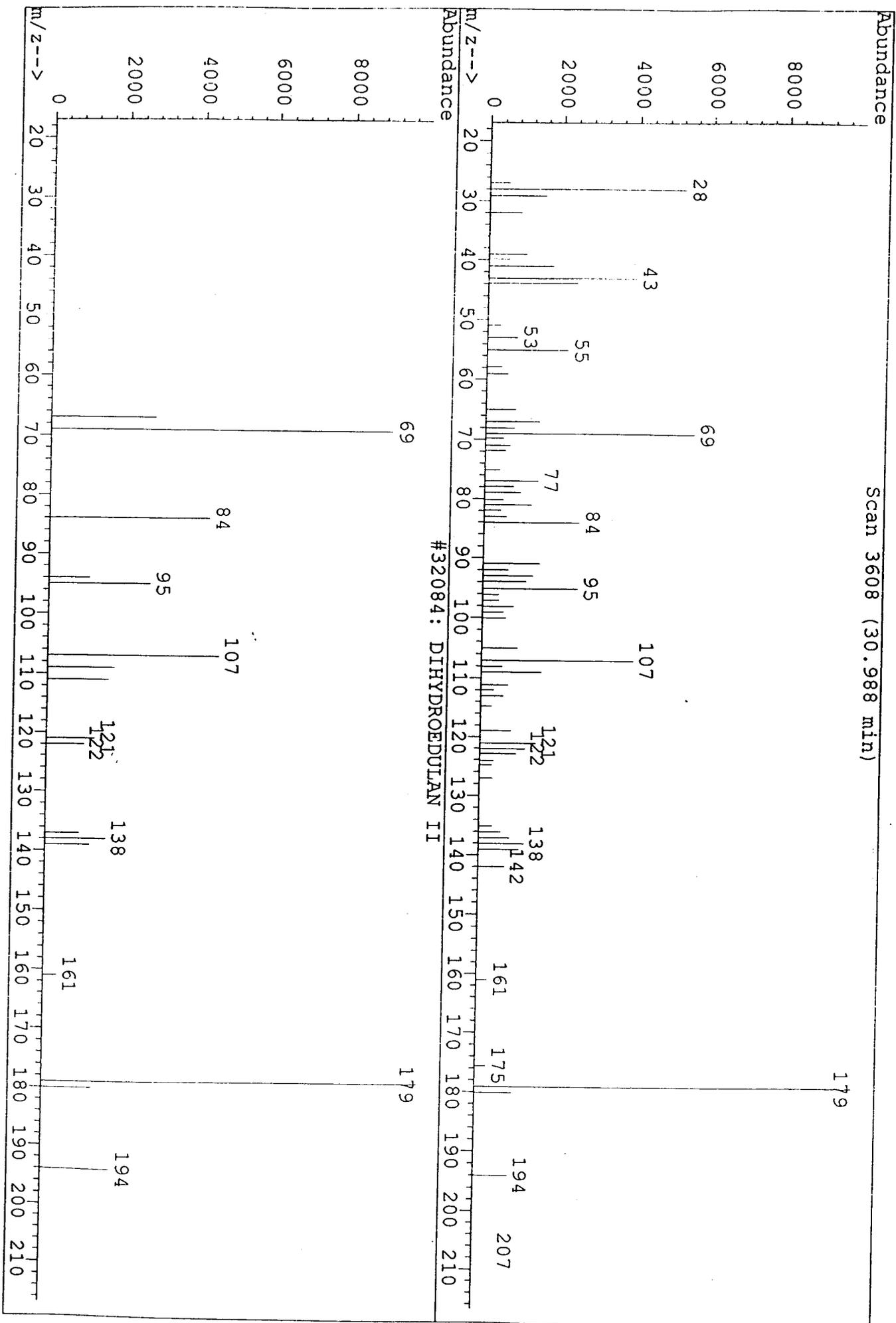


Figure 48 : Spectre de masse du dihydroédulan II.



	indices de rétention	
	colonne polaire	colonne apolaire
1-méthyl-3-propyl-cyclohexane	1022	-
butyl-cyclohexane	1082	-
trans-décahydro-naphthalène	1158	-
dl-limonène	1195	1036
1,1,3-triéthoxy-propane	1308	-
2-méthyl-benzofurane	1590	-

Tableau 33 : divers composés identifiés après une fermentation mixte

l'éthanal (De Smedt et al., 1976). Ceci nous amène à supposer que l'alcool allylique a été synthétisé pendant la fermentation en présence des *Clostridium*. Le caractère apolaire du solvant explique que l'alcool allylique n'ait pas été retrouvé lors de l'analyse de la composition des extraits.

\*

Cette étude de la composition des distillats nous a permis de mettre en évidence des différences de composition entre les distillats issus de fermentations levuriennes pures et les distillats issus de fermentations mixtes. L'activité bactérienne se traduit par la synthèse de composés chimiques normalement absents des distillats obtenus après des fermentations exclusivement levuriennes. Ces composés synthétisés sont l'expression d'un matériel enzymatique différent chez les levures et chez les bactéries. Seuls les *Clostridium* se distinguent des autres genres de bactéries par la synthèse d'esters particuliers. Nous avons donc étudié les proportions relatives d'un certain nombre de composés chimiques afin de différencier les bactéries entre elles. Le raisonnement employé pour le choix des composés et pour le calcul de leur proportion relative est indiqué dans le chapitre Matériels et Méthodes.

#### **III-2.2.2.2. Etude des proportions relatives de quelques composés communs à toutes les fermentations : recherche de critères de différenciation des micro-organismes.**

Les premiers essais de fermentations mixtes ont été réalisés en introduisant les bactéries 48 heures avant les levures de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*. Nous avons pu constater que les bactéries se sont bien développées dans tous les cas. Le travail portant sur l'étude de la composition des distillats nous a fourni des premiers résultats sur l'impact de chaque bactérie. Cependant les souches de *Saccharomyces* présentent « l'inconvénient », pour ce type d'étude, d'avoir une fermentation rapide même en présence des bactéries. Les variations des proportions relatives des différents composés étudiés sont demeurées assez faibles et l'impact bactérien s'est traduit uniquement par la synthèse de composés nouveaux. Dans nos conditions

de travail, l'impact bactérien lors d'une fermentation mixte avec les *Saccharomyces cerevisiae* est donc limité. Des essais de fermentations mixtes avec le *Schizosaccharomyces pombe* ont été menés par la suite. Nous avons constaté que les variations des proportions relatives des différents composés étudiés étaient alors plus importantes. La vitesse de fermentation relativement faible de cette levure a permis de mesurer plus facilement l'impact des différentes bactéries.

Dans cette étude nous avons pris en compte uniquement les fermentations mixtes avec la levure *Schizosaccharomyces pombe*.

L'étude porte sur 31 composés, parmi lesquels certains proviennent directement de la mélasse et d'autres sont en partie synthétisés pendant la fermentation.

#### - Les esters éthyliques (figure 49 et 50).

Les esters éthyliques étudiés sont les mêmes que pour l'étude menée sur les levures. Cependant, nous avons ajouté à cette liste le propionate d'éthyle et le butyrate d'éthyle. L'impact bactérien se traduit par une diminution des proportions relatives des esters lourds (esters possédant un nombre d'atomes de carbone supérieur à 14) et une augmentation de celles des esters plus légers. Les souches de *Clostridium* se caractérisent par une production importante de butyrate d'éthyle et une hausse de la quantité relative d'hexanoate d'éthyle, d'octanoate d'éthyle et de décanoate d'éthyle. Le butyrate d'éthyle provient de l'estérification de l'acide butyrique synthétisé par les *Clostridium* lors de la fermentation butyrique. La souche de *Propionibacterium* produit du propionate d'éthyle par la voie de la fermentation propionique. Le propionate d'éthyle est formé depuis le pyruvate qui conduit au propionyl-CoA puis au propionate d'éthyle. Ce dernier peut provenir à la fois du glucose ou du lactate (figure 51).

Les esters éthyliques représentent chez les bactéries aérobies du genre *Acetobacter* et *Bacillus* une proportion importante de l'extrait.

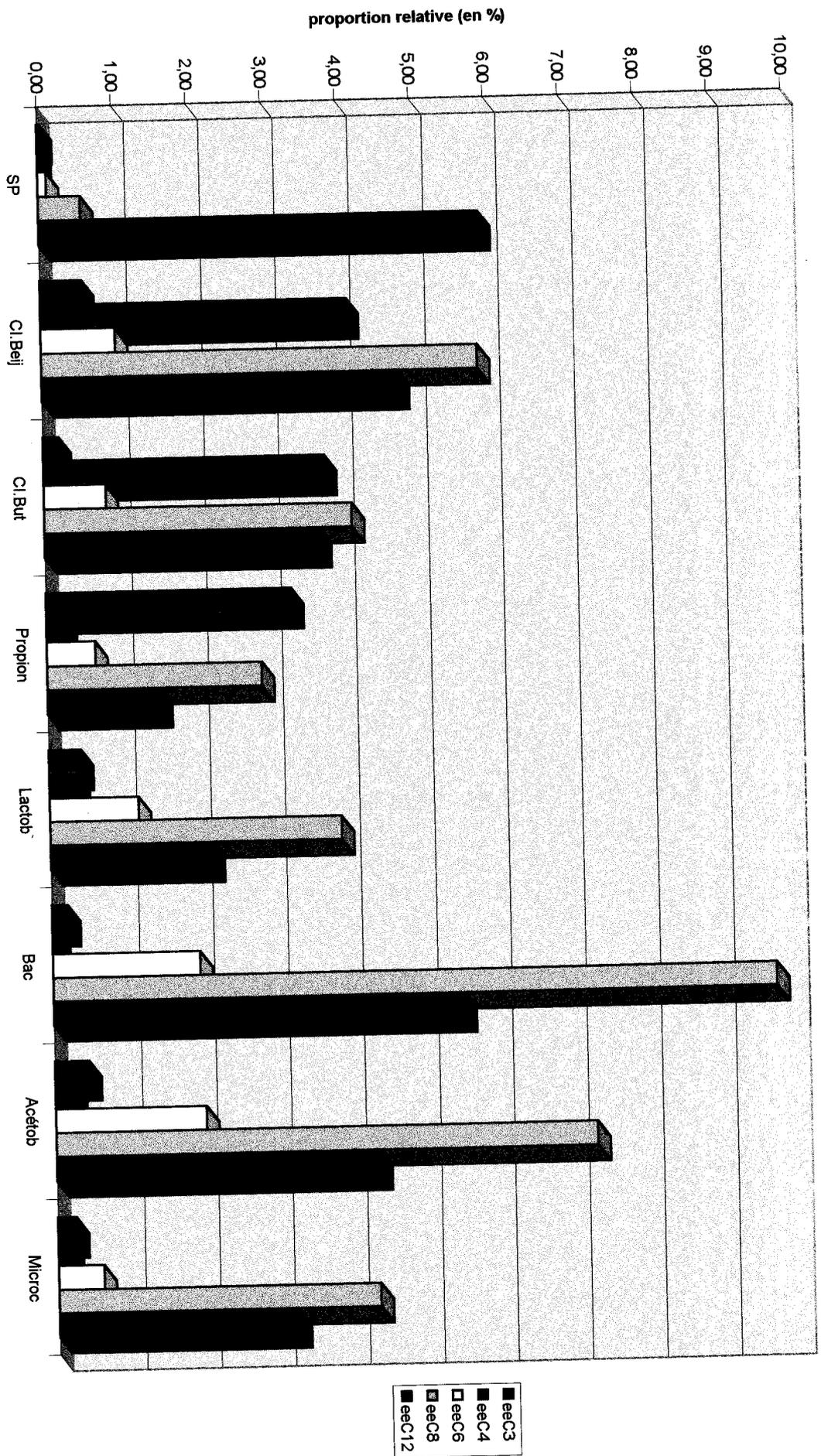


Figure 49 : Proportions relatives de quelques esters éthyliques

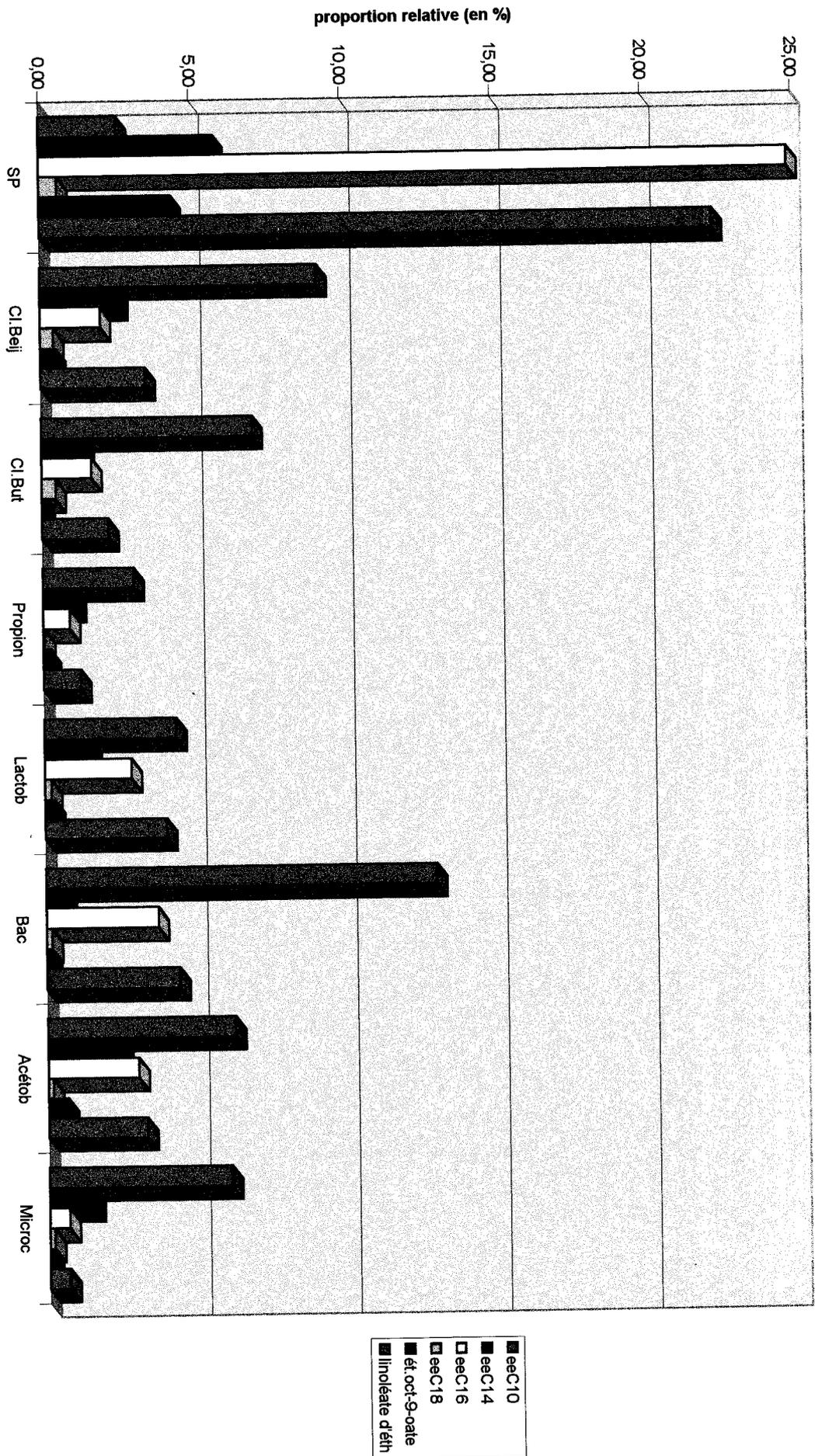
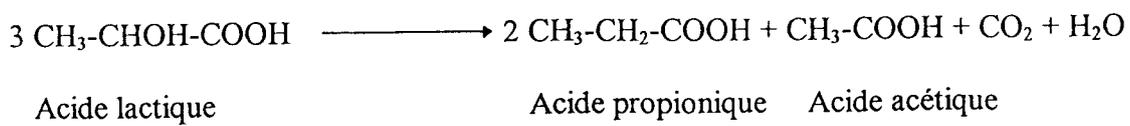
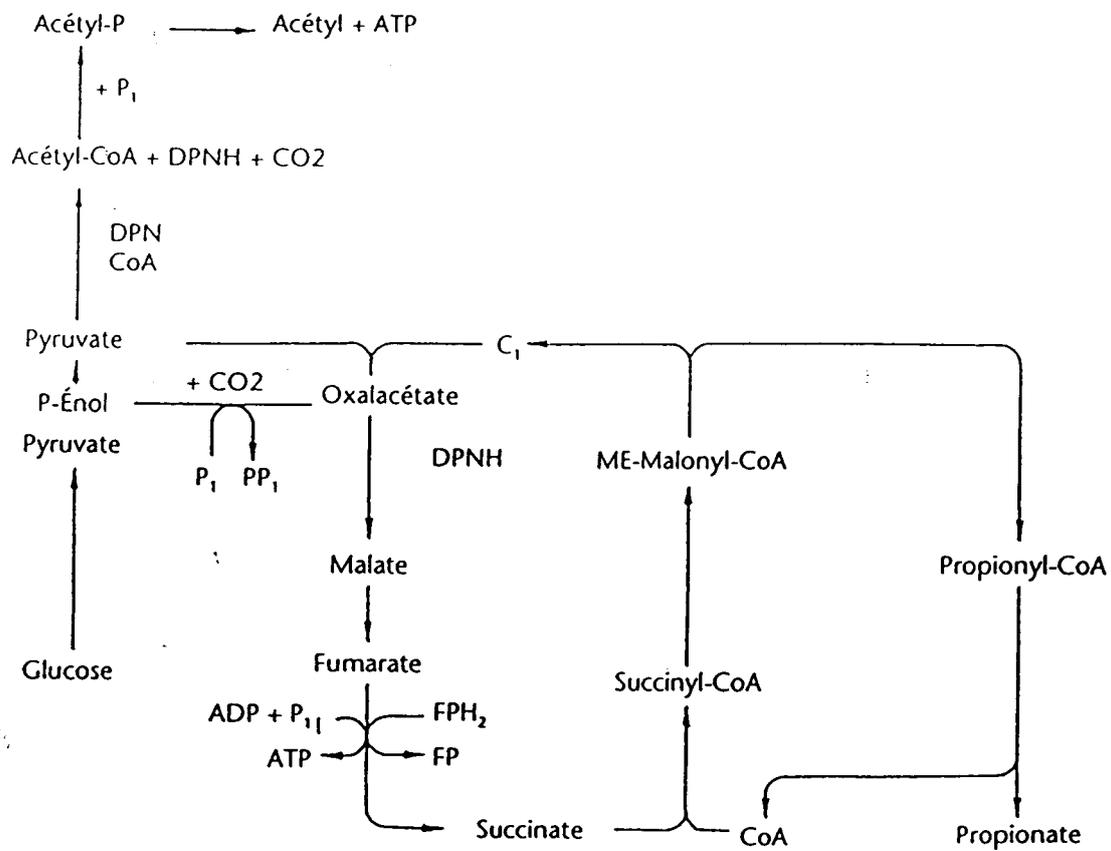


Figure 50 : Proportions relatives de quelques esters éthyliques



**Figure 51 : Fermentation propionique.**

### - Les acides gras saturés (figure 52).

Les *Clostridium* se distinguent par une synthèse importante d'acide butyrique. Cette synthèse se fait en plusieurs étapes (figure 53). Le béta-hydroxybutyryl-CoA est formé depuis l'acétoacétyl-CoA. Le béta-hydroxybutyryl-CoA conduit au crotonyl-CoA puis au butyryl-CoA. Le butyryl-CoA est alors transformé en acide butyrique par transfert du CoA vers un acétate et après addition de H<sub>2</sub>O. Le butyryl-CoA conduit également au butan-1-ol par le biais de la fermentation butanolique qu'effectuent les bactéries de l'espèce *Clostridium beijenckii*.

Nous avons relevé dans les extraits issus de fermentations par les bactéries aérobies du genre *Acetobacter* et *Micrococcus*, des acides gras en proportions importantes. Ce résultat confirme le caractère acidifiant de ces bactéries.

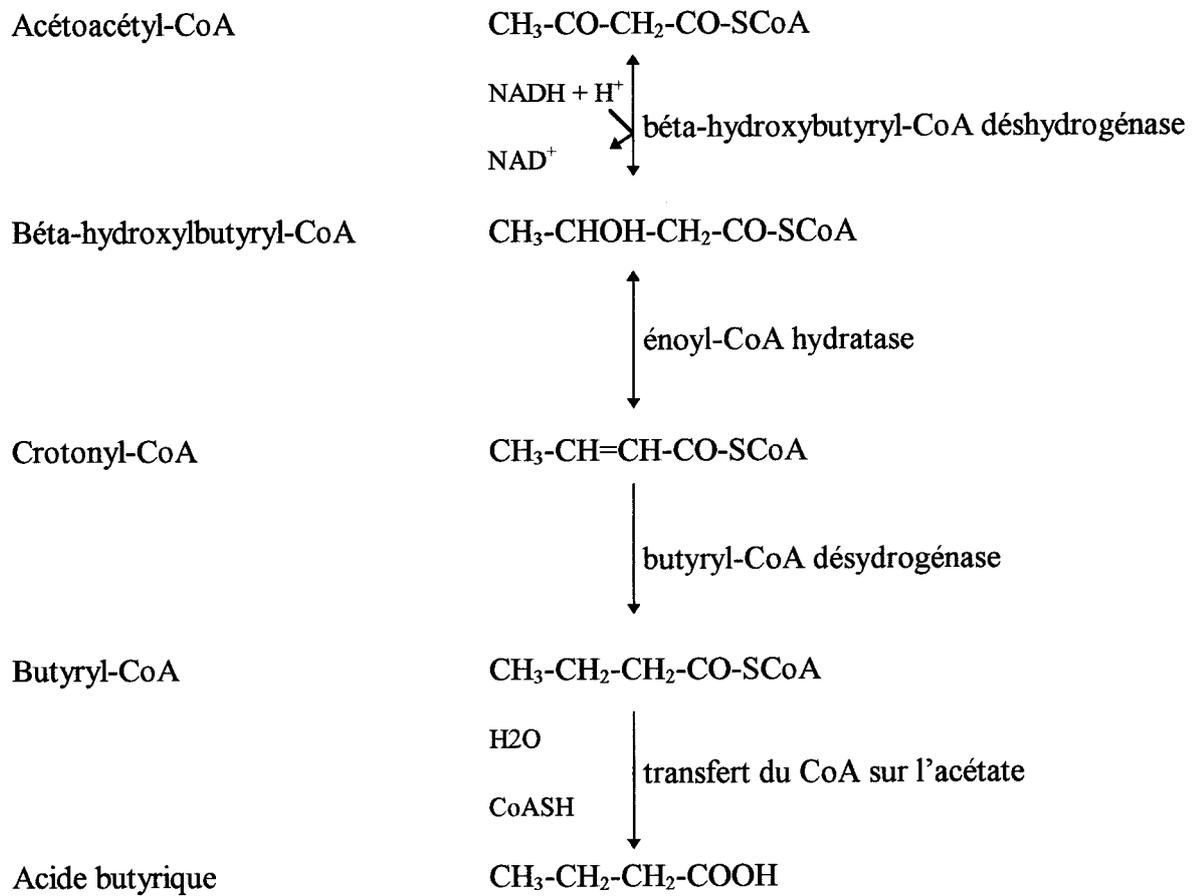
Les bactéries étudiées sont dans l'ensemble à l'origine d'une production plus importante d'acides gras que les levures *Schizosaccharomyces pombe* et *Saccharomyces cerevisiae*. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus lors de l'étude de l'acidité des vins des fermentations mixtes.

### - Les composés provenant de la dégradation des acides cinnamiques substitués (figures 54 et 55).

D'une manière générale, on observe en présence des bactéries une hausse des proportions relatives des composés issus de la dégradation des acides cinnamiques substitués. La modification la plus importante, par rapport à une fermentation levurienne avec un *Schizosaccharomyces pombe*, concerne la production d'éthyl-4-phénol par les bactéries *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus pentosus* et *Propionibacterium jensenii*. L'éthyl-4-phénol est formé à partir de l'acide cinnamique (figure 56). L'intermédiaire formé est l'acide phénylpropionique chez les *Lactobacillus* et l'éthényl-4-phénol chez les *Bacillus*. Pour ces quatre souches de bactéries, l'éthyl-4-phénol constitue le pic principal des extraits. L'éthyl-4-phénol a un faible seuil de perception et dégage une odeur phénolique.



Figure 52 : Proportions relatives de quelques acides gras



**Figure 53 : Fermentation butyrique par les *Clostridium* butyriques.**

Figure 54 : Proportions relatives de quelques composés issus de la dégradation des acides cinnamiques substitués

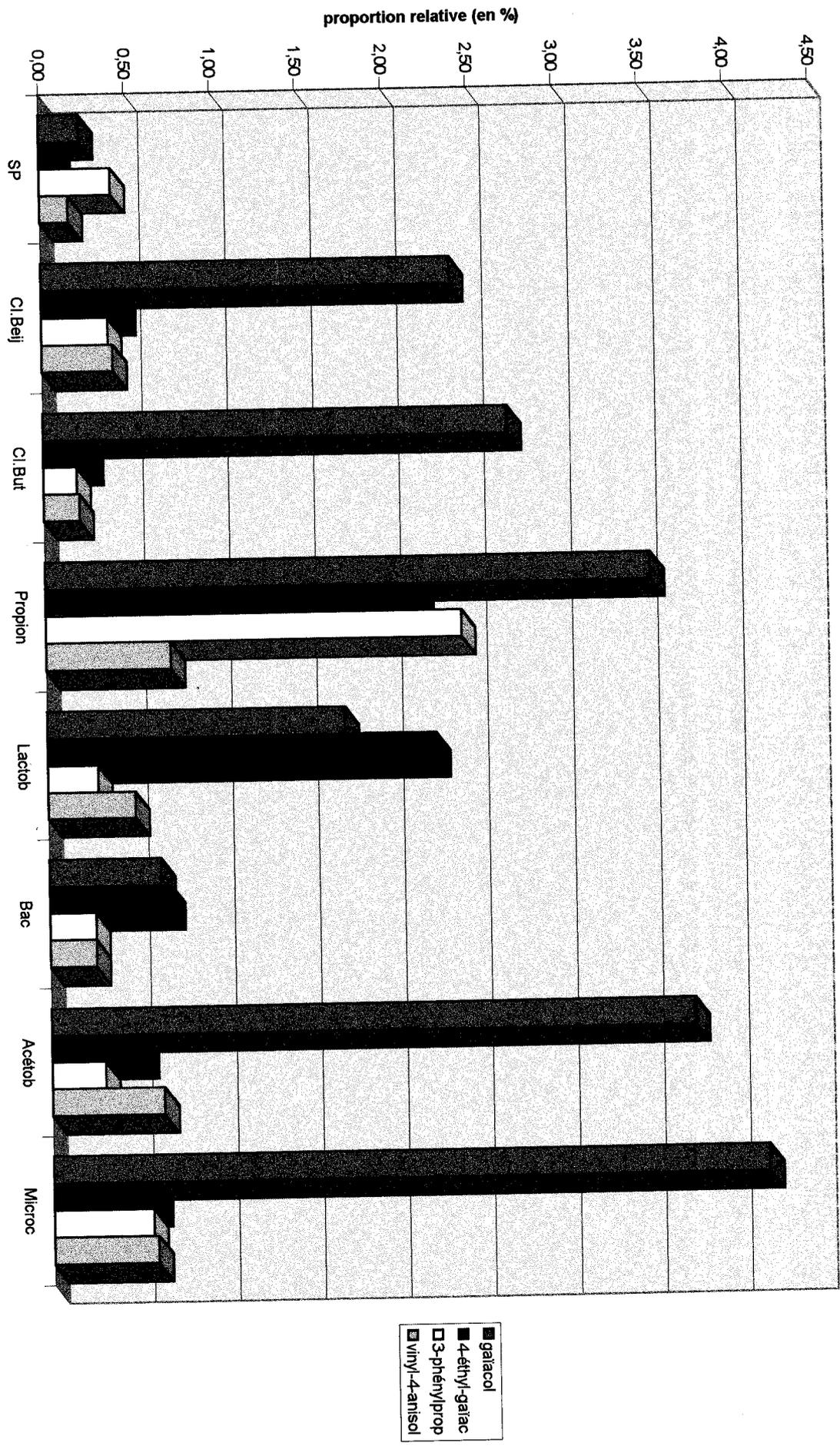
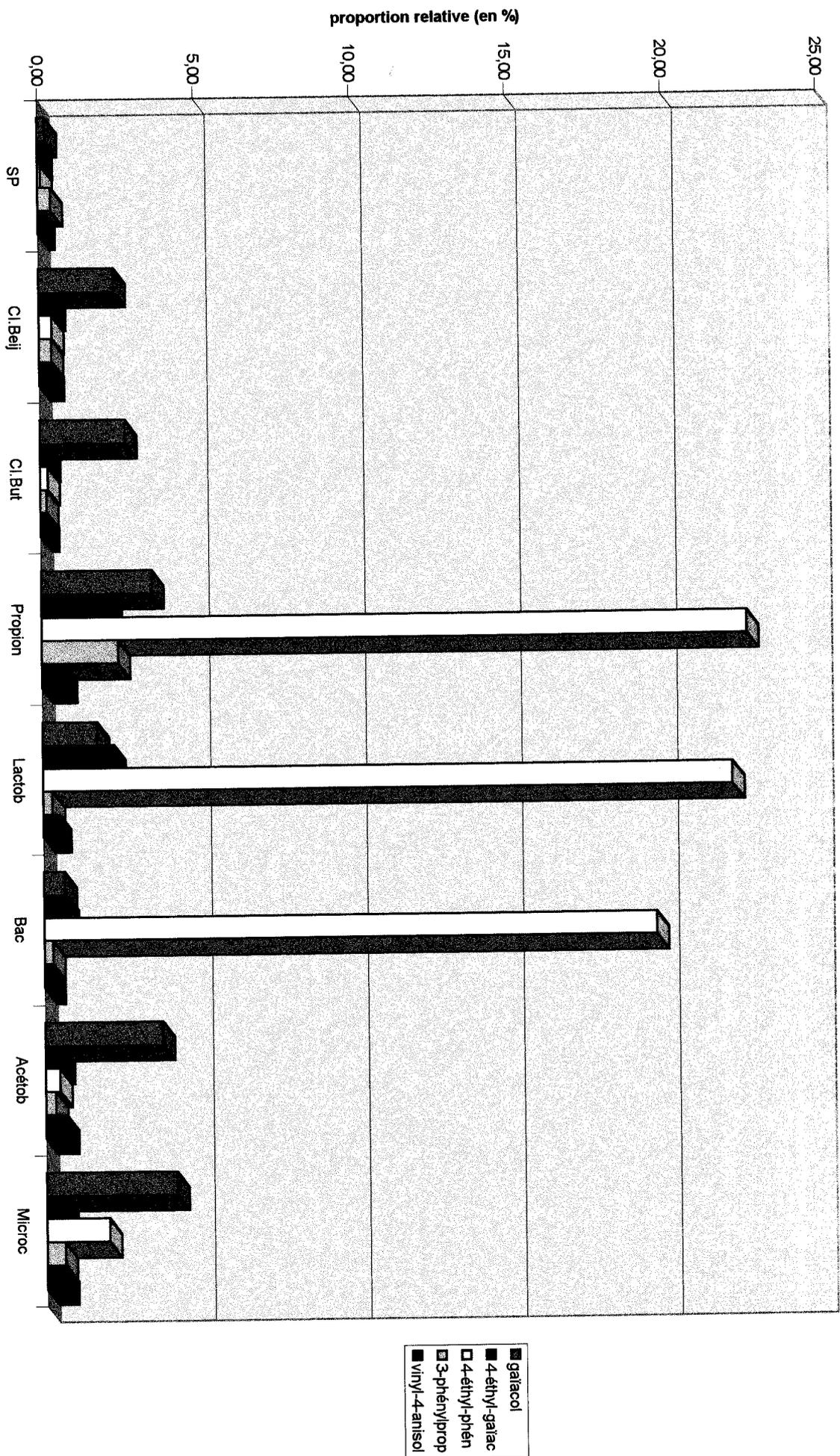
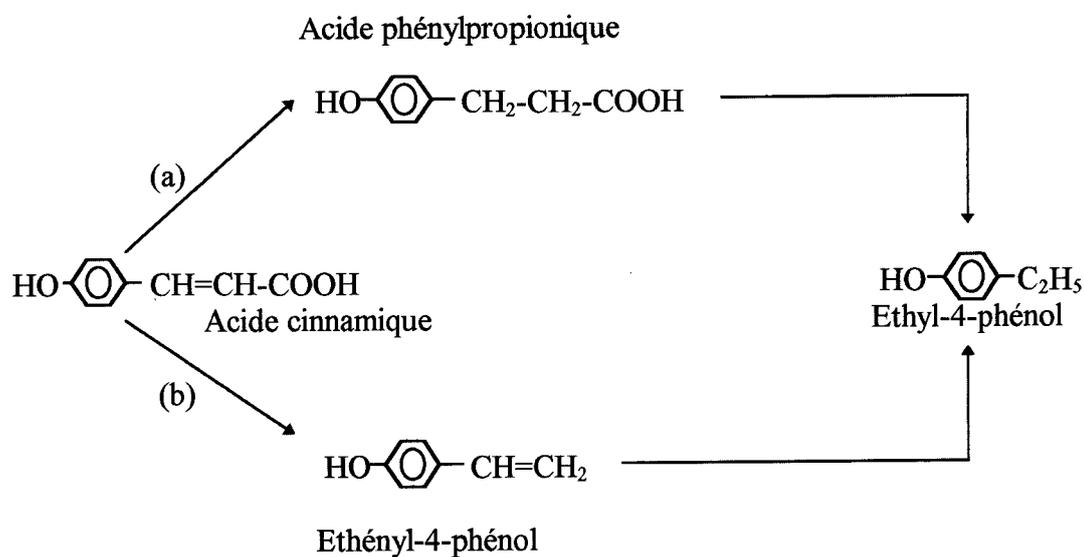


Figure 55 : Proportions relatives de dérivés des acides cinnamiques substitués





(a) : voie empruntée par les *Lactobacillus* (Whiting et Carr, 1957-59).

(b) : voie empruntée par les *Bacillus* (Indhal et Scheline, 1968).

**Figure 56 : Formation de l'éthyl-4-phénol à partir de l'acide cinnamique.**

La présence des bactéries dans le milieu de fermentation se traduit dans tous les cas par une augmentation de la proportion de gaïacol, excepté dans le cas du *Bacillus subtilis* pour lequel la différence observée n'est pas très significative. La souche de *Propionibacterium* est la seule bactérie pour laquelle on observe une augmentation de l'importance relative du 3-phénylpropionate. Nous avons remarqué également que les *Lactobacillus* et le *Propionibacterium* produisent de l'éthyl-4-gaïacol.

Toutes ces modifications liées au développement des bactéries indiquent la présence en relativement grande quantité d'acide cinnamique et de ses dérivés dans la mélasse.

#### **- Le lactate d'éthyle, l'heptan-2-ol et le benzoate d'éthyle (figure 57).**

Les *Lactobacillus* ont la capacité de dégrader le glucose en acide lactique par la voie de la fermentation lactique. La présence de lactate d'éthyle en proportion importante est le signe d'un développement des *Lactobacillus* pendant la fermentation. Les *Lactobacillus* étudiés sont hétérofermentaires, ce qui explique l'augmentation simultanée des quantités de lactate d'éthyle et d'acétate d'éthyle pendant la fermentation. Nous avons observé par ailleurs chez les *Lactobacillus* une augmentation de l'importance relative du benzoate d'éthyle.

Nous avons systématiquement observé le caractère cétogène des bactéries. Cette propriété se traduit par la présence dans les distillats de nombreuses cétones secondaires mais également des alcools secondaires issus de la réduction de ces cétones.

#### **- Les terpénols, les alcools cycliques et la bêta-damascénone (figure 58 et 59).**

Les variations des proportions relatives du géraniol et du menthol en fonction des bactéries utilisées confirment le résultat sur l'étude des précurseurs d'arômes. Nous avons vu, lors de l'étude de la mélasse, qu'une grande partie du géraniol existe sous forme glycosylée. Le géraniol peut être libéré après l'action d'une bêta-glucosidase. Nous avons observé que l'importance relative du géraniol est 10 fois supérieure après une fermentation mixte en présence du *Propionibacterium jensenii* qu'après une fermentation levurienne. Le *Propionibacterium* étudié semble donc posséder une bêta-glucosidase qui soit active dans les conditions de fermentation. Nous avons fait la même constatation en ce qui concerne le menthol. Ce composé doit donc exister sous une forme glycosylée dans la mélasse.

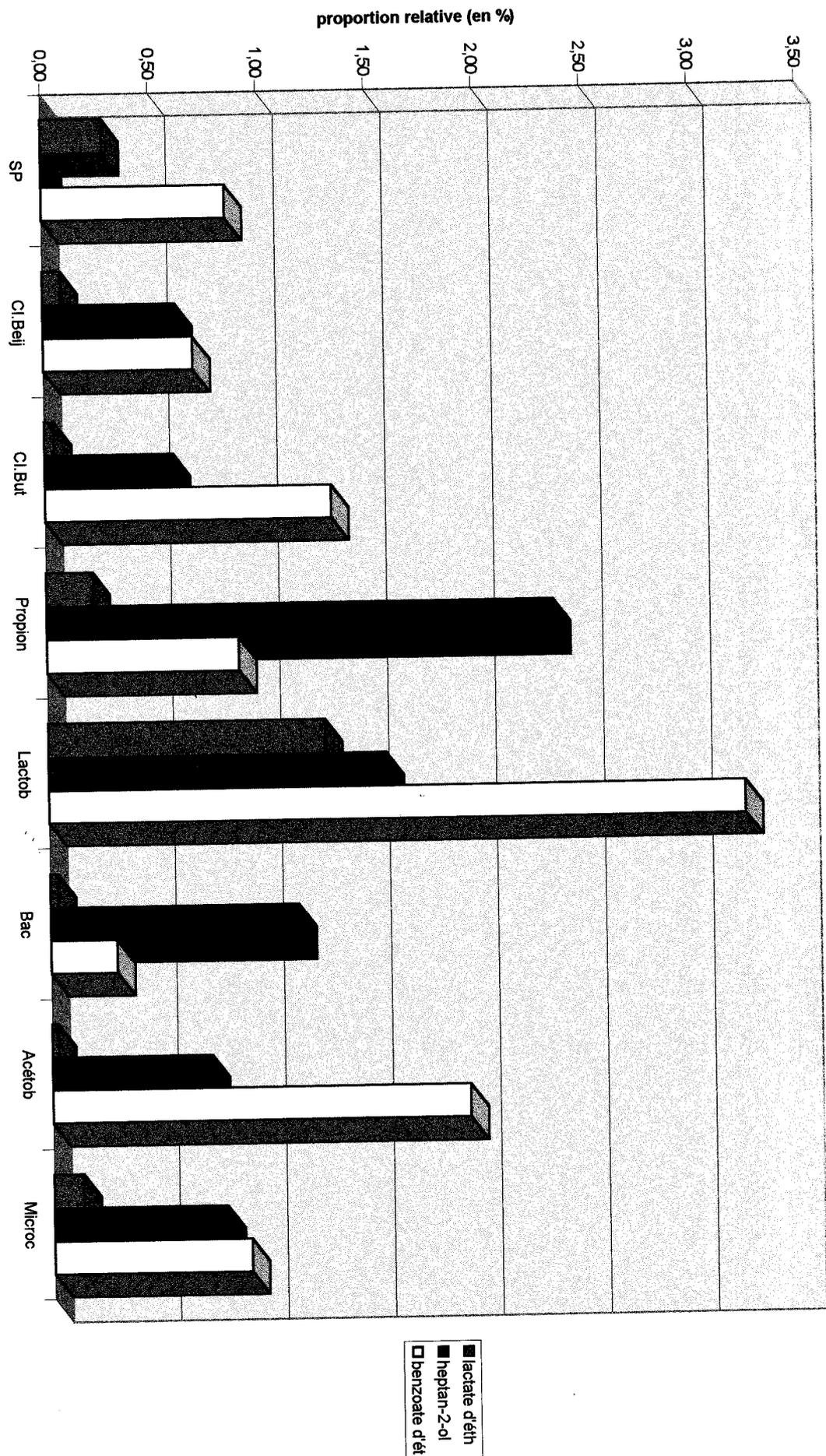


Figure 57 : Proportions relatives de quelques composés aromatiques

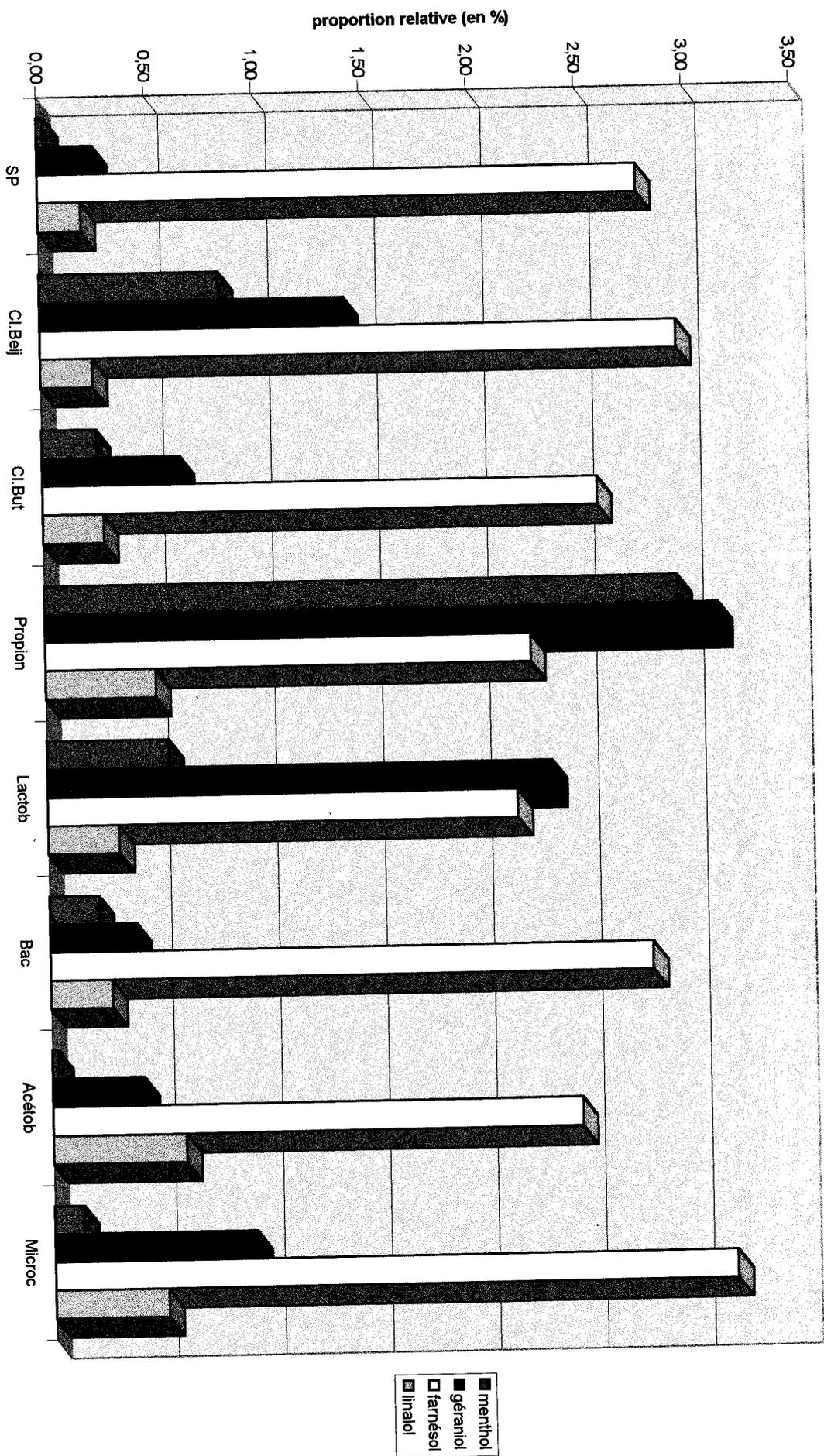


Figure 58 : Proportions relatives de quelques terpénols

Figure 59 : Proportions relatives de quelques composés aromatiques en fonction des micro-organismes



Cette augmentation de l'importance relative des deux terpénols a été observée sur deux autres souches de bactéries : le *Clostridium beijerinckii* et le *Lactobacillus pentosus*. Ces deux bactéries possèdent donc également une bêta-glucosidase active dans les conditions de fermentation utilisées.

L'importance relative des autres terpénols présents dans les distillats ne varie pas de manière significative après l'introduction de bactéries (figure 58).

On observe également une augmentation des proportions relatives du phényl-2-éthanol et de l'alcool benzylique quelle que soit la souche de bactérie introduite.

Les proportions de farnésol et de bêta-damascénone ne varient pas quelle que soit la souche de bactérie introduite en fermentation. Le farnésol n'a pas été identifié dans la mélasse. Il semble donc que le farnésol ne soit produit que par les levures. En revanche, la bêta-damascénone provient de la mélasse et ne subit aucune transformation lors de la fermentation.

\*

L'étude des proportions relatives de certains composés présents dans les distillats obtenus après des fermentations mixtes, permet de mettre en évidence que les voies métaboliques empruntées par les bactéries sont différentes de celles empruntées par les levures pour l'assimilation des nutriments présents dans la mélasse. La diversité des voies métaboliques empruntées permet également de différencier les bactéries entre elles, parfois au sein d'une même espèce. Cette comparaison est facilitée par l'utilisation d'une levure dont le développement est suffisamment lent pour permettre aux bactéries d'influer sur la composition des vins en fin de fermentation. Le tableau 35 résume les différentes particularités de chaque bactérie étudiée.

Bactérie	Effets sur la fermentation
<i>Acetobacter</i>	Augmentation de l'acidité Transformation de l'éthanol en acide acétique
<i>Micrococcus</i>	Augmentation de l'acidité Ralentissement de la fermentation
<i>Bacillus</i>	Augmentation de l'acidité Ralentissement de la fermentation Baisse du rendement Formation d'éthyl-4-phénol
<i>Lactobacillus</i>	Augmentation de l'acidité Ralentissement de la fermentation Baisse du rendement Formation d'acide lactique lors de la <b>fermentation lactique</b> Formation d'éthyl-4-phénol Libération de terpènes glycosylés
<i>Propionibacterium</i>	Augmentation de l'acidité Ralentissement de la fermentation Baisse du rendement Formation de propionate d'éthyle lors de la <b>fermentation propionique</b> Formation d'éthyl-4-phénol Libération de terpènes glycosylés
<i>Clostridium butyricum</i>	Augmentation de l'acidité Ralentissement de la fermentation Formation d'acide butyrique lors de la <b>fermentation butyrique</b> Libération de terpènes glycosylés
<i>Clostridium beijerinckii</i>	Augmentation de l'acidité Ralentissement de la fermentation Formation de butan-1-ol lors de la <b>fermentation butanolique</b> Formation d'acide butyrique lors de la <b>fermentation butyrique</b>

Tableau 34 : Récapitulatif des conséquences de l'introduction des bactéries dans le milieu de fermentation

## Conclusion.

L'étude menée sur les différentes fermentations a été effectuée en plusieurs étapes. Nous avons pu constater qu'à chacune de ces étapes, l'activité des micro-organismes se manifeste par des variations des paramètres de fermentation et par des variations quantitatives et qualitatives de la composition des distillats obtenus après les fermentations.

L'étude des paramètres de la fermentation tels que l'acidité, le T.A.V. final du vin et le temps de fermentation permet généralement de différencier une fermentation levurienne d'une fermentation mixte. C'est le suivi de ces paramètres qui permet à l'industriel de constater une éventuelle contamination pendant la phase de fermentation. Le temps de fermentation est par ailleurs le seul paramètre qui nous ait permis de différencier l'activité de deux genres de levures.

L'étude quantitative portant sur la composition en alcools supérieurs des distillats obtenus après fermentation a permis ensuite de différencier les levures entre elles et de mettre en évidence l'activité des bactéries. Cette étude correspond aux analyses quotidiennes effectuées au laboratoire sur les échantillons de la distillerie. Le suivi de la quantité d'alcools supérieurs et d'acétate d'éthyle dans les rhums permet d'effectuer un contrôle-qualité sur le produit.

L'étude qualitative des distillats a révélé les voies métaboliques particulières empruntées par les bactéries. L'activité des bactéries est ainsi à l'origine de variations des proportions relatives d'un certain nombre de composés chimiques. Ces variations sont l'expression d'un matériel enzymatique différent chez les bactéries et chez les levures. Il nous a été possible, par ce travail, de différencier des bactéries appartenant à la même espèce. Ce type d'analyse n'est pas effectuée couramment à la distillerie. Elle permet cependant de connaître parfois la nature de l'agent infectant dans le cas d'une contamination bactérienne.

# CONCLUSION GENERALE

---

Notre étude a porté sur une des phases essentielles de la fabrication du rhum : la fermentation. Afin de connaître l'impact des micro-organismes pendant la fermentation, il était nécessaire de s'intéresser dans un premier temps à la composition de la mélasse. Peu de travaux ont été effectués sur la mélasse jusqu'à présent. Les quelques travaux portant sur les composés aromatiques de la mélasse datent des années 70. L'évolution des techniques depuis cette époque devaient donc nous permettre d'approfondir ce sujet. Nous avons identifié 113 composés dans la mélasse. Un grand nombre de ces composés sont issus de réactions thermiques qui se produisent pendant le process sucrier. Nous avons également pu mettre en évidence la présence de composés provenant de la dégradation des caroténoïdes. Ces composés sont retrouvés dans les mêmes proportions à la fin de la fermentation ce qui montre qu'ils ne sont pas dégradés au cours de la fermentation. Leur abondance à tous les stades de l'élaboration du rhum pourrait être caractéristique des produits issus de la canne à sucre. Il faudrait confirmer cette hypothèse en recherchant notamment la présence dans la mélasse, puis dans le rhum, de ce qui semble être un isomère de la bêta-damascénone possédant les notes organoleptiques du rhum.

Cette étude a été complétée par celle des composés glycosylés. En effet, les composés glycosylés existent dans de nombreux produits provenant de matériel végétal. Nous avons donc supposé qu'il en était de même dans la mélasse. Les résultats d'un traitement enzymatique de la mélasse ont confirmé cette hypothèse. Il existe dans la mélasse de nombreux composés sous une forme glycosylée qui représentent un potentiel aromatique exploitable. L'utilisation d'enzymes appropriées peut être envisagée pour traiter la mélasse avant la fermentation.

Nous avons étudié ensuite la fermentation en utilisant plusieurs micro-organismes, sélectionnés à partir de notre étude bibliographique. Les levures ont d'abord été testées. La souche de *Schizosaccharomyces pombe* se différencie très nettement des souches de *Saccharomyces cerevisiae* par un temps de fermentation très long, par une forte production

d'acétate d'éthyle et par une faible production d'alcools supérieurs. En revanche, seule une étude des rapports quantitatifs entre les alcools supérieurs permet de différencier les *Saccharomyces cerevisiae* entre eux. L'introduction des bactéries dans une fermentation avec un *Saccharomyces cerevisiae* a pour conséquence : une augmentation du temps de fermentation, une augmentation de l'acidité du vin, une diminution de la production d'alcools supérieurs par les levures et une augmentation de la quantité d'acétate d'éthyle dans les vins. Une partie des nutriments présent dans le milieu est donc utilisée par les bactéries et conduit à la formation de nouveaux composés. L'équilibre dans le métabolisme des acides aminés, à l'origine d'une partie des alcools supérieurs, est ainsi modifié chez la levure. Mais ces études ne nous ont pas permis de différencier les bactéries entre elles, mis à part deux *Clostridium* qui réalisent la fermentation butanolique (conduisant au butan-1-ol).

La différenciation des bactéries n'a pu se faire qu'après une étude de la composition des distillats après extraction avec un solvant. Cette étude a mis en évidence les voies métaboliques particulières à chacun des micro-organismes. C'est ainsi que nous avons pu constater que les voies de la fermentation lactique, de la fermentation propionique et de la fermentation butyrique sont des voies métaboliques que certaines bactéries empruntent pour dégrader les sucres. Nous avons également remarqué qu'un grand nombre de composés identifiés sont issus de la décarboxylation des acides cinnamiques. Ces décarboxylations conduisent à la formation de composés phénoliques qui possèdent un faible seuil de perception et doivent de ce fait contribuer à la qualité organoleptique du produit. La production la plus importante concerne le 4-éthyl-phénol que l'on retrouve en grande quantité après l'introduction en fermentation des *Lactobacillus* étudiés, du *Bacillus subtilis* et du *Propionicum jensenii*. Le 4-éthyl-phénol est un composé possédant une note aromatique phénolique. Il convient donc d'éviter une synthèse trop importante de ce composé. Nous avons observé également, après l'introduction de trois bactéries particulières, une augmentation importante de la proportion relative de géraniol et de menthol. Ces résultats confirment l'existence d'hétérosides terpéniques et tendent à prouver que ces trois bactéries possèdent une bêta-glucosidase exocellulaire et active dans les conditions de fermentation. L'utilisation de tels micro-organismes en fermentation peut être un moyen d'augmenter l'arôme du produit et d'exploiter un peu plus le potentiel aromatique de la mélasse. Ces expériences sur les précurseurs d'arômes présents dans la mélasse méritent d'être approfondies afin de connaître la nature exacte de ces hétérosides.

Il est apparu au cours de notre travail que chaque micro-organisme possède un potentiel aromatique qui est représenté par son matériel enzymatique. Les différentes réactions biochimiques qui ont lieu au cours de la fermentation vont permettre l'expression du potentiel aromatique de la mélasse. On obtient à l'arrivée un produit caractérisé par la matière première employée et par la nature des micro-organismes introduits au cours de la fermentation. La fermentation est l'étape qui offre le plus de possibilités pour obtenir des produits présentant des caractéristiques propres. Des essais avec d'autres micro-organismes que ceux que nous avons testés pourraient être entrepris afin de proposer aux industriels un plus grand choix de micro-organismes capables d'influer sur la qualité du produit obtenu. Ce choix pourrait se faire en fonction du produit final recherché.

Le rhum possède des caractéristiques organoleptiques qui lui sont propres. La matière première utilisée est à l'origine de ces particularités. Il serait donc intéressant d'étudier de manière plus approfondie la mélasse et le jus de canne.

# MATERIELS ET METHODES

---

## I- MATERIEL BIOLOGIQUE.

### I-1. LES LEVURES.

Sept souches de levure ont été étudiées :

Les trois souches *Saccharomyces cerevisiae* **sd12**, **sd13** et **sd65**, utilisées par la distillerie de Savanna dans la fermentation, au cours de la campagne de production de rhum.

La souche *Saccharomyces cerevisiae* **71b**, obtenue auprès de la Société Lallemand.

La souche *Saccharomyces cerevisiae* **sm102**, obtenue auprès de la Société Littorale Oenologie.

La souche *Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus* **67j**, obtenue auprès de la Société Littorale Oenologie.

La souche *Schizosaccharomyces pombe*, obtenue à partir de la collection ATCC.

### I-2. LES BACTERIES.

Neuf souches de bactérie ont été étudiées. Elles ont toutes été obtenues dans le catalogue ATCC. Il s'agit de :

Une souche *Acetobacter diazotrophicus*.

Une souche *Micrococcus luteus*.

Une souche *Bacillus subtilis*.

Une souche *Lactobacillus hilgardii*.

Une souche *Lactobacillus pentosus*.

Une souche *Propionibacterium jensenii*.

Deux souches *Clostridium beijerinckii* A et B.

Une souche *Clostridium butyricum*.

## II-MILIEUX ET TECHNIQUES DE CULTURE.

### II-1. LA CONSERVATION DES SOUCHES.

#### II-1.1. Les levures.

Les souches sont conservées sur milieu gélosé dont la composition est la suivante :

Sucre	40g.
Extrait de levure (Merck)	4g.
Peptone (Prolabo)	6g.
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O (Prolabo)	1g.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (OSI)	2g.
Bacto-agar (Merck)	20g.
Eau distillée	1 litre.

Une fois constitué, ce milieu est réparti dans des tubes et autoclavé à 120°C pendant 20 minutes. Ensuite, ces tubes sont mis à refroidir en position inclinée. Les tubes sont alorsensemencés stérilement puis conservés à +4°C

#### II-1.2. Les bactéries.

Les bactéries étudiées appartiennent à plusieurs genres différents. Ces différences de genre impliquent parfois des exigences particulières pour certaines souches. C'est la raison pour laquelle des milieux de composition différente ont été réalisés.

##### II-1.2.1. La souche *Acetobacter diazotrophicus*.

La souche est conservée sur un milieu gélosé (Mannitol Agar) dont la composition est la suivante :

Extrait de levure (Merck)	5g.
Peptone (Prolabo)	3g.

Mannitol (OSI)	25g.
Bacto-agar (Merck)	15g.
Eau distillée	1 litre.

Ce milieu est réparti dans différents tubes et autoclavé à 120°C pendant 20 minutes. Ces tubes sont mis à refroidir en position inclinée. Une fois ensemencés, les tubes sont conservés à +4°C.

#### II-1.2.2. Les souches *Micrococcus luteus* et *Bacillus subtilis*.

Les souches sont conservées sur une gélose nutritive (Biokar) à 3,5% (p/v), à +4°C.

#### II-1.2.3. Les souches *Lactobacillus hilgardii* et *Lactobacillus pentosus*.

Les souches sont conservées sur une gélose M.R.S. (Man, Rogosa et Sharpe, Biokar) à 7,03% (p/v), à +4°C.

#### II-1.2.4. Les souches *Propionicum jensenii*, *Clostridium butyricum* et *Clostridium beijerinckii* A et B.

Les *Clostridium* sont des bactéries anaérobies strictes et les *Propionibacterium* se développent plus rapidement en anérobiose. Il est donc nécessaire d'éviter la présence d'oxygène dans les milieux de culture de ces bactéries. L'utilisation de paraffine permet de créer ces conditions anaérobies.

Ces souches sont conservées à +4°C dans un milieu liquide surmonté d'un bouchon de paraffine. Le milieu liquide est du bouillon R.C.M. (Reinforced Clostridial Medium, Biokar) à 3,8% (p/v).

## II-2. MILIEUX DE CULTURE.

Afin que les volumes d'ensemencement soient suffisants pour faire développer les micro-organismes dans de bonnes conditions, nous avons procédé en plusieurs étapes. Lorsqu'il s'agit de levures et de bactéries aérobies ou microaérophiles, l'agitation du milieu de culture entraîne un apport d'oxygène dans le milieu.

### II-2.1. Le premier milieu de développement.

Dans un premier temps, nous avons fait développer chaque micro-organisme sur un milieu de 50 ml. Ce milieu a une composition permettant le développement de chacune des souches dans les meilleures conditions.

Nous avons utilisé le même milieu pour toutes les souches de levures. Sa composition est la suivante :

Sucre	97g.
Extrait de levure (Merck)	6g.
Peptone (Prolabo)	12g.
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O (Prolabo)	2g.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (OSI)	6g.
Eau distillée	935 ml.

Ce milieu est réparti dans des Erlenmeyers de 100 ml, à raison de 50 ml par Erlenmeyer, puis autoclavé à 120°C pendant 20 minutes. Les milieux sont ensemencés stérilement puis placés sous agitation dans une pièce chauffée à 30°C, pendant 24 heures pour les *Saccharomyces cerevisiae*. La souche *Schizosaccharomyces pombe* se développant plus lentement, nous avons placé ces levures sous agitation à 30°C pendant 48 heures.

- La souche *Acetobacter diazotrophicus*.

La souche est mise en culture dans un milieu liquide qui présente la composition suivante :

Extrait de levure (Merck)	5g.
Peptone (Prolabo)	3g.
Mannitol (OSI)	25g.
Eau distillée	1 litre.

Ce milieu est réparti dans des Erlenmeyers de 100 ml, à raison de 50 ml par Erlenmeyer, puis autoclavé à 102°C pendant 20 minutes. Le milieu estensemencé stérilement puis placé sous agitation dans une pièce à 30°C pendant 48 heures.

- Les souches *Micrococcus luteus* et *Bacillus subtilis*.

Les souches sont mises en culture sur bouillon nutritif (Biokar) préparé à 2% (p/v), dans des Erlenmeyers de 100 ml remplis à la moitié de leur capacité, et placés sous agitation dans une pièce chauffée à 30°C pendant 48 heures.

- Les souches *Lactobacillus hilgardii* et *Lactobacillus pentosus*.

Les souches sont mises en culture sur bouillon M.R.S. (Biokar) préparé à 5,3% (p/v), dans des Erlenmeyers de 100 ml remplis à la moitié de leur capacité, et placés sous agitation dans une pièce chauffée à 30°C pendant 48 heures.

- Les souches *Propionicum jensenii*, *Clostridium butyricum* et *Clostridium beijerinckii* A et B.

Les souches sont mises en culture sur bouillon R.C.M. préparé à 3,8% (p/v), dans des Erlenmeyers de 100 ml remplis au  $\frac{3}{4}$  de leur capacité. Le milieu est surmonté d'un bouchon de paraffine assurant l'anaérobiose. Les Erlenmeyers sont placés dans une étuve maintenue à 35°C pendant 48 heures.

## II-2.2. Le second milieu de développement.

Dans un second temps, toutes les souches sont cultivées sur un milieu de composition identique. L'utilisation de mélasse pour constituer le milieu permet d'adapter progressivement les micro-organismes au milieu de fermentation. La composition du milieu de 250ml est la suivante :

Mélasse	110g.
Sucre	80g.
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O (Prolabo)	4g.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (OSI)	7g.
SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	6g.
Eau distillée	960ml.

Ce milieu est réparti dans des Erlenmeyers d'une capacité de 500ml, à raison de 250ml par Erlenmeyer, et autoclavé à 120°C pendant 20 minutes. Le milieu est alorsensemencé stérilement par 50 ml de culture de la souche étudiée et placé sous agitation dans une pièce chauffée à 30°C pendant 24 heures pour les levures *Saccharomyces cerevisiae* et pendant 48 heures pour tous les autres micro-organismes aérobies étudiés.

Pour les bactéries anaérobies du genre *Clostridium* et *Propionibacterium*, le milieu de culture, après l'ensemencement avec 50 ml de culture, est surmonté d'un bouchon de paraffine assurant l'anaérobiose. Il est ensuite placé dans une étuve maintenue à 35°C pendant 48 heures.

## II-2.3. Milieu de fermentation.

Le milieu de fermentation ou **moût** est constitué de mélasse dont la densité est ramenée à 1100 par dilution avec de l'eau. Ce moût est identique à celui utilisé à la distillerie de Savanna. Des bidons d'une capacité de 25 litres sont remplis à moitié avec ce milieu, puis autoclavés à 120°C pendant 30 minutes. Chaque bidon estensemencé par 300 ml de culture contenant le micro-organisme étudié, puis placé dans une pièce chauffée à 30°C.

### **III- ANALYSES DE LA MELASSE.**

#### **III-1. LE BRIX.**

L'analyse du brix permet de mesurer le pourcentage de matière sèche dans la mélasse. La mélasse est un produit trop visqueux pour que l'analyse soit effectuée directement. Il convient auparavant de diluer cette mélasse. Cette mesure est réalisée au réfractomètre, après dilution au 1/6<sup>ème</sup> de la mélasse.

#### **III-2. ANALYSES EN SUCRES DE LA MELASSE.**

##### **III-2.1. Le saccharose.**

La détermination de la teneur en saccharose dans la mélasse s'effectue par polarimétrie. On se base sur la propriété qu'ont les sucres tels que le glucose et le fructose de dévier la lumière polarisée. Il convient donc de procéder auparavant à l'inversion du saccharose en glucose et fructose.

Les manipulations ont été faites comme suit. Cent grammes de mélasse sont dilués dans 500g d'eau distillée. Trois cents grammes de cette solution sont ensuite placés dans une fiole jaugée de 500ml. On complète avec de l'eau distillée jusqu'à 500ml. On prélève 400ml de cette nouvelle solution à laquelle on ajoute 16g d'acétate de plomb basique  $Pb_2C_4H_6O_4$  (Prolabo). Après 30mn, l'ensemble est filtré en présence de célite 545. A 200ml de filtrat, on ajoute 2g d'oxalate de potassium  $C_2K_2O_4$  (Prolabo) séché à 100°C. L'ensemble est immédiatement filtré en présence de célite 545. Deux fois 50ml de filtrat sont ensuite prélevés. Dans le premier prélèvement, on ajoute 10ml de Hcl 6,34N et 20ml d'eau distillée. Cette solution est mise dans un bain thermostatique à 60°C pendant 15mn, afin de procéder à l'inversion du saccharose. La solution est refroidie, puis complétée à 100ml avec de l'eau distillée. On obtient la solution A.

Dans le second prélèvement, on ajoute 10ml de NaCl à 231,5 g/l et on complète à 100ml avec de l'eau distillée. On obtient la solution B.

On détermine la polarisation des deux solutions avec un polarimètre. La teneur en saccharose est alors calculée à l'aide de la formule suivante.

$$\%S = (5.2*(P'-P)*100)/(D.Clerget-0.53t)$$

%S : pourcentage de saccharose dans la mélasse.

P : valeur lue au polarimètre pour la solution A.

P' : valeur lue au polarimètre pour la solution B.

D.Clerget : diviseur Clerget. Il est fonction du brix de la mélasse et est obtenu à l'aide d'une table d'équivalence.

0.53t : correction du diviseur Clerget. Elle est fonction de la température des solutions. Sa valeur est également donnée par des tables.

### **III-2.2. Les sucres réducteurs.**

La détermination de la teneur en sucres réducteurs s'effectue en présence de liqueur de Fehling.

### **III-3. ANALYSE DES MINÉRAUX.**

Cette analyse est réalisée par électrophorèse capillaire. L'analyse des minéraux a été effectuée au laboratoire d'Agrochimie de l'Université de la Réunion.

Les ions dosés sont :

- Le bromure, le chlorure, l'iodure, le sulfate, le citrate, le fluorure, le phosphate et le malate pour les anions.

- L'ammonium, le potassium, le calcium, le sodium, le magnésium, le chrome, le lithium, le manganèse, le cadmium et le cobalt pour les cations.

### **III-4. ANALYSE DES COMPOSES AROMATIQUES.**

L'analyse des différents composés aromatiques de la mélasse a été réalisée en deux temps.

L'analyse de l'espace de tête nous a permis d'étudier la composition de la mélasse en composés très volatils.

La seconde technique employée est une extraction de composés aromatiques à l'aide d'un solvant. Cette technique complète bien celle de l'analyse de l'espace de tête.

#### **III-4.1. Analyse des composés de l'espace de tête.**

Une étude de la composition de l'espace de tête de la mélasse a été réalisée. Nous avons utilisé la méthode d'analyse de l'espace de tête statique. Les analyses ont été réalisées par Solid Phase MicroExtraction (SPME), au C.I.R.A.D. Cette analyse consiste à piéger les vapeurs dégagées par la mélasse sur une phase d'adsorption.

La mélasse est diluée à raison de 2 volumes d'eau distillée pour un volume de mélasse. Le mélange est placé dans un Erlenmeyer fermé hermétiquement. L'aiguille munie de la phase d'adsorption est utilisée pour percer le bouchon de l'Erlenmeyer et est placée au dessus de la solution. La solution est alors chauffée à 45°C sous agitation. La phase d'adsorption est laissée en contact avec les vapeurs de mélasse pendant 5 heures. Les composés aromatiques sont adsorbés par la phase d'extraction.

Ces composés sont désorbés par injection dans un Chromatographe en Phase Gazeuse couplé à un Spectromètre de Masse. Les conditions d'analyse sont décrites dans la partie VI.1.2.

#### **III-4.2. Analyse après extraction liquide-liquide.**

L'analyse de la composition de la mélasse en composés aromatiques nécessite une extraction liquide-liquide. Nous avons utilisé un mélange pentane/éther dans des proportions 9:1. L'appareil utilisé est un extracteur de type Lickens (figure 60). La mélasse est diluée

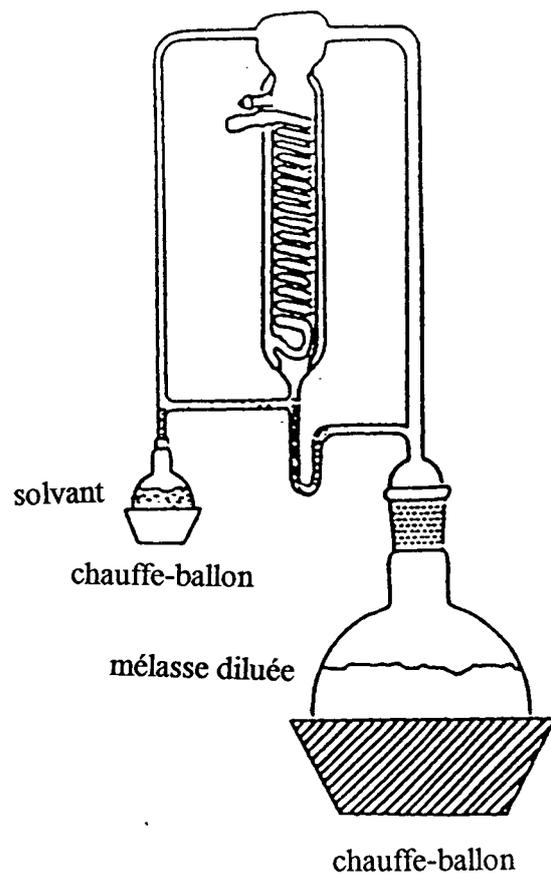


Figure 60 : Lickens

quatre fois et 500ml de cette solution sont placés dans un ballon de 1 litre. L'extraction est effectuée pendant 5 heures. Le mélange de solvant est évaporé en faisant passer un courant d'azote dans la solution. Le volume final de l'échantillon est de 500 $\mu$ l. Nous avons effectué alors des analyses en Chromatographie en Phase Gazeuse et en Spectrométrie de Masse. Les conditions d'analyses sont données dans la partie VI-1.2.

### **III-5. ANALYSE DES COMPOSES GLYCOSYLES.**

Des composés existent sous une forme glycosylée, c'est à dire qu'ils sont liés à une ou plusieurs molécules de sucres. Selon la nature des sucres concernés, différentes enzymes sont nécessaires à la libération de ces composés. Notre étude a concerné les molécules glycosylées présentes dans la mélasse. Nous avons comparé la composition d'une mélasse traitée avec une enzyme et la composition d'une mélasse non traitée.

#### **III-5.1. Traitement enzymatique de la mélasse et récupération des composés aromatiques.**

L'analyse des composés glycosylés a été effectuée au Laboratoire de Microbiologie et de Génétique des Micro-organismes à Montpellier. L'enzyme utilisée est une bêta-glucosidase purifiée par Janbon et al. (1995).

L'enzyme est fixée par adsorption sur une résine Duolite A568 (Rohm & Haas). L'enzyme est placée en contact avec la résine pendant 17 heures, à température ambiante et sous agitation. La résine est lavée deux fois avec du tampon citrate-phosphate 0,1M.

La résine employée pour la fixation des composés aromatiques est une résine Amberlite<sup>®</sup> XAD<sup>®</sup>-1180 (Rohm & Haas). Cette résine est mise en contact avec du méthanol à 95% v/v sous agitation pendant 15mn. La colonne d'extraction est remplie de moitié avec cette solution homogénéisée. On fait percoler 50ml de méthanol pur puis la résine est nettoyée avec 75ml d'eau distillée.

La mélasse étudiée est diluée avec trois volumes d'eau pour un volume de mélasse. Le pH de la solution est ajusté à 4.

Cinquante millilitres de la solution de mélasse sont mis en contact avec 50 unités de bêta-glucosidase immobilisée sur résine pendant 16 heures à 30°C. La solution de mélasse est alors séparée de la résine et 6µg/ml d'octan-1-ol est ajouté comme étalon interne.

La solution de mélasse traitée est mise à percoler sur les colonnes remplies de résine Amberlite XAD-1180 avec un débit d'élution de 1,5ml/mn. La résine est nettoyée avec 75ml d'eau distillée. Les composés aromatiques fixés sur la résine sont ensuite récupérés en faisant percoler 50ml d'un mélange de dichlorométhane-pentane dans des proportions 1:2. L'extrait est alors concentré sous vide (Rotavapor) à 30°C. Cent microlitres d'extrait sont recueillis et prêts à être analysés en CPG.

La mélasse non traitée subit également cette dernière opération de récupération de composés aromatiques et a servi de témoin.

Toutes ces opérations sont réalisées en double.

### **III-5.2. Analyse des extraits en Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG).**

La CPG permet de séparer les différents composés chimiques d'une solution en utilisant certaines de leurs propriétés physico-chimiques. Le mélange de composés est injecté à l'état gazeux dans une colonne capillaire située dans un four. Un gaz vecteur est envoyé continuellement dans cette colonne. Les composés migrent dans la colonne à une vitesse qui est fonction de la nature de la colonne utilisée (colonne apolaire ou polaire), de la nature du composé (alcool, ester, etc), de la taille de ce composé, de la nature du gaz vecteur, de la vitesse du gaz vecteur, et de la température du four. Les composés vont ainsi être séparés et les composés qui migrent le plus rapidement arriveront les premiers à l'autre extrémité de la colonne. A ce niveau, chaque composé va être à l'origine d'un signal électrique émis par un détecteur à ionisation de flamme. L'intensité de ce signal électrique est fonction de l'importance quantitative du composé dans l'extrait étudié. Ces signaux électriques sont alors transcrits en pics sur un écran, la ligne de base correspondant à l'absence de signal. Chaque pic correspond donc au moins à un composé. Le chromatogramme représente la composition d'un produit en composés chimiques.

L'appareil utilisé est un Varian 3300 muni d'un détecteur à ionisation de flamme. Les conditions opératoires sont les suivantes :

Colonne JW : DB1, longueur 20m, diamètre interne 0,32mm.

Température du four : de 45°C à 185°C, à raison d'une augmentation de 4°C/mn.

Température de l'injecteur : 200°C.

Température du détecteur : 250°C.

Le gaz vecteur est l'hélium et nous avons travaillé en mode split.

La gamme étalon est constituée de alpha-pinène, bêta-pinène, limonène, linalol, alpha-terpinène, gamma-terpinène, alpha-terpinéol, camphre, nérol, citronellool, géranol, bêta-caryophyllène, octan-1-ol, phényl-2-éthanol, alcool benzylique.

#### **IV- SUIVI DES FERMENTATIONS.**

Au cours des fermentations, nous avons effectué régulièrement et stérilement des prélèvements, dans le but de suivre les paramètres de la fermentation.

##### **IV-1. LA DENSITE.**

La densité est mesurée avec un densimètre électronique DMA 46 (Instrulab). Le suivi de la densité est un bon indicateur de l'évolution de la fermentation. La transformation des sucres en alcool entraîne une diminution de la densité du milieu.

##### **IV-2. LE TITRE ALCOOMETRIQUE VOLUMIQUE (T.A.V.).**

La mesure du T.A.V. permet d'évaluer la teneur en alcool des échantillons. Cependant, le T.A.V. n'est pas mesuré directement. En effet, le T.A.V. est fonction de la température d'ébullition du vin et c'est cette valeur que nous allons déterminer. La température d'ébullition d'un échantillon varie en fonction de sa teneur en alcool et est mesurée grâce à un ébulliomètre.

L'ébulliomètre utilisé est un ébulliomètre Dujardin et Salleron. La température d'ébullition est reportée sur un disque ébulliométrique qui permet la lecture du T.A.V. Le volume de l'échantillon prélevé pour cette analyse est de 50 ml.

#### **IV-3. LE PH ET L'ACIDITE.**

Les mesures du pH et de l'acidité sont effectuées avec un pH-mètre/titrateur Mettler DL 40 RC. Une prise d'échantillon de 25 ml est réalisée. L'acidité est calculée par neutralisation de l'échantillon avec de la soude 0,1N. L'acidité est donnée en gramme équivalent  $H_2SO_4$  par litre de moût.

#### **V- ANALYSE QUALITATIVE DES VINS.**

Nous avons effectué des analyses de l'espace de tête des vins afin de déterminer les constituants les plus volatils présents dans les vins. Nous avons vérifié que ces composés étaient également décelés après une extraction liquide-liquide sur ces mêmes vins.

Nous avons chauffé 400 ml de vin à 45°C sous agitation dans un récipient hermétique. Le bouchon du récipient est percé par l'aiguille contenant la phase d'adsorption. La phase d'extraction est du polydiméthylsiloxane (PMDS). La phase d'adsorption est laissée au contact des vapeurs du vin pendant 2 heures afin de permettre l'adsorption des composés de l'espace de tête. La désorption est effectuée par injection dans l'appareil d'analyse. Les composés sont alors chassés sous forme de gaz dans la colonne de chromatographie.

L'analyse a été réalisée par un Chromatographe en Phase Gazeuse de type Hewlett Packard 5890 série II, muni d'un détecteur à ionisation de flamme, et couplé à un spectromètre de masse Hewlett Packard 5971 series par impact électronique. Les conditions d'analyse étaient les suivantes :

Colonne JW: DBWax, longueur 60m, diamètre interne 0,32 mm, épaisseur de la phase 0,25 $\mu$ m.

Température du four : de 50°C à 230°C, à raison d'une augmentation de 2°C/mm.

Température de l'injecteur : 230°C.

Température du détecteur : 250°C.

Gaz vecteur : hélium.

Mode split

## **VI- LES ANALYSES DES DISTILLATS.**

### **VI-1. LA DISTILLATION.**

La distillation est effectuée sans fractionnement afin de récupérer le maximum de composés chimiques volatils présents dans les vins et donc susceptibles d'être rencontrés dans l'eau-de-vie. Nous avons placé 700ml de vin dans un ballon d'une capacité d'1 litre. Le vin est ensuite chauffé par l'intermédiaire d'un chauffe-ballon et 100ml de distillat sont récupérés. Le degré alcoolique du distillat est calculé. Pour cela, la densité du distillat est mesurée au densimètre électronique puis la valeur est reportée sur une table donnant l'équivalence densité/degré alcoolique pour des solutions hydroalcooliques. Trente millilitres de ce distillat sont destinés à l'analyse quantitative des alcools supérieurs et de l'acétate d'éthyle. Le reste est utilisé pour l'extraction liquide-liquide.

### **VI-2. ETUDE QUANTITATIVE : TENEUR DES DISTILLATS EN ALCOOLS SUPERIEURS ET EN ACETATE D'ETHYLE.**

La détermination de la teneur en alcools supérieurs et en acétate d'éthyle dans les distillats est réalisée par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG).

Les manipulations ont été les suivantes : 5ml de distillat sont prélevés auxquels nous avons ajouté 500 $\mu$ l d'une solution éthanolique contenant l'étalon interne. Nous avons injecté 0,1 $\mu$ l de cette solution dans un Chromatographe en Phase Gazeuse de type Delsi GC 121 DFL, muni d'un détecteur à ionisation de flamme. Les valeurs sont données en HectoLitres d'Alcool Pur (HLAP). Les conditions d'analyse étaient les suivantes :

Colonne JW: Carbowax, longueur 30m, diamètre interne de 0,32mm.

Température du four : 50°C pendant 4mn ; puis de 50°C à 90°C à raison d'une augmentation de 16°C/mn ; puis un palier à 90°C pendant 4mn.

Température de l'injecteur : 150°C.

Température du détecteur : 150°C.

Gaz vecteur : azote

L'étalon interne est le méthyl-4-pentan-2-ol.

Les valeurs sont données en grammes par hectolitre d'alcool pur (g/HLAP)

### **VI-3. ETUDE QUALITATIVE DES DISTILLATS.**

Une étape préparatoire est nécessaire à l'analyse qualitative des distillats. Cette étape consiste à effectuer une extraction liquide-liquide avec un solvant.

#### **VII-3.1. Extraction liquide-liquide.**

Nous avons choisi comme solvant d'extraction le pentane. En effet, les caractéristiques organoleptiques du rhum sont dues en grande partie à des composés apolaires tels que les esters. Leur extraction dans de bonnes conditions nécessite un solvant qui soit également apolaire. De plus, une grande partie des composés participant à l'arôme du rhum est très volatile. Il était donc nécessaire que le solvant utilisé puisse être éliminé à une température relativement faible. Le caractère apolaire et la faible température d'ébullition (37°C) du pentane expliquent son choix comme solvant d'extraction.

Nous avons manipulé de la façon suivante. Nous avons mis en contact 400 ml de distillat ramené à 25° Gay-Lussac (°GL), avec 100 ml de pentane (qualité Normapur, Prolabo) dans une ampoule à décanter. Le mélange est agité toutes les 15 minutes pendant 2 heures sans qu'il y ait d'émulsions. Il est ensuite laissé au repos pendant 30 minutes. La phase supérieure contenant le pentane est récupérée dans un ballon de 250 ml. Elle est distillée à 40°C. La colonne utilisée est une colonne de 30cm de type Vigreux. Nous récupérons 500µl d'extrait qui sont placés dans un flacon de 2 ml. Les échantillons sont analysés immédiatement et peuvent être conservés 24 heures à -8°C. Au-delà de cette limite, nous avons observé une perte des composés les plus volatils.

### VII-3.2. Analyse des extraits.

Les extraits ont été analysés par CPG et par CPG/SM. Nous avons effectué ces analyses à la Distillerie de Savanna et au C.I.R.A.D.

L'appareil utilisé à la distillerie était un Chromatographe en Phase Gazeuse Fison 8130 muni d'un détecteur à ionisation de flamme. Les conditions d'analyse ont été les suivantes :

Colonne Hewlett Packard : Ultra-1, longueur 50m, diamètre interne 0,2mm.

Température du four : 70°C à 250°C à raison d'une augmentation de 2°C/mn ; puis 250°C pendant 10mn.

Température de l'injecteur : 250°C.

Température du détecteur : 270°C.

Gaz vecteur : azote.

Mode split.

Le volume injecté est de 0,1 µl.

Deux appareils ont été utilisés au C.I.R.A.D. :

1- Un Chromatographe en Phase Gazeuse Hewlett Packard 5890 série II muni d'un détecteur à ionisation de flamme. Les conditions d'analyse ont été les suivantes :

Deux colonnes montées en parallèle : une colonne JW DBWax, longueur 60m, diamètre interne 0,32mm et une colonne DB1, longueur 60m, diamètre interne 0,32mm.

Température du four : 70°C à 230°C à raison d'une augmentation de 2°C/mn ; puis 230°C pendant 15mn.

Température de l'injecteur : 230°C.

Température du détecteur : 250°C

Gaz vecteur : hélium

Mode split.

Le volume injecté est de 0,3 µl.

Ces conditions ont été également utilisées pour l'analyse des extraits de mélasse.

L'emploi de deux colonnes montées en parallèle, de même longueur mais de phases différentes, a présenté l'avantage de fournir deux chromatogrammes différents provenant d'une même injection. Un composé n'a pas le même temps de rétention sur une colonne polaire et sur une colonne apolaire. En revanche les deux pics correspondant à ce composé ont la même surface. Il est donc plus facile de resituer les composés sur les chromatogrammes.

2- Un Chromatographe en Phase Gazeuse Hewlett Packard 5890 série II muni d'un détecteur à ionisation de flamme et couplé à un spectromètre de masse Hewlett Packard 5971 series à impact électronique. Nous avons travaillé sur deux types de colonnes : une colonne apolaire et une colonne polaire. Dans les deux cas le gaz vecteur était l'hélium et le volume injecté était de 0,3 $\mu$ l. Les conditions d'analyse ont été les suivantes :

Colonne Hewlett Packard : H.P.101, longueur 50m, diamètre interne 0,32mm.

Température de four : de 70°C à 250°C, à raison d'une augmentation de 2°C/mn.

Température de l'injecteur : 250°C.

Température du détecteur : 270°C.

Mode split.

Colonne JW : DBWax, longueur 60m, diamètre interne 0,32mm.

Température du four : 50°C à 230°C à 2°C/mn.

Température de l'injecteur : 230°C

Température du détecteur : 250°C.

Mode split.

Ces conditions étaient celles utilisées pour l'analyse de l'espace de tête de la mélasse et pour l'identification des composés présents dans les extraits de mélasse.

La base de données des spectres de masse, utilisée pour l'identification est la Wiley138.

### VI-3.3. Etude des proportions relatives.

Les études qualitatives nous ont amené à effectuer des extractions sur les distillats. A partir de ces extraits, nous avons obtenu pour chacune des souches étudiées des chromatogrammes. Nous avons observé des variations entre les différents profils chromatographiques d'une souche à l'autre. En revanche, pour une même souche, les profils chromatographiques étaient relativement identiques. Nous avons donc voulu connaître les natures des différences entre chaque souche en comparant les proportions relatives des composés présents dans les extraits.

Pour cela, les différents composés identifiés ont été replacés sur les chromatogrammes. La surface de chacun de ces pics est connue. Le nombre important de pics qui compose un seul chromatogramme (jusqu'à 350), nous a contraint à effectuer une sélection parmi tous les pics.

Il fallait tout d'abord écarter les pics qui n'étaient pas présents sur la totalité des chromatogrammes. Parmi les pics restants, seuls ceux qui correspondaient à des composés présentant un intérêt organoleptique et dont la présence pouvait être en rapport avec un phénomène biochimique particulier ont été retenus. Ces choix ont été effectués à l'aide de notre étude bibliographique. Nous avons choisi 21 composés dans le cas des fermentations levuriennes et 31 composés dans le cas de l'étude des fermentation mixtes.

Nous avons choisi un composé étalon, c'est à dire qui était présent dans la mélasse et qui n'a pas été dégradé au cours de la fermentation. Pour que nous puissions interpréter les différents résultats, il fallait que ce composé soit dans des proportions relativement similaires dans tous les extraits. Notre choix s'est porté sur la bêta-damascénone qui possède, en plus de ne pas être dégradé au cours de la fermentation, des caractéristiques organoleptiques intéressantes et est présent dans des proportions importantes dans les extraits.

Afin que cette étude ait un sens, il fallait que l'ensemble de ces composés représentent une proportion importante des extraits. Les pics sélectionnés représentaient entre 50% et 60% de chacun des chromatogrammes.

Nous avons alors calculé les proportions relatives des composés. Pour ce calcul, seules les surfaces des pics considérés ont été prises en compte. La proportion relative d'un composé était alors le pourcentage de la surface du pic correspondant, par rapport à la surface totale des pics étudiés. Nous n'avons observé entre les différents chromatogrammes que de faibles variations dans la proportion relative de la bêta-damascénone ce qui rend possible l'interprétation des résultats.

# BIBLIOGRAPHIE

---

**ALBAGNAC, G.**, La décarboxylation des acides cinnamiques substitués par les levures, *Ann. Technol. Agric.*, 1975, 24 (2) :133-141.

**ALLAN, D. A.**, Less volatile alcohols, esters and hydrocarbons in a raw australian rum, *Ann. Technol. Agric.*, 1975, 24 (3-4) : 239-245.

**ARROYO, R.**, Studies on rum, *Research bulletin n°5*, Agricultural Experimental Station, University of Porto-Rico, 1945.

**AYRAPAA, T.**, Formation of higher alcohols, *J. Inst. Brew.*, 1968, 74 (2) : 171-178.

**AYRAPAA, T.**, Biosynthetic formation of higher alcohols by yeast. Dependance on the nitrogenous nutrient level of the medium, *J. Inst. Brew.*, 1971, 77 (3) : 266-276.

**AYRAPAA, T.**, Studies on the formation of higher alcohols and esters by brewer's yeast. In : Suomalainen, H., Waller, C., *Internationnal Specialized Symposium on Yeasts*, 1973, 41-45.

**BAVOSITTO, V., ROCH, L. HEINISH, B.**, Gas chromatography of volatiles in beer during its brewing, fermentation and storage, III, *Quantitative effect of physical, chemical and physiological variables*, American society of Brewing Chemists Proceedings of the Annual Meeting, 1961, 16-23.

**BRICOUT, J., MENORET, Y.**, Teneur en isotopes stables du rhum et des principaux alcools de bouche, *Ann. Tech. Agric.*, 1975, 24 (3-4) : 247-254.

**CAVAZZA, G.**, La législation du rhum et sa constitution analytique, *Ann. Technol. Agric.*, 1975, 24 (3-4) : 255-267.

**CHARLWOOD, B.V., BANTHORPE, D.V.**, The biosynthesis of monoterpenes, *Prog. Phytochem.*, 1978, 5, 65-129.

**CORDONNIER, R.**, Recherches sur l'aromatisation et le parfum des vins doux naturels et des vins de liqueur, *Ann. Technol. Agric.*, 1956, 1, 75-110.

**CORDONNIER, R., BAYONOVE, C.**, Mise en évidence dans la baie de raisin, variété muscat d'Alexandrie, de monoterpènes liés révélables par une ou plusieurs enzymes du fruit, *CR. Acad. Sci. Paris*, 1974, 278, 3387-3390.

**CORDONNIER, R., BAYONOVE, C., BAUMES, R.**, Données récentes sur les précurseurs d'arôme du raisin. Perspectives de leur exploitation en vinification, *Rev. Fr. Oenol.*, 102 : 29-41.

**CROUZET, J.**, La biogénèse des arômes, *Les arômes alimentaires*, Richard H. et Multon J.L. (eds.), Tec&Doc-Lavoisier, Paris, 1992, 80-97.

**De SMEDT, P., LIDDLE, P. A. P., CAVAZZA, G.**, Analyse de différents types de rhums, *Ann. Fals. Exp. Chim.*, 1980, 788 : 385-397.

**De SMEDT, P., LIDDLE, P. A. P.**, Place des rhums au sein des eaux-de-vie, *Ann. Technol. Agric.*, 1975, 24 (3-4) : 269-286.

**De SMEDT, P., LIDDLE, P. A. P.**, Présence d'alcool allylique (propène-2-ol-1) et dérivés dans les eaux-de-vie, *Ind. Alim. Agric.*, 1976, 93 : 41-43.

**DRAWERT, F., BARTON, H.**, Biosynthesis of flavor compounds by microorganisms. 3. Production of monoterpenes by the yeast *Kluyveromyces lactis*, *J. Agric. Food Chem.*, 1978, 26 : 765-766.

**DUBOIS, P.**, Les arômes des vins et leurs défauts, *Rev. Fr. Oenol.*, 1994, 146 : 39-50.

**DUBOIS, P., BRULE, G.**, Analyse des phénols volatils de deux rhums martiniquais, *Ind. Alim. Agric.*, 1972, 7-9.

**DUBOIS, P., PARFAIT, A., DEKIMPE, J.**, Présence de dérivés de l'acroléine dans un rhum à goût anormal, *Ann. Technol. Agric.*, 1973, 22 (2) : 131-135.

**DUBOIS, P., RIGAUD, J.**, Etude qualitative et quantitative des constituants volatils du rhum, *Ann. Technol. Agric.*, 1975, 24 (3-4) : 307-315.

**EL TABEY-SHEHATA, A. M.**, Yeast isolated from sugar cane and its juice during the production of aguardiente de cana, *Applied microbiology*, 1960, 8 : 73-75.

**ENZELL, C.R.**, Isoprenoïd flavor components of tobacco and their formation, *Banbury Report Mechanism in Tobacco Carcinogenesis*, 1986, 23, 63.

**FAHRASMANE, L.**, Contribution à l'étude de la formation des acides gras courts et des alcools supérieurs par des levures de rhumerie, Thèse de doctorat en sciences alimentaires, Montpellier, 1983.

**FAHRASMANE, L., PARFAIT, A., GALZY, P.**, Propriétés fermentaires des levures de rhumerie, *Ind. Alim. Agric.*, 1986, 3 : 125-127.

**FAHRASMANE, L., PARFAIT, A., JOURET, C., GALZY, P.**, Etude de l'acidité volatile des rhums des Antilles Françaises, *Ind. Alim. Agric.*, 1983, 100 (5) : 297-301.

**FAHRASMANE, L., PARFAIT, A., JOURET, C., GALZY, P.,** Production of higher alcohols and short chain fatty acids by different yeasts used in rum fermentations, *J. Food Sci.*, 1985, 50 : 1427-1436.

**FAHRASMANE, L., GANOU-PARFAIT, B., BAZILE, F., BOURGEOIS, P.,** Technologie et éléments de typicité des rhums des Antilles françaises, *Cahiers Agricultures*, 1996, 5, 83-88.

**FAHRASMANE, L., GANOU-PARFAIT, B.,** *De la canne au rhum*, Edition I.N.R.A., Paris, 1997.

**GALLOIS, A.,** Les pyrazines présentes dans les aliments-état actuel de nos connaissances, *Science des Aliments*, 1984, 4, 145-166.

**GANOU-PARFAIT, B., FAHRASMANE, L., CELESTINE-MYRTEL, D. A., PARFAIT, A., GALZY, P.,** Les micrococci en technologie rhumière aux Antilles françaises, *Micr. Alim. Nutr.*, 1988, 6 : 273-277.

**GANOU-PARFAIT, B., FAHRASMANE, L., GALZY, P., PARFAIT, A.,** Les bactéries aérobies des milieux fermentaires à base de jus de cannes à sucre, *Ind. Alim. Agric.*, 1989, 7-8 : 576-585.

**GANOU-PARFAIT, B., PARFAIT, A.,** Problèmes posés par l'utilisation de *Schizosaccharomyces pombe* dans la fabrication des rhums, *Ind. Alim. Agric.*, 1980, 6 : 575-580.

**GANOU-PARFAIT, B., PARFAIT, A., FAHRASMANE, L., JOURET, C.,** Origine de l'acide éthyl-2-méthyl-3-butyrique composant de l'acidité volatile des rhums, *Belg. J. Food Chem. Biotechnol.*, 1986, 41, 21-24.

**GUEGUEN, Y.,** Etude de bêta-glycosidases de micro-organismes et application à l'hydrolyse des précurseurs d'arômes hétérosidiques, Thèse de Doctorat en Sciences des aliments, Montpellier, 1995.

**GUNATA, Y. Z., BAYONOVE, C. L., BAUMES, R. L., CORDONNIER, R. E.,** The aroma of grapes. Localisation and evolution of free and bound fractions of some grape aroma components c.v. Muscat first development and maturation, *J. Sci. Food Agric.*, 1985, 36 :857-862.

**GUNATA, Z., BITTEUR, S., BRILLOUET, J.M., BAYONOVE, C.R., CORDONNIER, R.,** Sequential enzymatic hydrolysis of potential aromatic from grape, *Carbohydr. Res.*, 1988, 184, 139-149.

**GUNATA, Y. Z., BAYONOVE, C. L., BAUMES, R. L., CORDONNIER, R. E.,** Stability of free and bound fractions of some aroma components of grapes cv. Muscat during the wine processing : preliminary results, *Am. J. Enol. Vitic.*, 1986, 37 : 112-114.

**HARRISON, J.S., GRAHAM, C.J.,** Yeast in distillery practice, In : H.R. Rose and J.S. Harrison (eds), *Yeast Technology*, vol.3, *The Yeast*, Academic Press, London, 1970, 283-348.

**HASHIZUME, T., YAMAGAMI, T., SASAKI, Y.,** *Agricultural and Biological Chemistry*, Tokyo, 1967, 31, 324.

**JANBON ,G., DERANCOURT, J., CHEMARDIN, P., ARNAUD, A., GALZY, P.,** A very stable beta-glucosidase from a *Candida molischiana* mutant strain : enzymatic properties, sequencing and homology with other yeast beta-glucosidases, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1995, 59, 7, 1320-1322.

**JANBON ,G., MAGNET, R., ARNAUD, A., GALZY, P.,** Cloning and sequencing of the beta-glucosidase-encoding gene from *Candida molischiana* strain 35M5N, *Gene*, 1995, 165, 109-113.

**JANBON ,G., MAGNET, R., BIGEY, F., ARNAUD, A., GALZY, P.,** Karyotype studies on different strains of *Candida molischiana* by pulsed-field gel electrophoresis, *Curr. Genet.*, 1995, 28, 150-154.

**JOUNELA-ERIKSSON, P., LEHTONEN, M.**, « Phenols in the aroma of distilled beverages » in *The quality of foods and beverages*, Academic Press Inc., 1981, 167-181.

**JOURET, C., PACE, E., PARFAIT, A.**, Différenciation analytique des rhums agricoles et industriels par les alkylpyrazines, *Ann. Fals. Exp. Chim.*, 1994, 926 : 85-90.

**JOURET, C., PACE, E., PARFAIT, A.**, L'acide formique composant de l'acidité volatile des rhums, *Ind. Alim. Agric.*, 1990, 12 : 1239-1241.

**JOURET, C., PUECH, J. L.**, Importance de la lignine dans le vieillissement des rhums, *Ann. Technol. Agric.*, 1975, 24 (3-4) : 325-333.

**KERVEGANT, D.**, *Rhums et eaux-de-vie de canne*, Editions du golf, Vannes, 1946.

**LAROE E. G., SHIPLEY, P. A.**, Whiskey composition : formation of alpha- and beta-ionone by the thermal decomposition of beta-carotene, *J. Agr. Food Chem.*, 1970, 18 : 174-175.

**LENCREROT, P., PARFAIT, A., JOURET, C.**, Rôle des corynébactéries dans la production d'acroléine (2-propenal) dans les rhums, *Ind. Alim. Agric.*, 1984, 9 : 763-765.

**LETHONEN, J. M., GREF, K. B., PUPUTTI, V. E., SUOMALAINEN, H.**, 2-ethyl 3-methylbutyric acid, a new volatil fatty acid found in rum, *J. Agric. Food Chem.*, 1977, 25 : 953-954.

**LIEBICH, H. M., KOENIG, W. A., BAYER, E.**, Analysis of the flavor of rum by gas-liquid chromatography and mass spectrometry, *J. Chromatogr. Sci.*, 1970, 8 : 527-533.

**LYNEN, F.**, The role of biotin-dependent carboxylations in biosynthetic reactions, *Biochem. J.*, 1967, 102, 381-400.

**LYNEN, F.**, Enzyme systems for fatty acid synthesis, *Biochem. J.*, 1972, 128, 1-2.

**MAARSE, H., TEN NOVER de BRAW, M. C.**, The analysis of volatile components of Jamaica rum, *J. Food. Sci.*, 1966, 31 : 951-955.

**MAARSE, H.**, Volatile compounds in food and beverages, Marcel Dekker, Inc., New-York, 1991.

**MESLEY, R. J., LISLE, D. B., RICHARDS, C. P., WARDLEWORTH, D. F.**, The analytical identification of rum, *Ann. Technol. Agric.*, 1975, 24 (3-4) : 361-370.

**MISSELHORN, K.**, Formation of acetals in rum : a kinetic study, *Ann. Technol. Agric.*, 1975, 24 (3-4) : 371-381.

**MOUTOUNET, M.**, Biosynthèse des alcools supérieurs des boissons fermentées, *Ann. Technol. Agric.*, 1969, 18 (3) : 249-261.

**MULKENS, A.**, Les hétérosides monoterpéniques non iridoïdes, *Pharm. Acta Helv.*, 1987, 62 : 229-235.

**NORDSTRÖM, K.**, Possible control of volatil ester formation in brewing, In Congress of the European Brewery Convention, Amsterdam, Elsevier Scientific Publishing Company, 1965, 10, 195-207.

**NYKÄNEN, L., NYKÄNEN, I.**, Production of esters by different yeast strains in sugar fermentations, *J. Inst. Brew.*, 1977, 83 : 30-31.

**NYKÄNEN, L., NYKÄNEN, I.**, Distilled beverages, In : Volatile compounds in food and beverages, Marcel Dekker, Inc., New-York, 1991.

**NYKÄNEN, L., NYKÄNEN, I., SUOMALAINEN, H.**, Distribution of esters produced during sugar fermentation between the yeast cell and the medium, *J. Inst. Brew.*, 1977, 83 : 32-34.

**NYKÄNEN, L., PUPUTTI, E., SUOMALAINEN, H.,** Volatile fatty acids in some brands of whisky, cognac and rum, *J. Food Sci.*, 1968, 33 (1) : 88-102.

**NYKÄNEN, L., SUOMALAINEN, H.,** Aroma of beer, wine and distilled beverages, D.Reidel Publishing Company, 1983.

**PARFAIT, A.,** Notes sur l'identification des rhums, *Ann. Fals. Exp. Chim.*, 1980, 788 : 399-405.

**PARFAIT, A., GANOUPARFAIT, B.,** La flore des milieux fermentaires en rhumerie, *Nouv. Agron. Antille-Guyane*, 1978, 4 (3-4) : 261-273.

**PARFAIT, A., JOURET, C.,** Formation des alcools supérieurs dans les rhums, *Ann. Technol. Agric.*, 1975, 24 (3-4) : 421-435.

**PARFAIT, A., JOURET, C.,** Le glycérol dans la fermentation alcoolique des mélasses et des jus de cannes à sucre, *Ind. Alim. Agric.*, 1980, 7-8 : 721-724.

**PARFAIT, A., NAMORY, M., DUBOIS, P.,** Les esters éthyliques des acides gras supérieurs des rhums, *Ann. Technol. Agric.*, 1972, 21 (2) : 199-210.

**PARFAIT, A., SABIN, G.,** Les fermentations traditionnelles de mélasse et de jus de cannes aux Antilles françaises, *Ind. Alim. Agric.*, 1975, 92 (1) : 26-34.

**PATURAU, J.M.,** By-products of the cane sugar industry, Elsevier Scientific Publishing Company, 1982.

**PUECH, J. L., JOURET, C., DEIBNER, L., ALIBERT, G.,** Substances phénoliques des eaux-de-vie d'Armagnac et de rhum. II - Produits de la dégradation de la lignine : les aldéhydes et les acides aromatiques, *Ind. Alim. Agric.*, 1977, 483-493.

**PUECH, J.-L., JOURET, C.,** Dosage des aldéhydes aromatiques des eaux-de-vie conservées en fûts de chêne : détection d'adultération, *Ann. Fals. Exp. Chim.*, 1982, 805 : 81-90.

**RIBEREAU-GAYON, J., PEYNAUD, E.**, Acides aminés des moûts et alcools supérieurs des vins, 84<sup>e</sup> Congrès Soc. Savantes, 1959, 247-251.

**RICHARD, H., MULTON, J. L.** (Eds), La biogenèse des arômes. Les arômes alimentaires, Doc. Lavoisier, Paris, 1992.

**SHUM-CHEONG-SING, A.**, Etude des composants aromatiques de Jumellea Fragrans-Recherche des critères de qualité des rhum de la Réunion, Thèse de doctorat en traitement des matières premières végétales, Toulouse, 1992.

**STRAUSS; C. R., WILSON, B., GOOLEY, P. R., WILLIAMS, P. J.**, Role of monoterpenes in grape and wine flavor,

**STRAUSS; C. R., WILSON, B., ANDERSON, R., WILLIAMS, P.J.**, Development of precursors of C<sub>13</sub> norisoprenoid, flavorants in Riesling grapes, *J. Agric. Food Chem.*, 1987, 38, 1, 23-27.

**SUOMALAINEN, H.**, Quelques aspects généraux de la composition de l'arôme des boissons alcooliques, *Ann. Technol. Agric.*, 1975, 24 (3-4) : 453-467.

**SUOMALAINEN, H.**, Yeasts esterase and aroma esters in alcoholic beverages, *J. Inst. Brew.*, 1981, 87 : 296-300.

**SUOMALAINEN, H., LEHTONEN, M.**, The production of aroma compounds by yeast, *J. Inst. Brew.*, 1978, 85 : 149-156.

**SUOMALAINEN, H., NYKÄNEN, L.**, The aroma components produced by yeast in nitrogen-free sugar solution, *J. Inst. Brew.*, 1966, 72 : 469-474.

**SUOMALAINEN, H., NYKÄNEN, L., ERIKSSON, K.**, Composition and consumption of alcoholic beverages - a review, *Amer. J. Enol. Viticult.*, 1974, 25 : 179-187.

**SUOMALAINEN, H., RONKANEN, P.**, Keto acids in baker's yeast and in fermentation solution, *J. Inst. Brew.*, 1963, 69 : 478-483.

**SUOMALAINEN, H., NYKÄNEN, L.**, Formation of aroma compounds in alcoholic beverages, Wallerstein Laboratories Communication, 1972, 118, 35, 185-202.

**TER HEIDE, R., SHAAP, H., WOBLEN, H. J., De VALOIS, P. J., TIMMER, R.**, « Flavor constituents in rum » in *The quality of food and beverages*, Academic Press Inc., 1981, 183-201.

**TER HEIDE, R.**, The flavour of distilled beverages, In : I.D. Morton and A.J MacLeod (eds.), *Food Flavours, Part B : The flavour of beverages*, Elsevier Sciences Publishers, Amsterdam, 1986, 239-336.

**VASSEROT, Y., ARNAUD, A., GALZY, P.**, Monoterpenol glycosides in plants and their biotechnological transformation, *Acta Biotechnol.*, 1995, 15 : 77-95.

**VERACHTERT, H.**, Comparative study of higher alcohol production by fermenting micro-organisms used in food technology, *Science et Technologie Alimentaire*, 1970, 3, n°5, 87-93.

**WEBB, A., INGRAHAM, J.**, Fusel oil, *Advances in Applied Microbiology*, 1963, 5, 317-353.

**WENCKER, D., LOUIS, M., NOMURA, G., LAUGEL, P., HASSELMANN, M.**, Etude de la fraction « alcools supérieurs + méthanol » de diverses eaux-de-vie. II - Distribution des différents alcools en fonction de l'origine botanique des fruits, *Ann. Fals. Exp. Chim.*, 1981, 800 : 487-499.

**WILLIAMS, P. J., STRAUSS, C. R., WILSON, B.**, Hydroxylated linalool derivatives as precursors of volatile monoterpenes of muscat grapes, *J. Agric. Food Chem.*, 1980, 28, 766-771.

**WILLIAMS, P. J., STRAUSS, C. R., WILSON, B., MASSY-WESTROPP, R.,** Novel monoterpenes disaccharide glycosides of *Vitis Vinifera* grapes and wine, *Phytochem.*, 1982, 21, 2013-2020.

**WILLIAMS, P. J., STRAUSS, C. R., WILSON, B., MASSY-WESTROPP, R.,** Glycosides of 2-phenylethanol and benzyl alcohol in *Vitis Vinifera* grapes, *Phytochem.*, 1983, 22, 2039-2041.

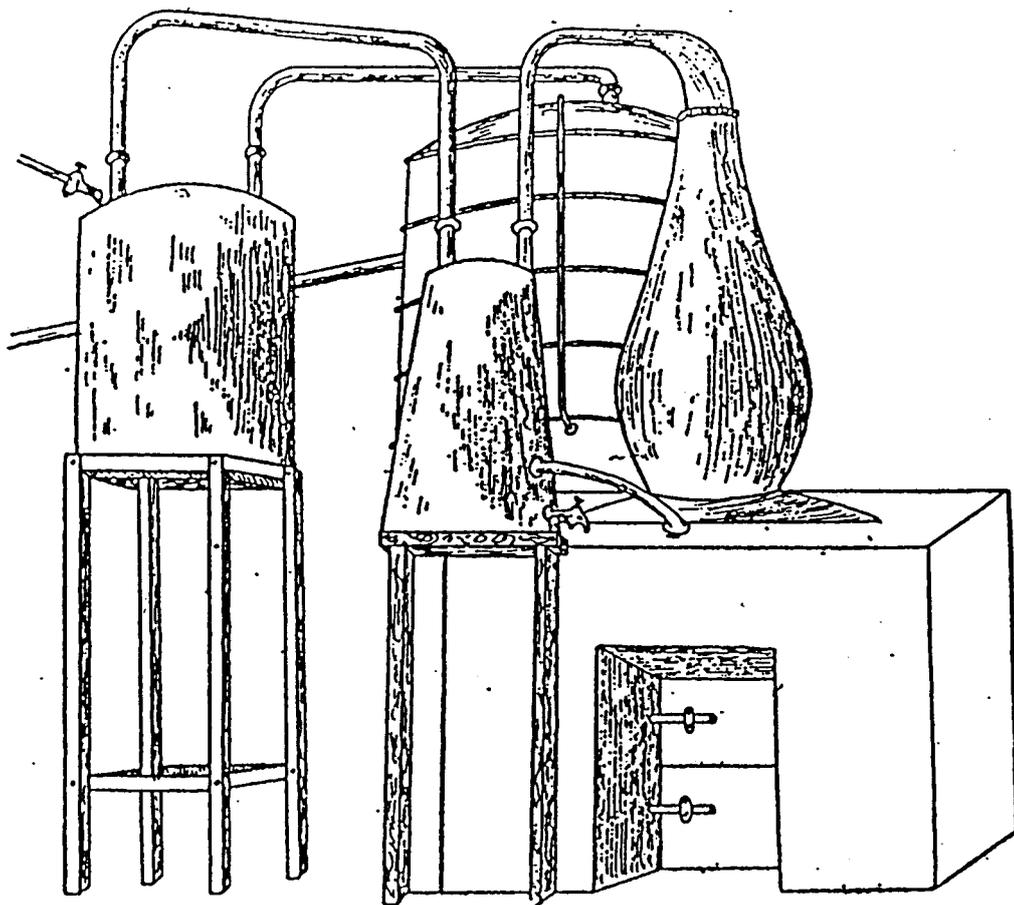
**WILLIAMS, P. J., STRAUSS, C. R., WILSON, B.,** Classification of the monoterpenoid composition of muscat grapes, *Am. J. Enol. Vitic.*, 1981, 32 : 230-235.

**WINTERHALTER, P., SEFTON, M. A., WILLIAMS, P. J.,** Volatile C<sub>13</sub>-norisoprenoid compounds in Riesling wine are generated from multiple precursors, *Am. J. Enol. Vitic.*, 1990, 41 (4) : 277-283.

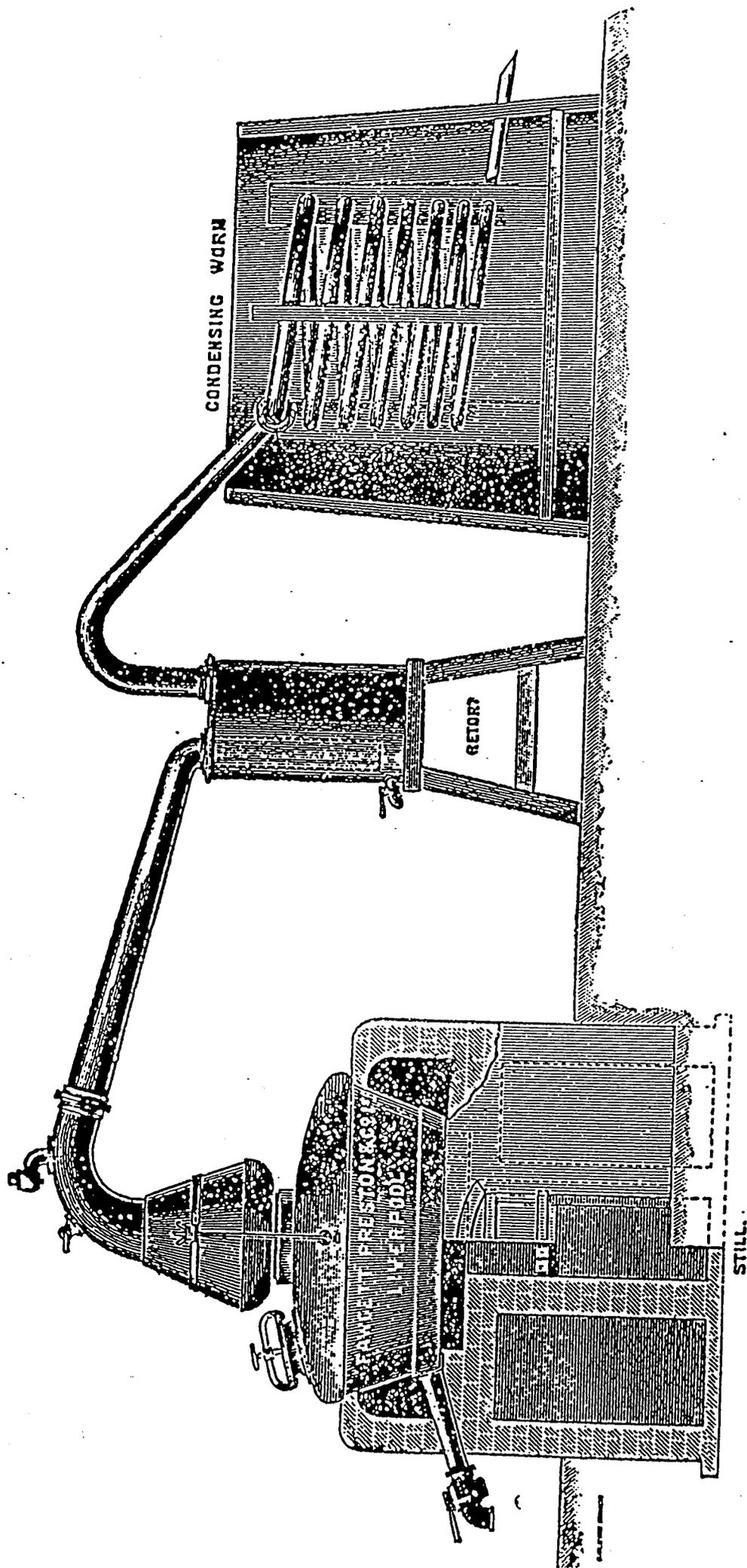
**WOBLEN, H. J., TIMMER, R., Ter HEIDE, R., De VALOIS, P. J.,** Nitrogen compounds in rum and whiskey, *J. Food Sci.*, 1971, 36 : 464-465.

## ANNEXES

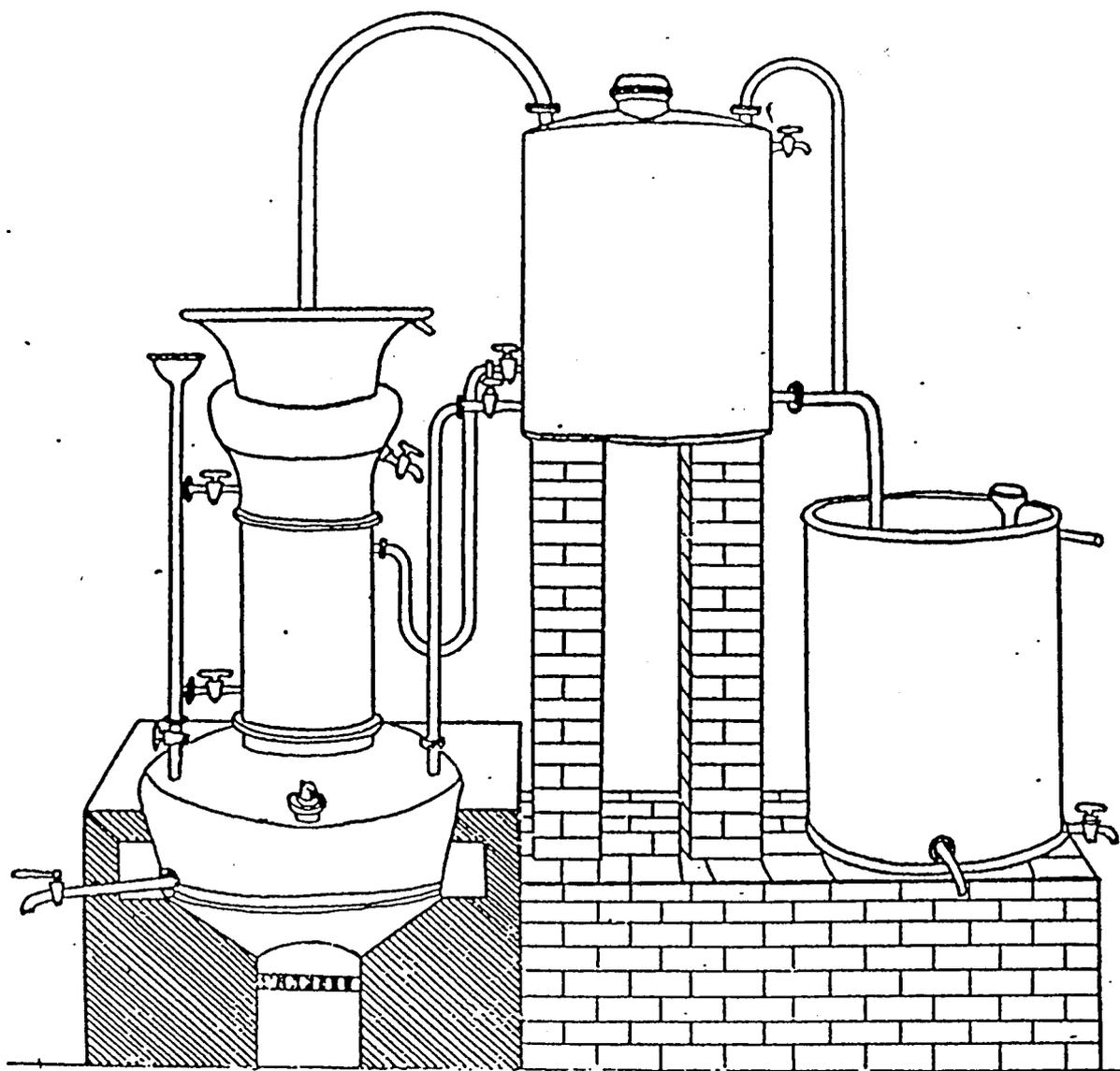
---



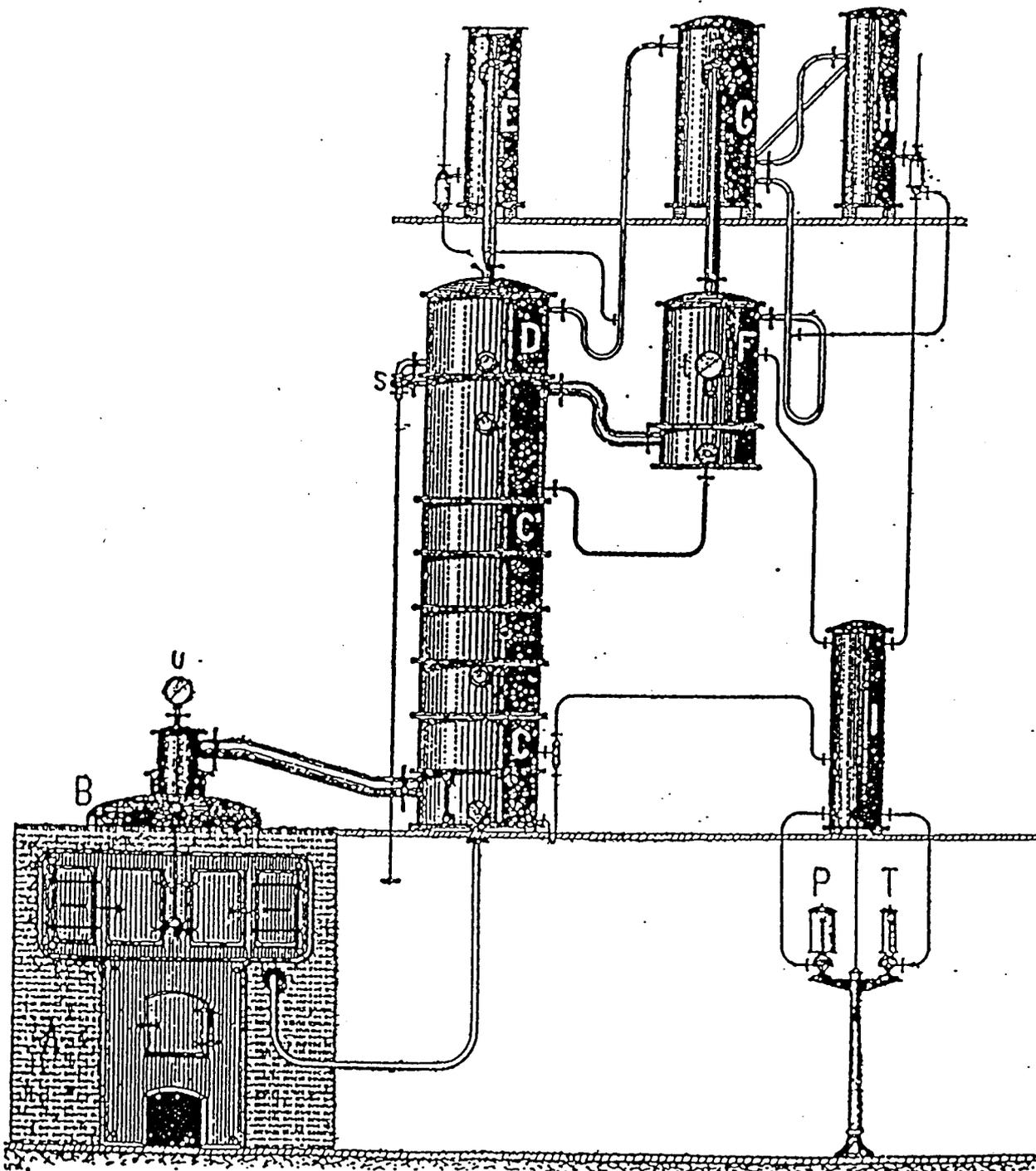
Annexe 1 : Alambic P.Labat (Martinique, fin XIX<sup>ème</sup> siècle).



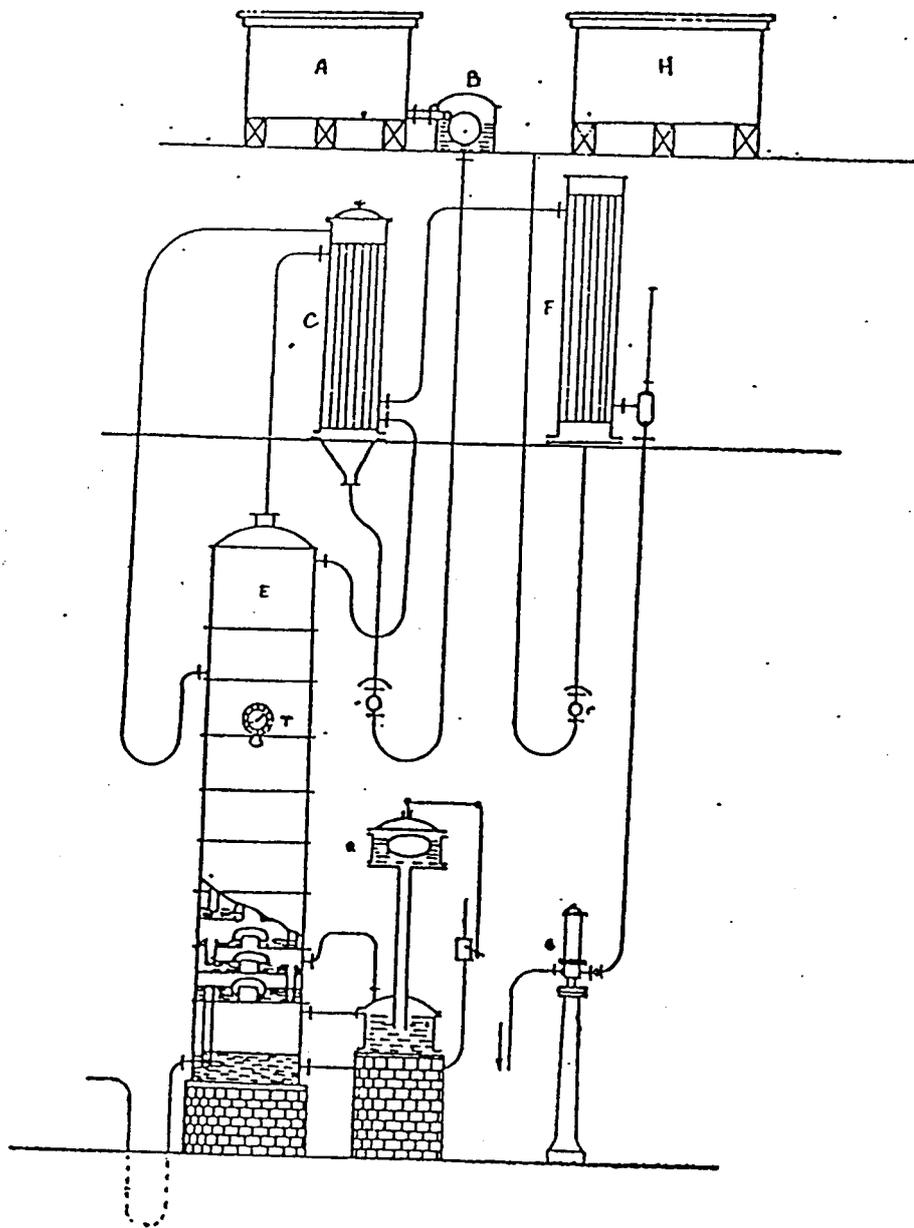
Annexe 2 : Appareil discontinu construit par Fawett, Preston et Cie.



Annexe 3 : Appareil type Privat, construit par Deroy.

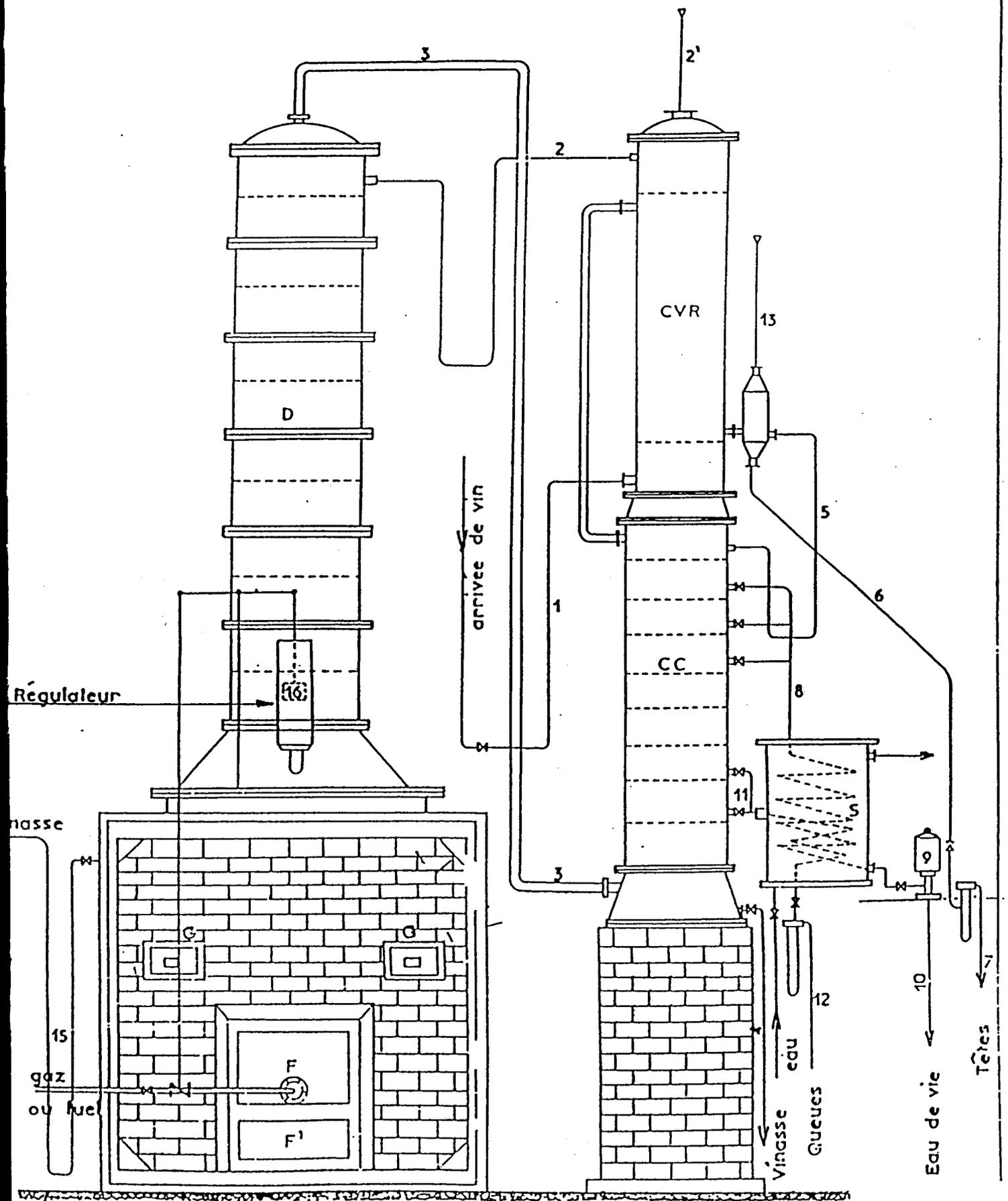


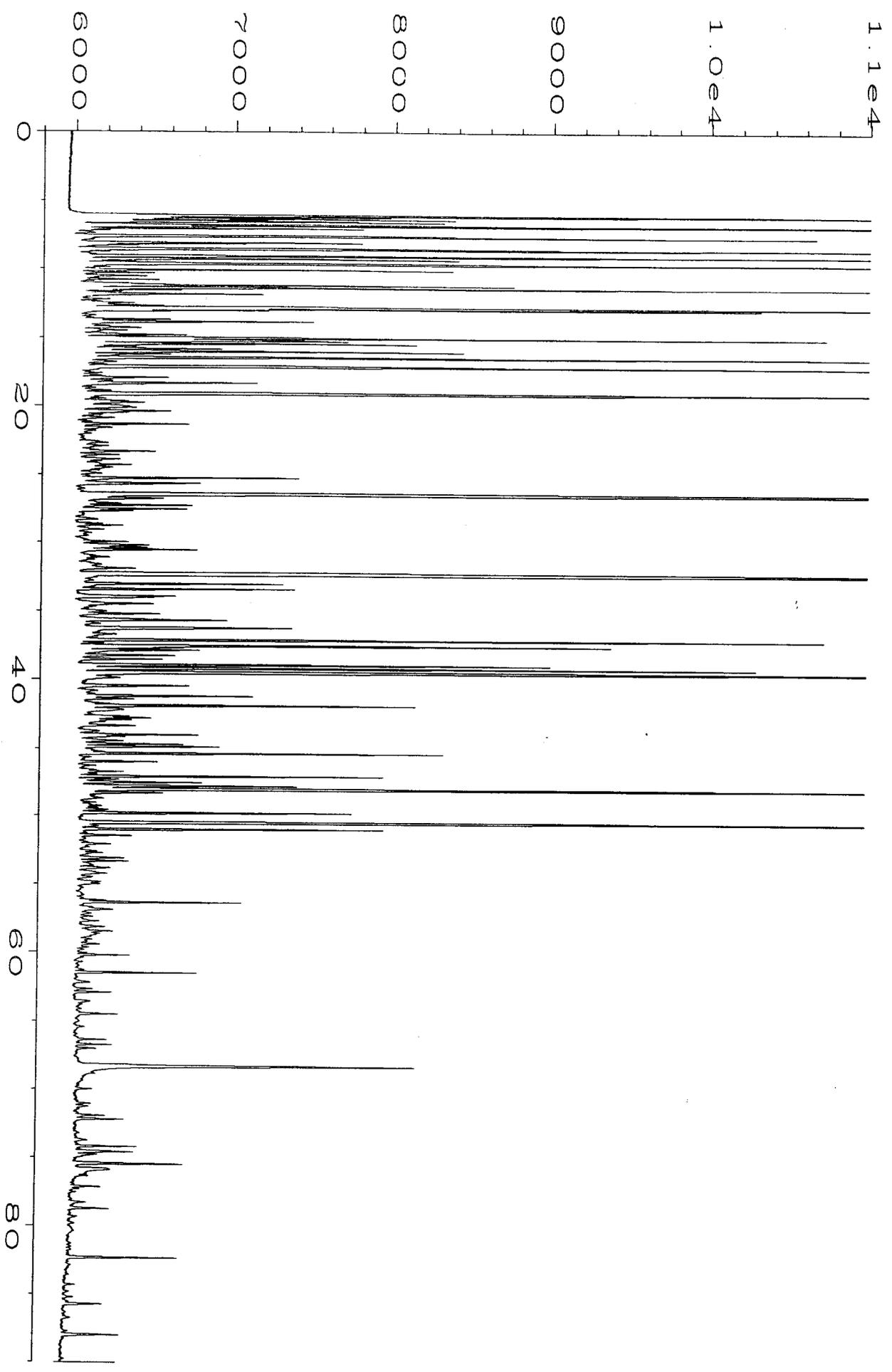
Annexe 4 : Appareil à rhum Barbet.



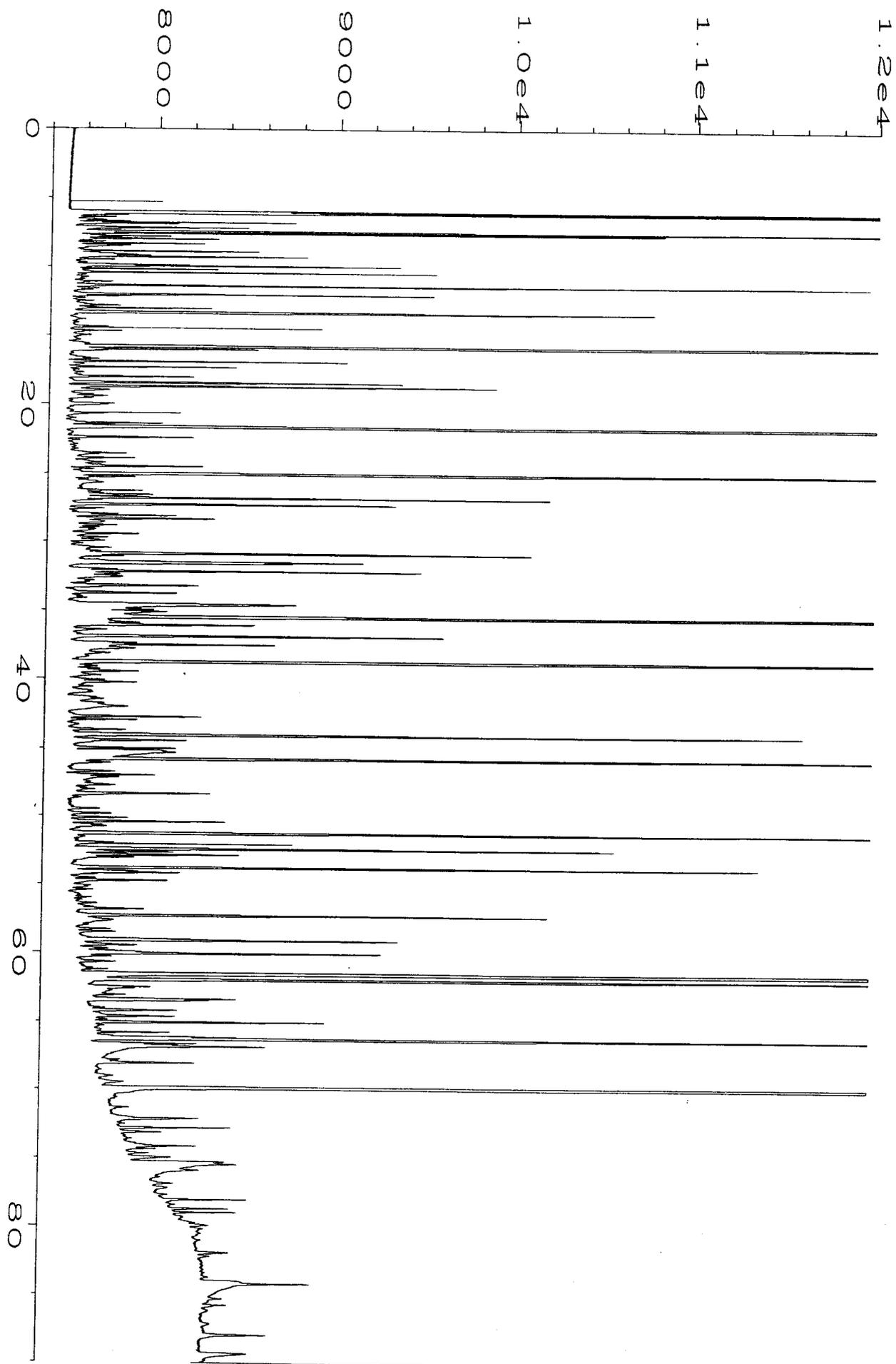
Annexe 5 : Appareil continu.

Annexe 6 : Alambic continu chauffé à feu nu type armagnacais.



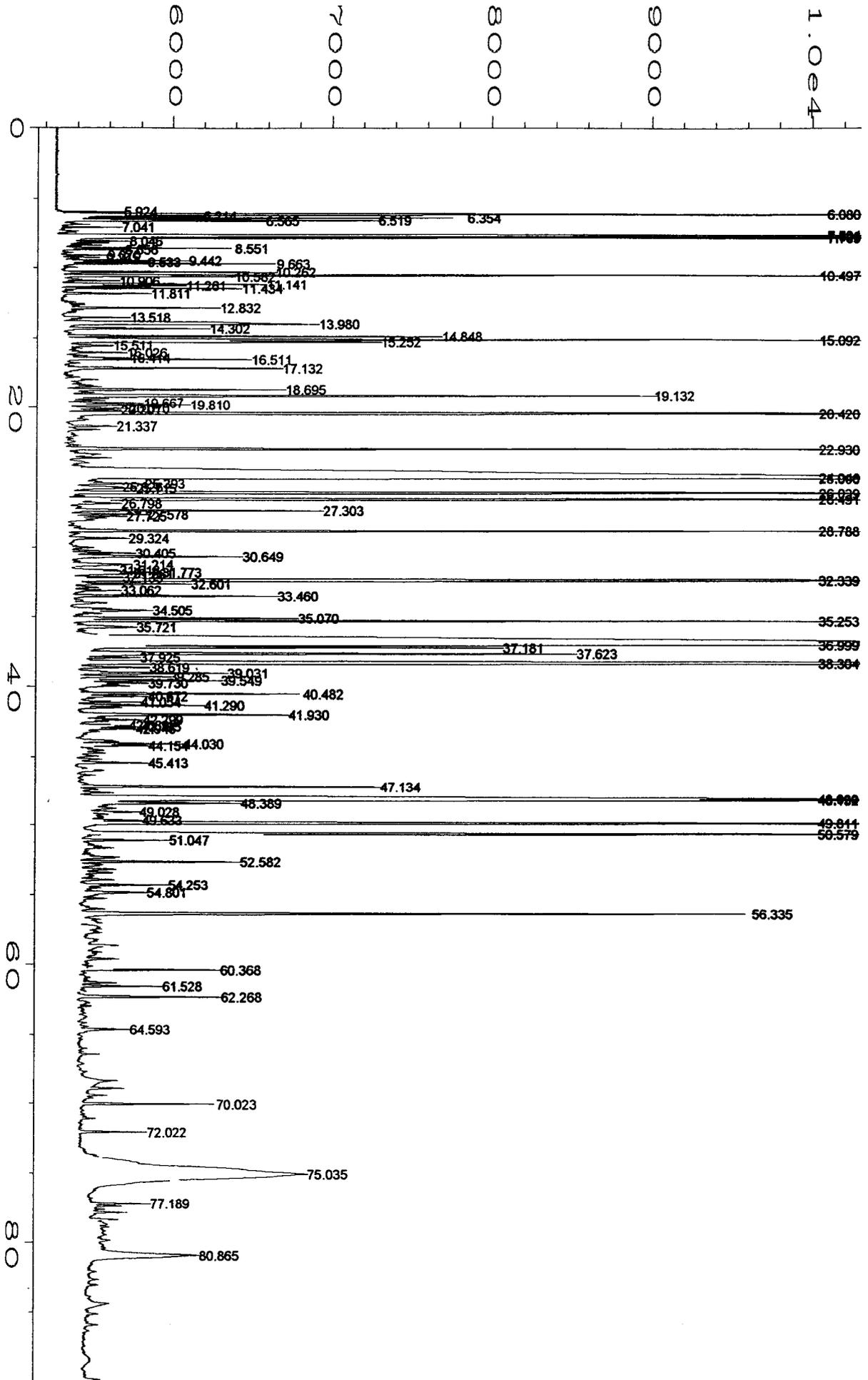


Annexe 7 : Analyse chromatographique de la mélasse sur colonne apolaire.

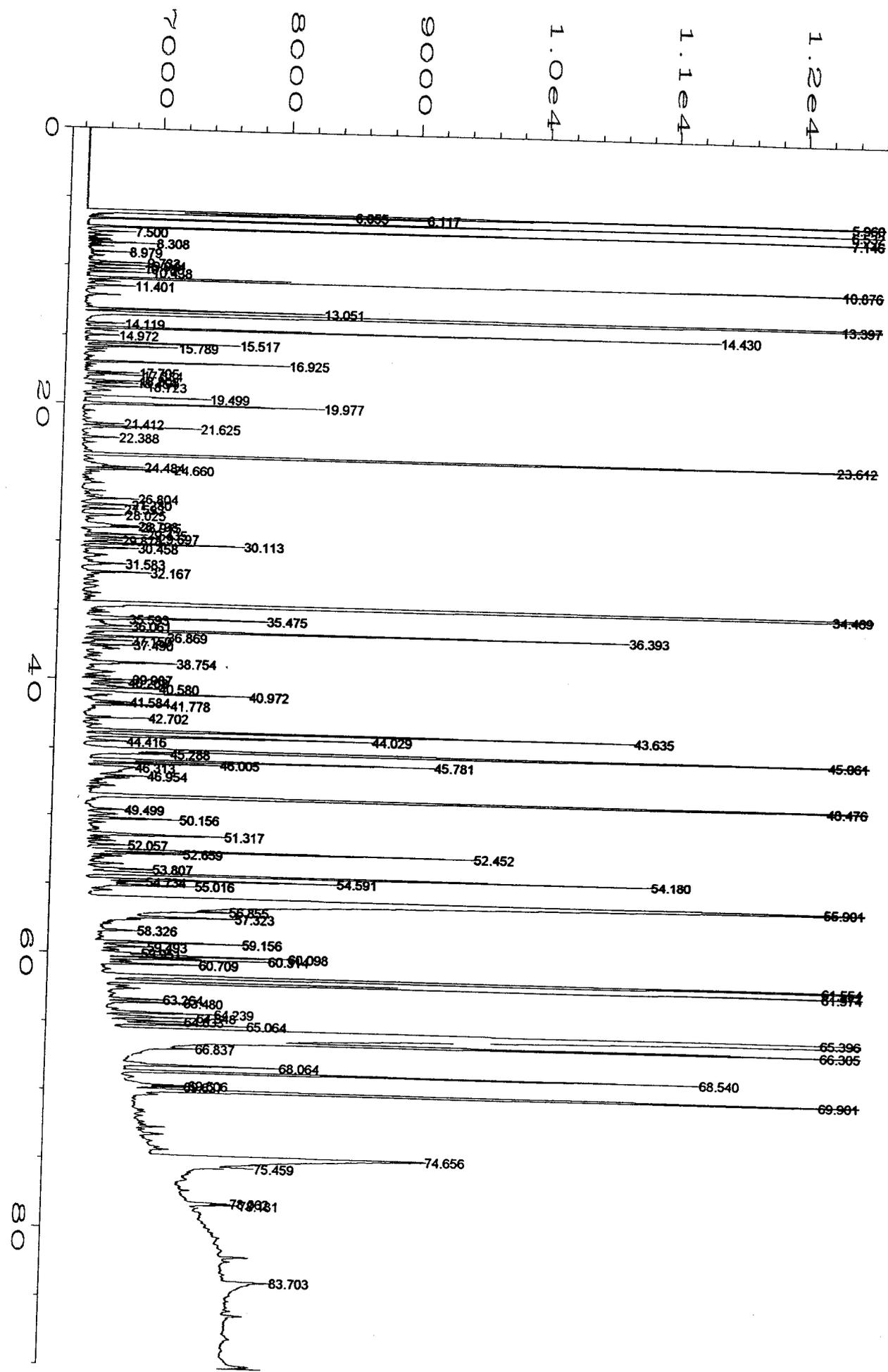


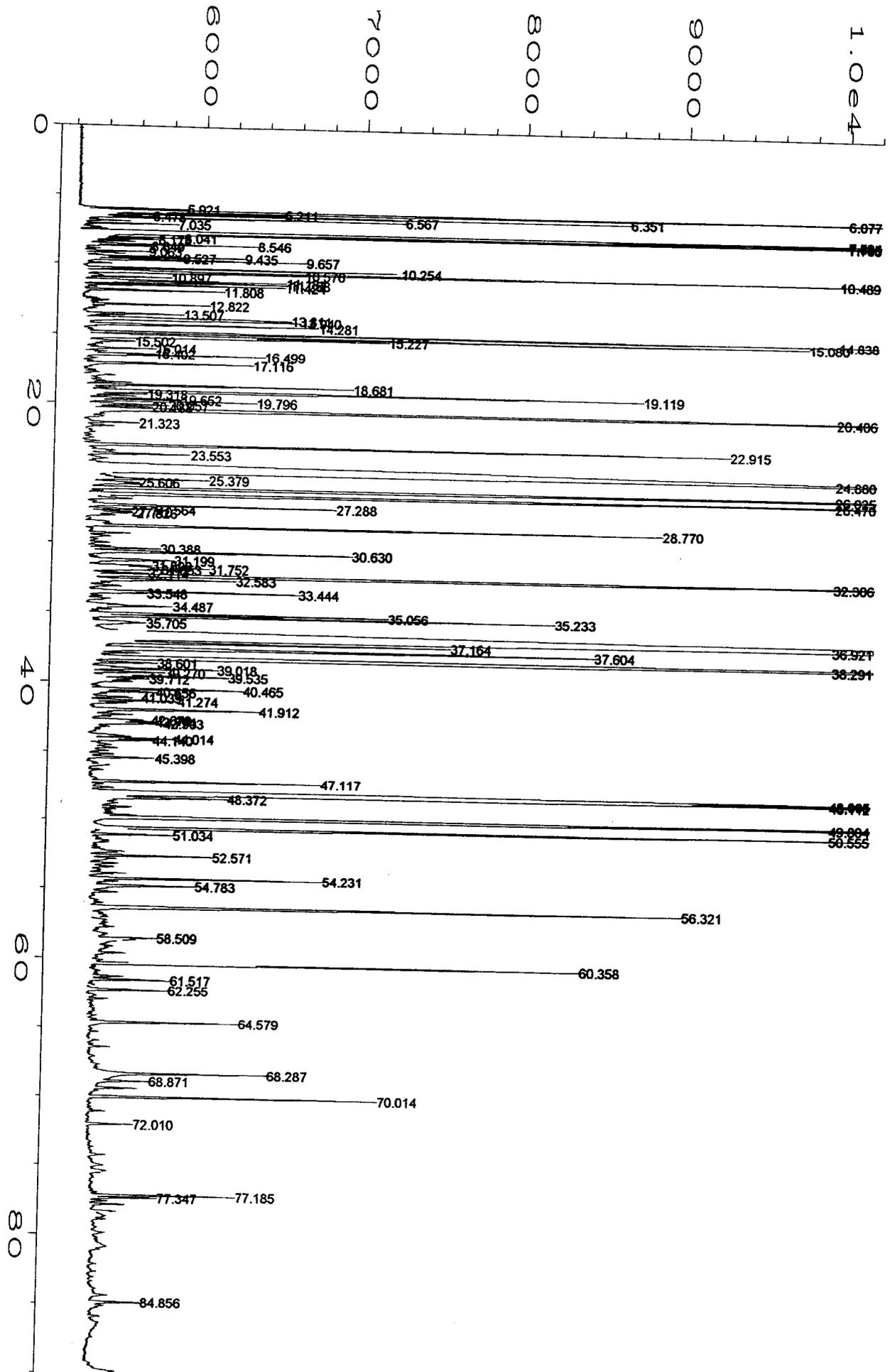
Annexe 8 : Analyse chromatographique de la mélasse sur colonne polaire.

Annexe 9 : Analyse chromatographique sur colonne apolaire d'un extrait de distillat après une fermentation par la levure *Saccharomyces cerevisiae* sd12.



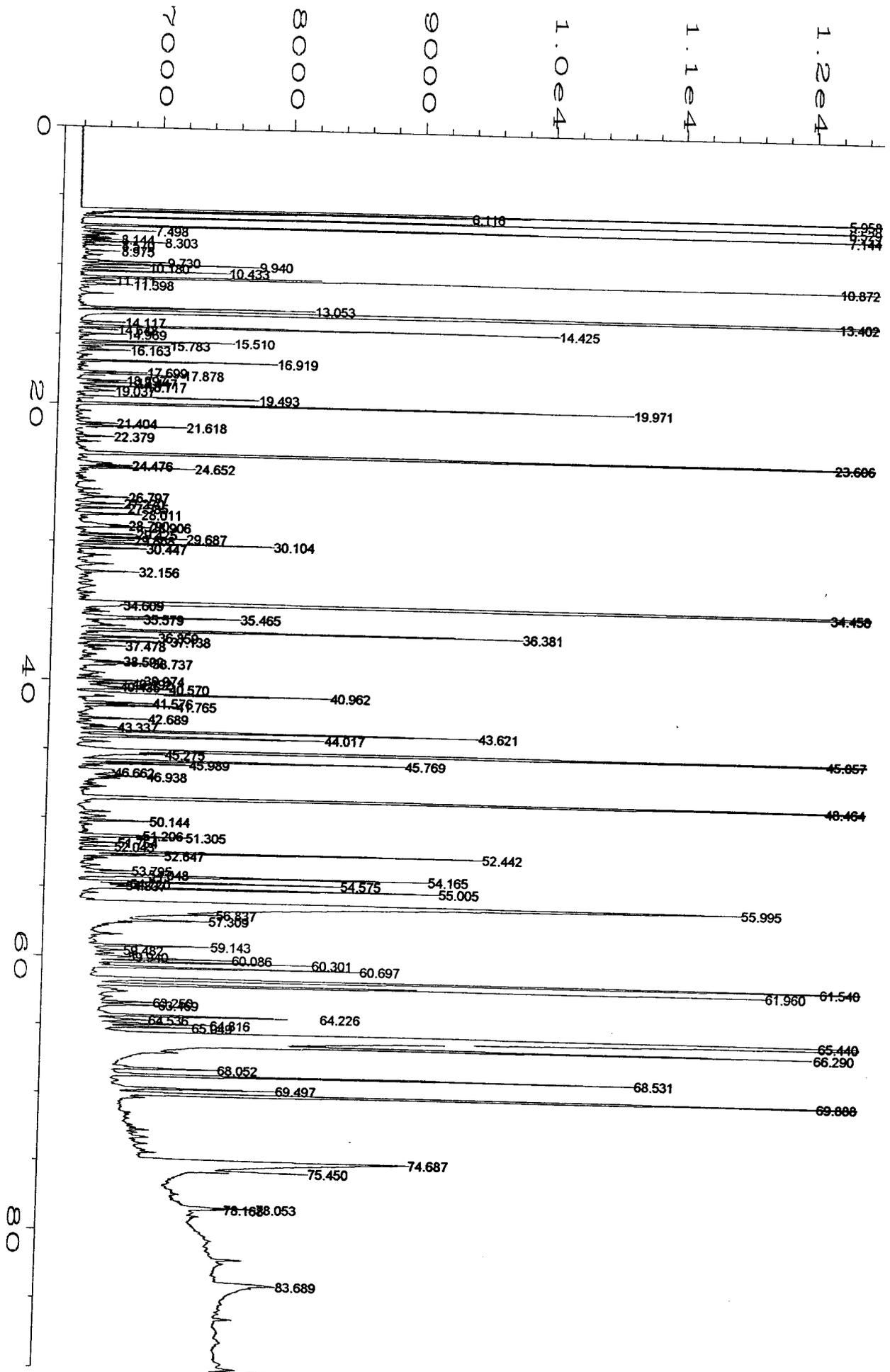
Annexe 10 : Analyse chromatographique sur colonne polaire d'un extrait de distillat après une fermentation par la levure *Saccharomyces cerevisiae* sd12.



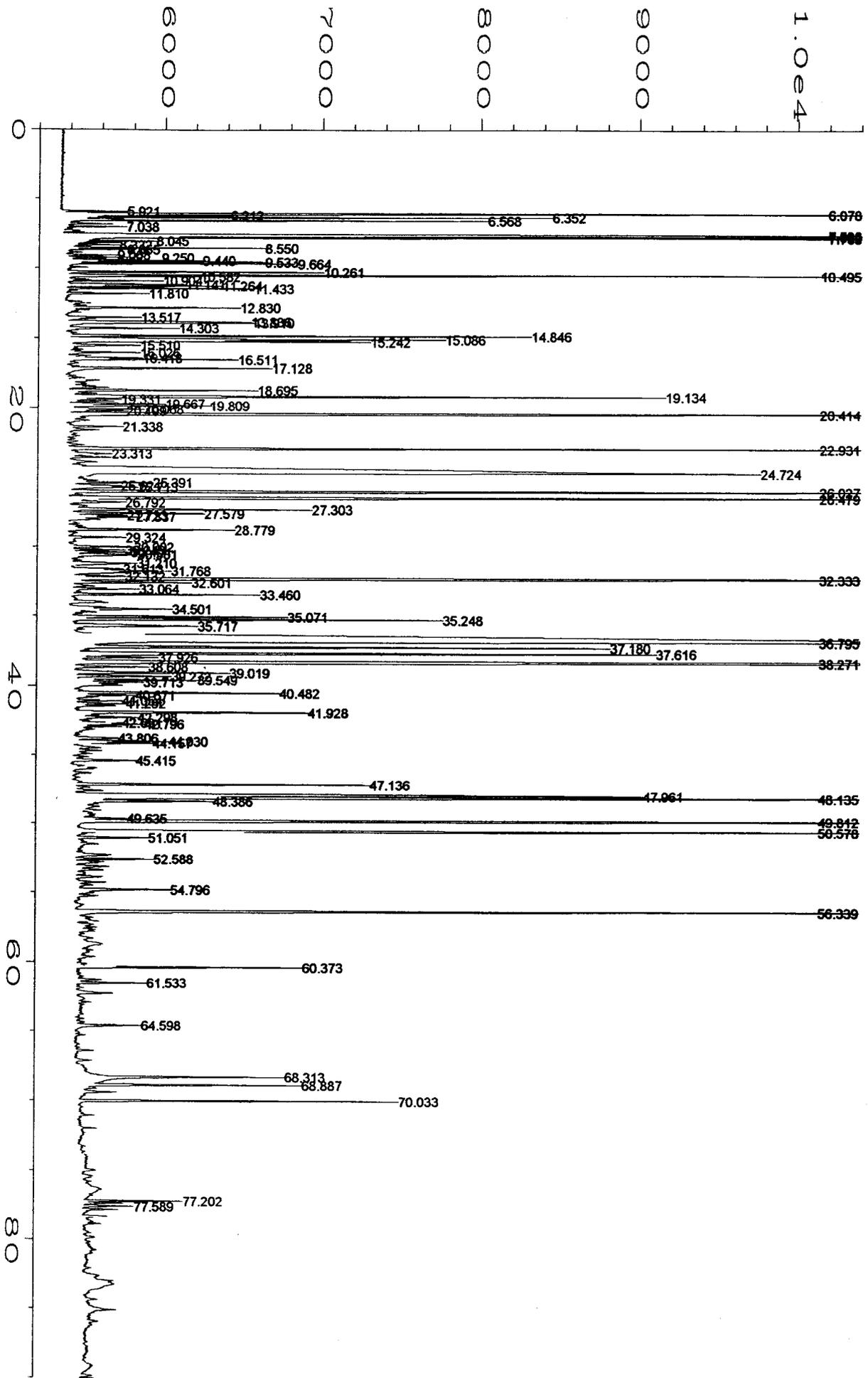


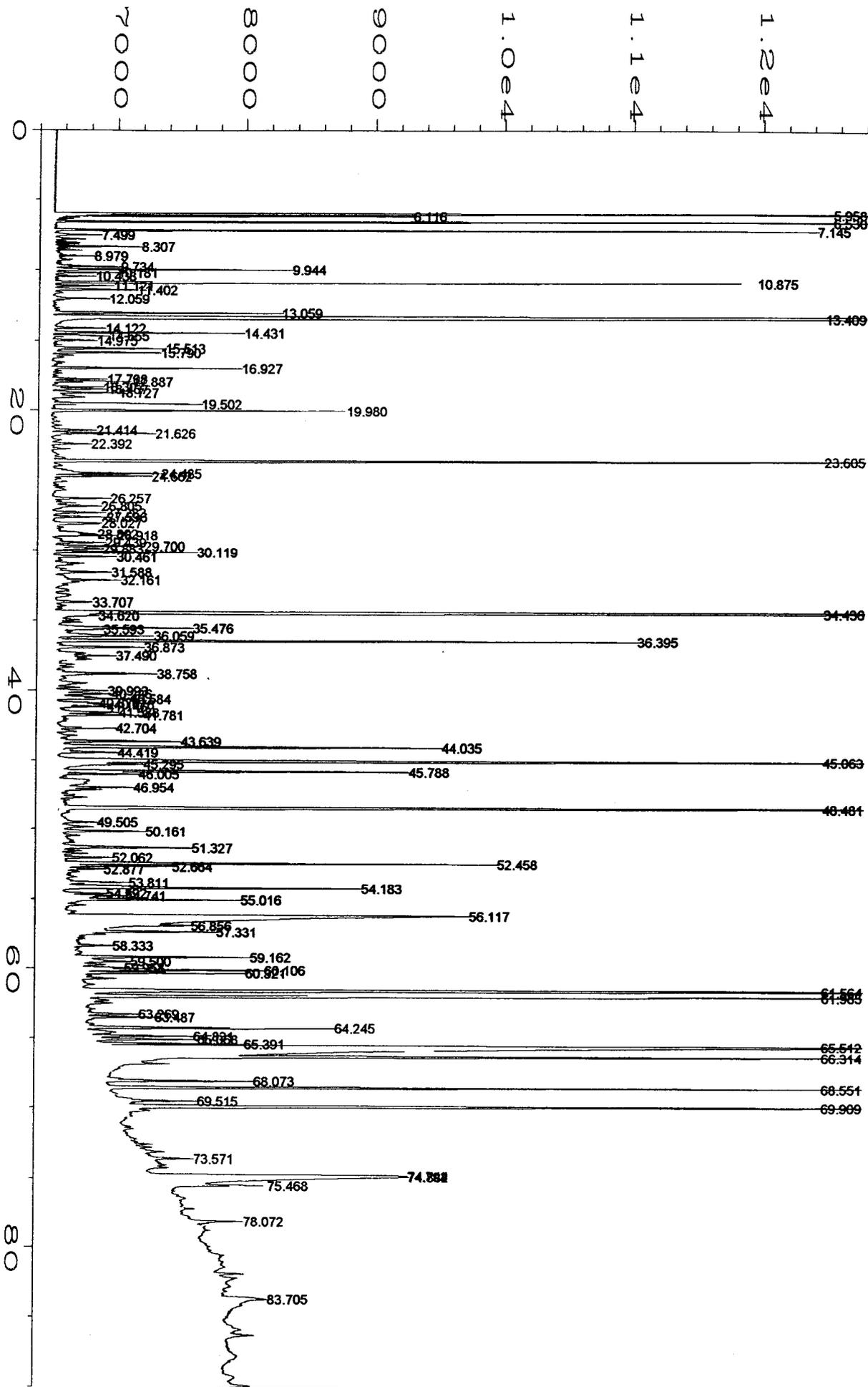
Annexe II : Analyse chromatographique sur colonne apolaire d'un extrait de distillat après une fermentation par la levure *Saccharomyces cerevisiae* sd13.

Annexe 12 : Analyse chromatographique sur colonne polaire d'un extrait de distillat après une fermentation par la levure *Saccharomyces cerevisiae* sd13.

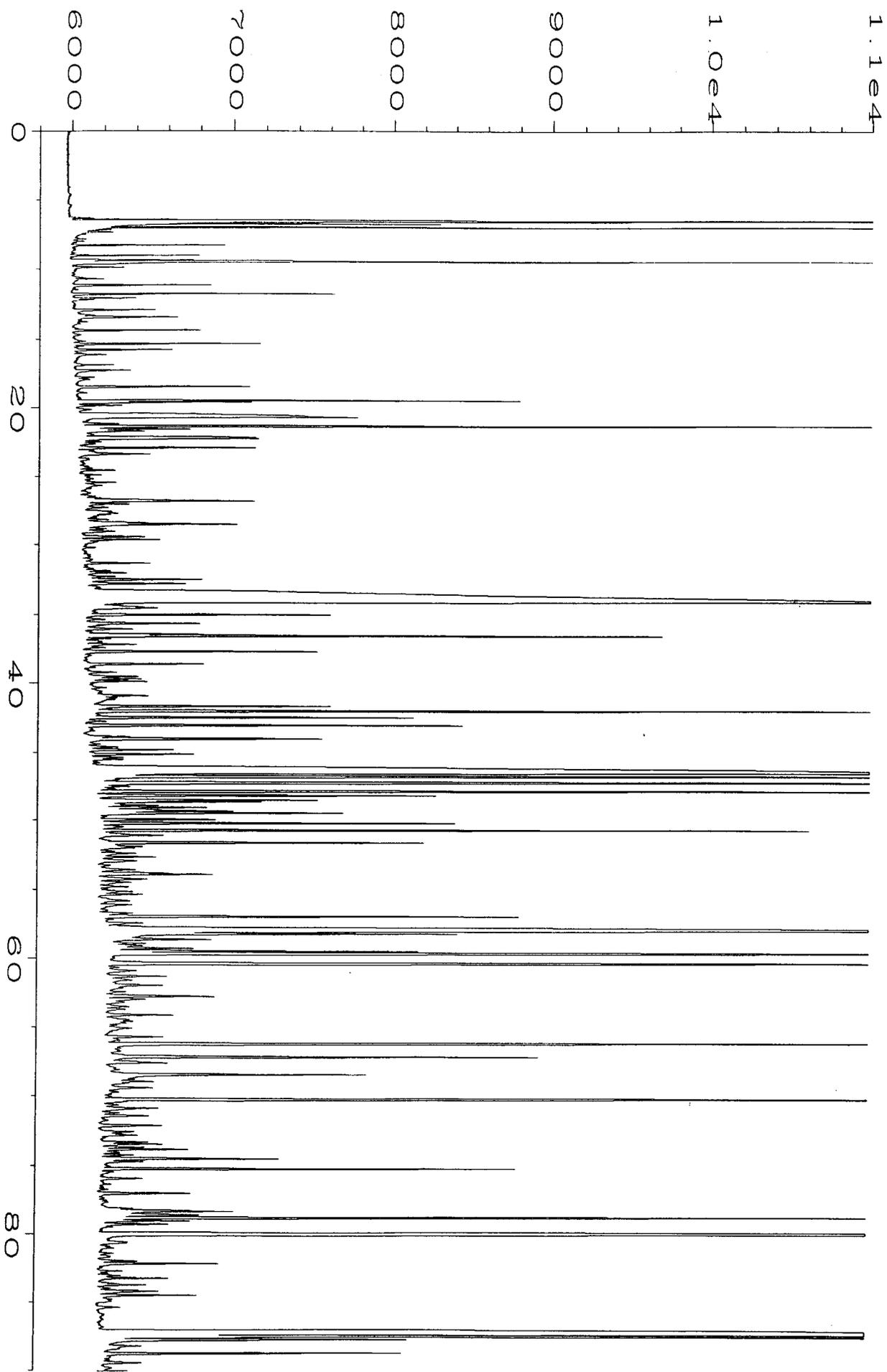


Annexe 13 : Analyse chromatographique sur colonne apolaire d'un extrait de distillat après une fermentation par la levure *Saccharomyces cerevisiae* 71b.

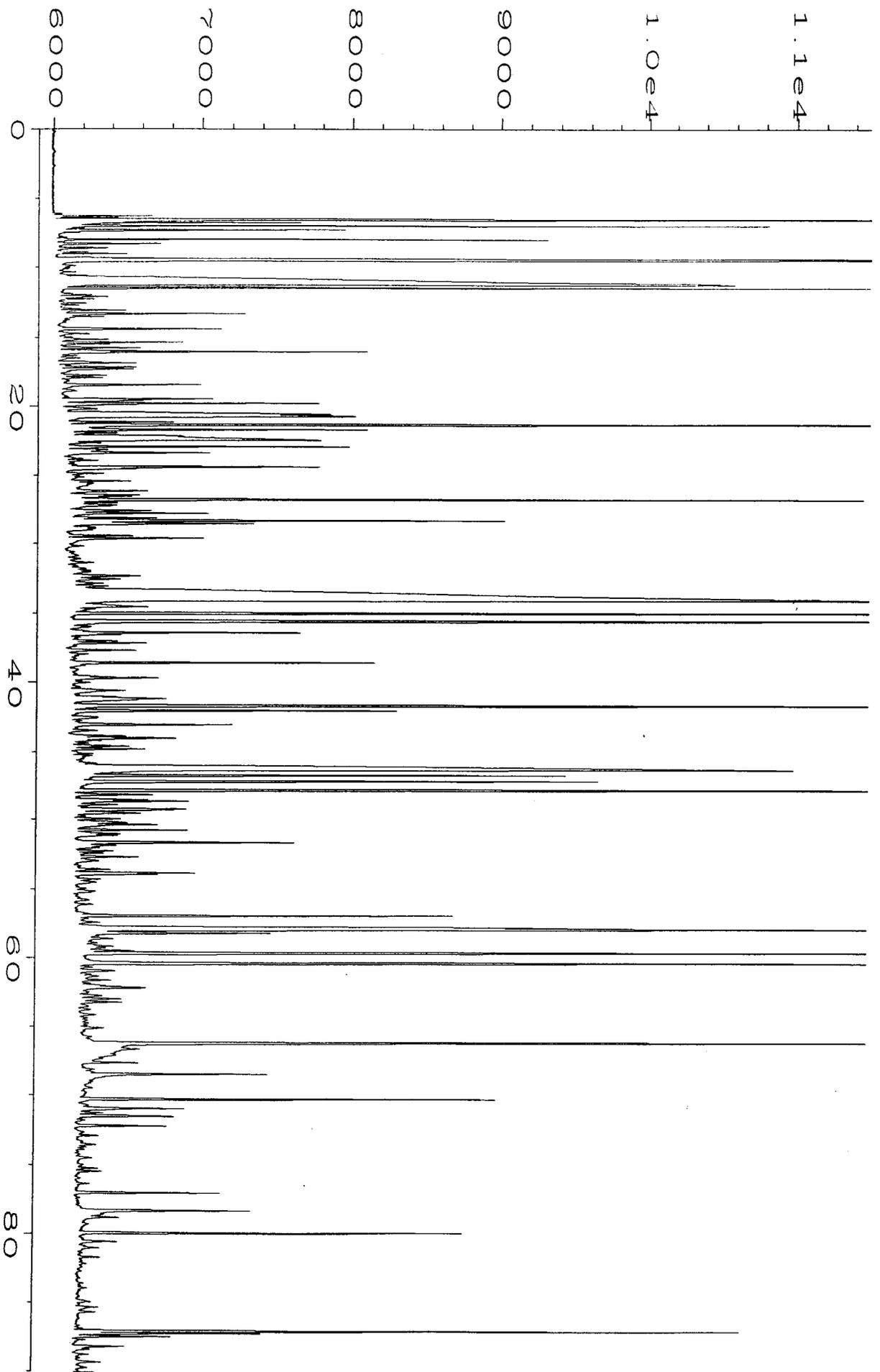




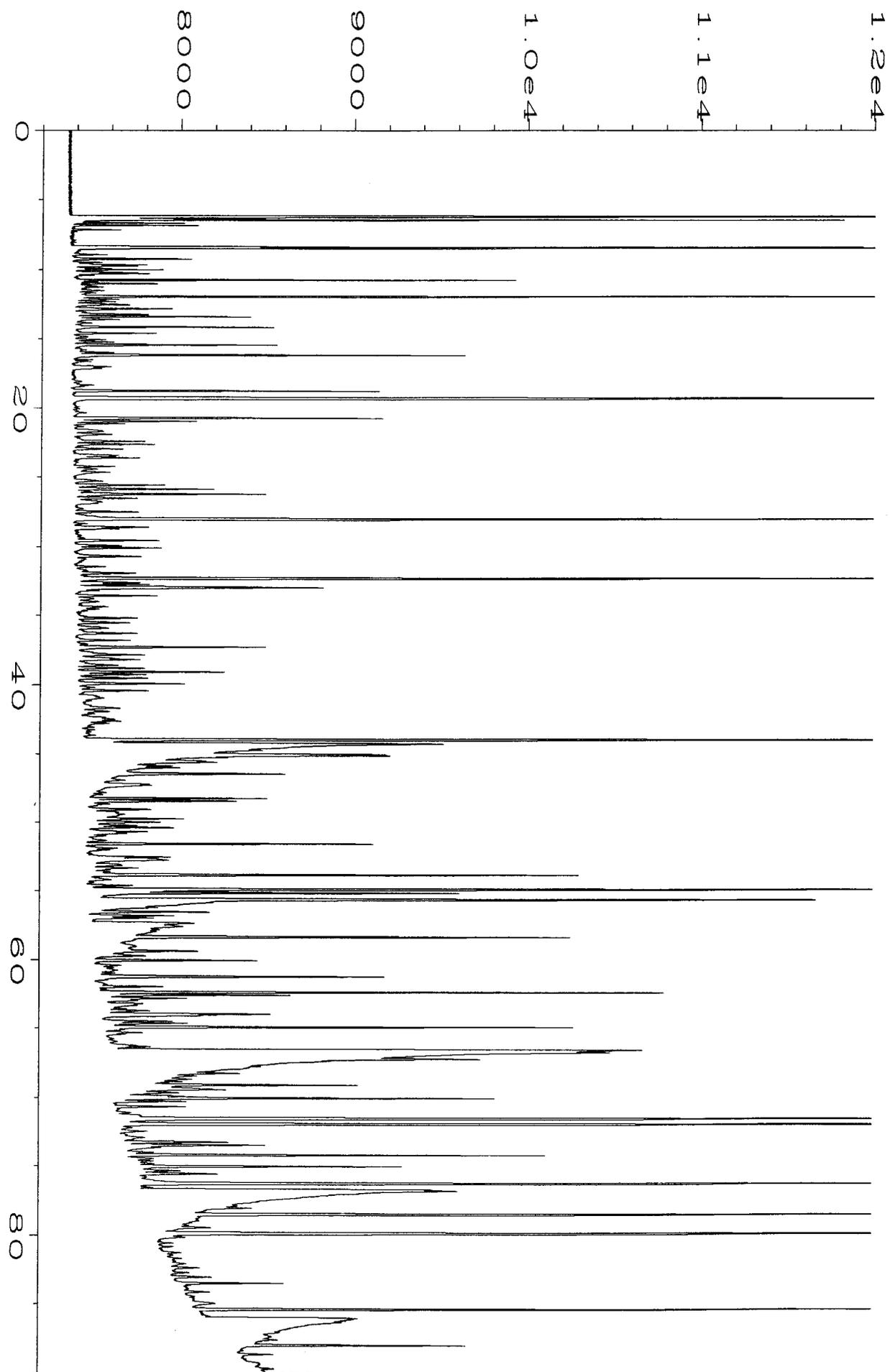
Annexe 14 : Analyse chromatographique sur colonne polaire d'un extrait de distillat après une fermentation par la levure *Saccharomyces cerevisiae* 71b.



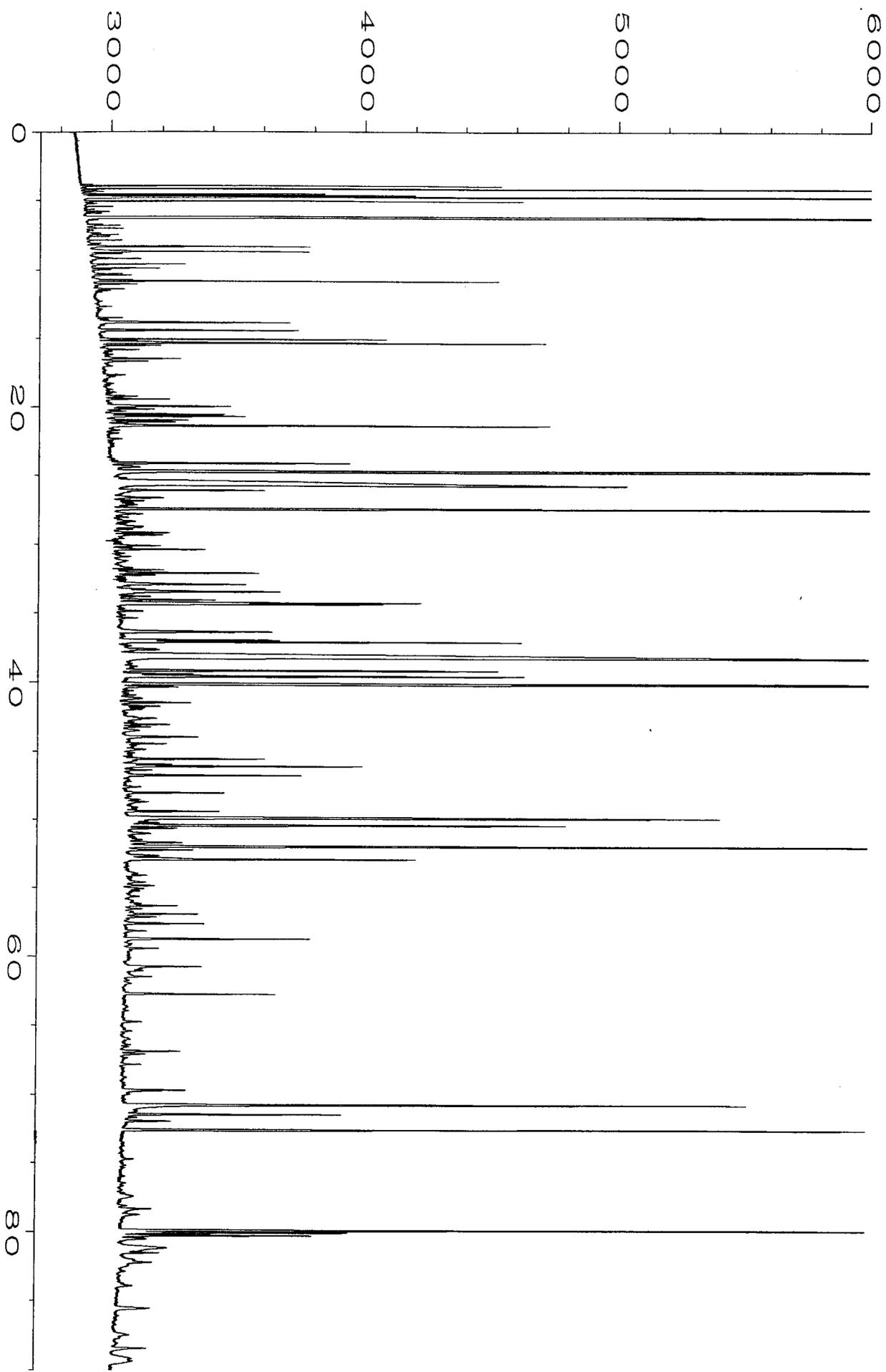
Annexe 15 : Analyse chromatographique sur colonne apolaire d'un extrait de distillat après une fermentation par la levure *Schizosaccharomyces pombe*.



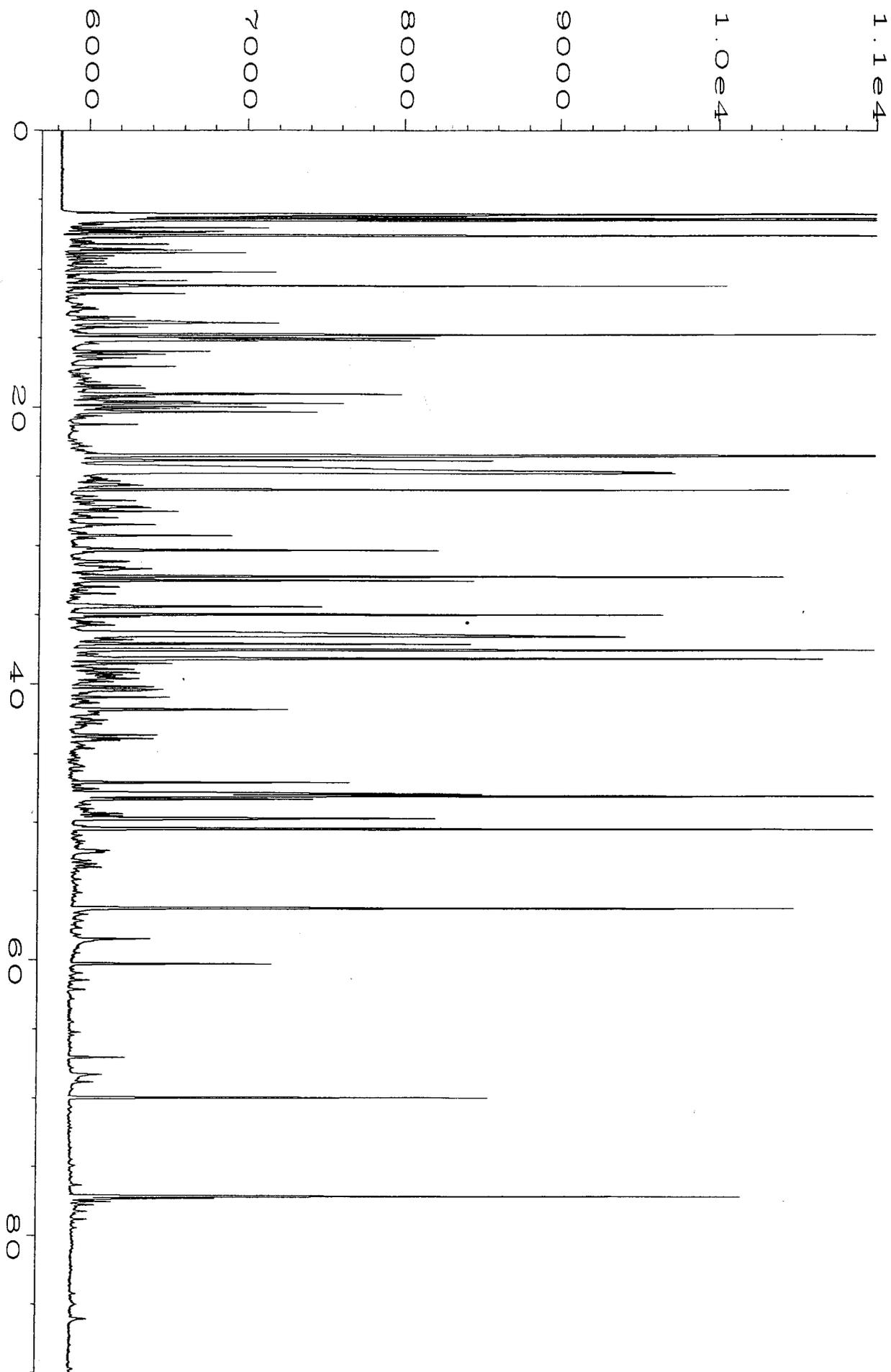
Annexe 16 : Analyse chromatographique sur colonne apolaire d'un extrait de distillat après une fermentation mixte avec un *Clostridium beijerinckii*.



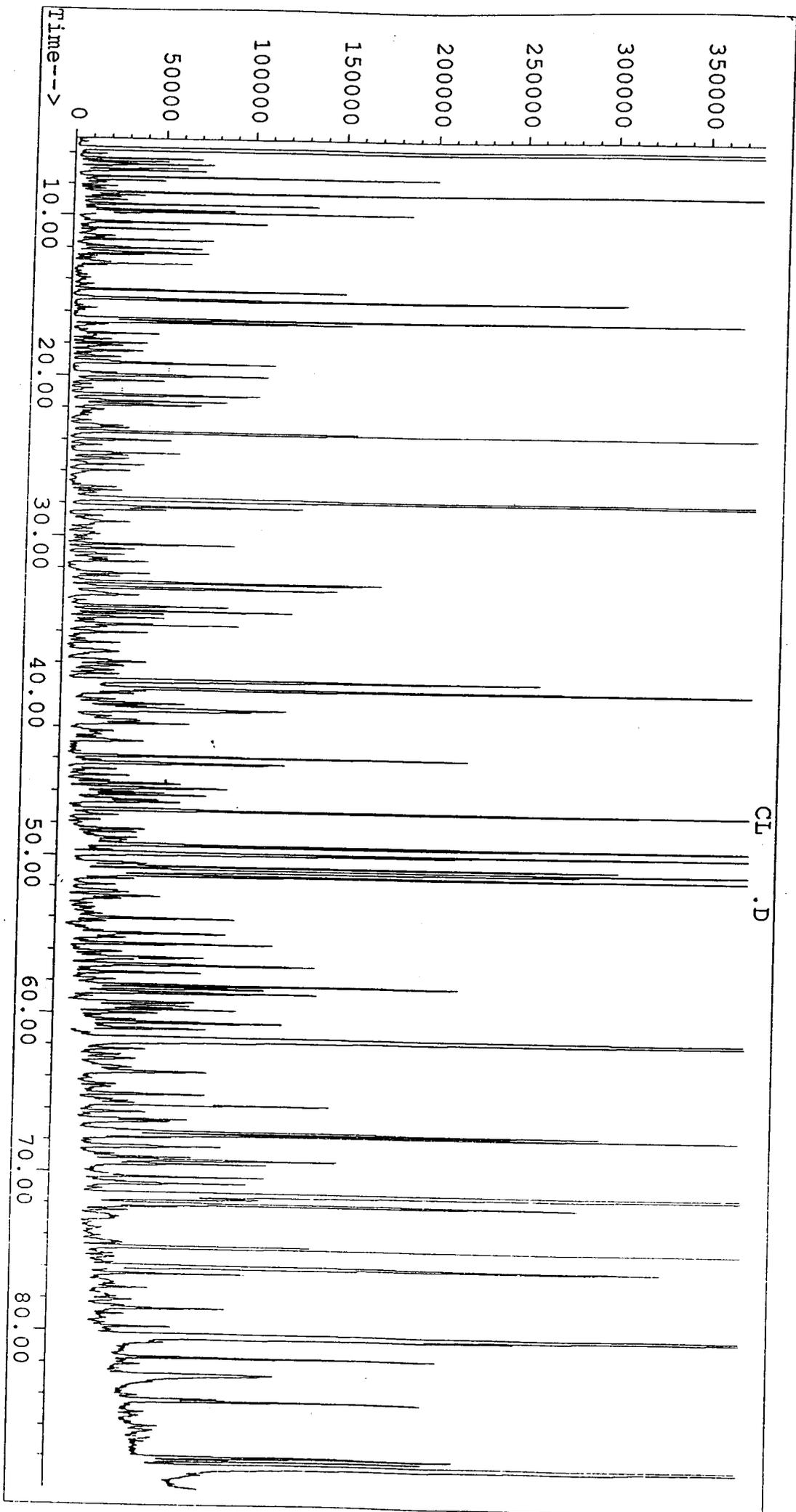
Annexe 17 : Analyse chromatographique sur colonne polaire d'un extrait de distillat après une fermentation mixte avec un *Clostridium beijerinckii*.



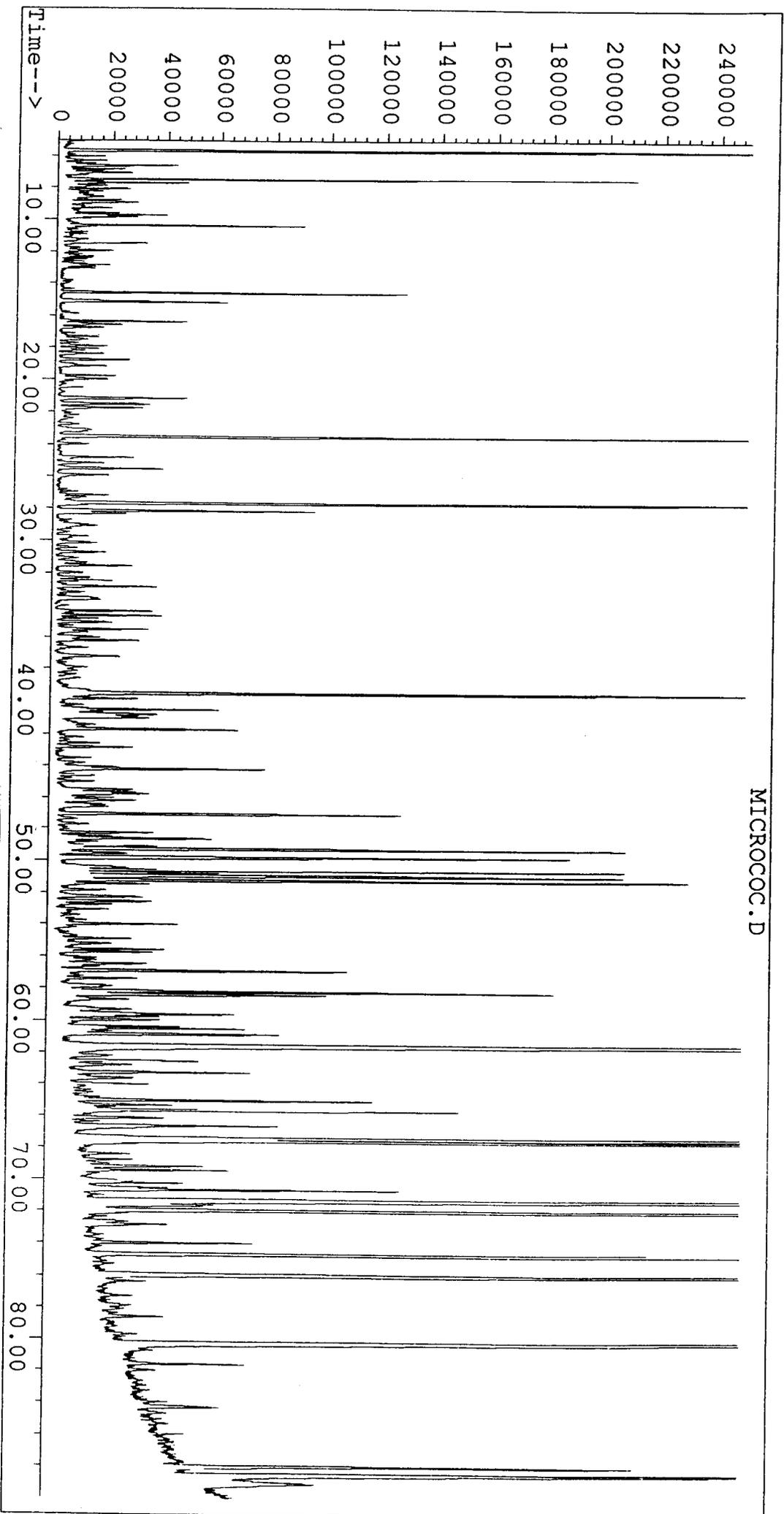
Annexe 18 : Analyse chromatographique sur colonne apolaire d'un extrait de distillat après une fermentation mixte avec un *Bacillus*.



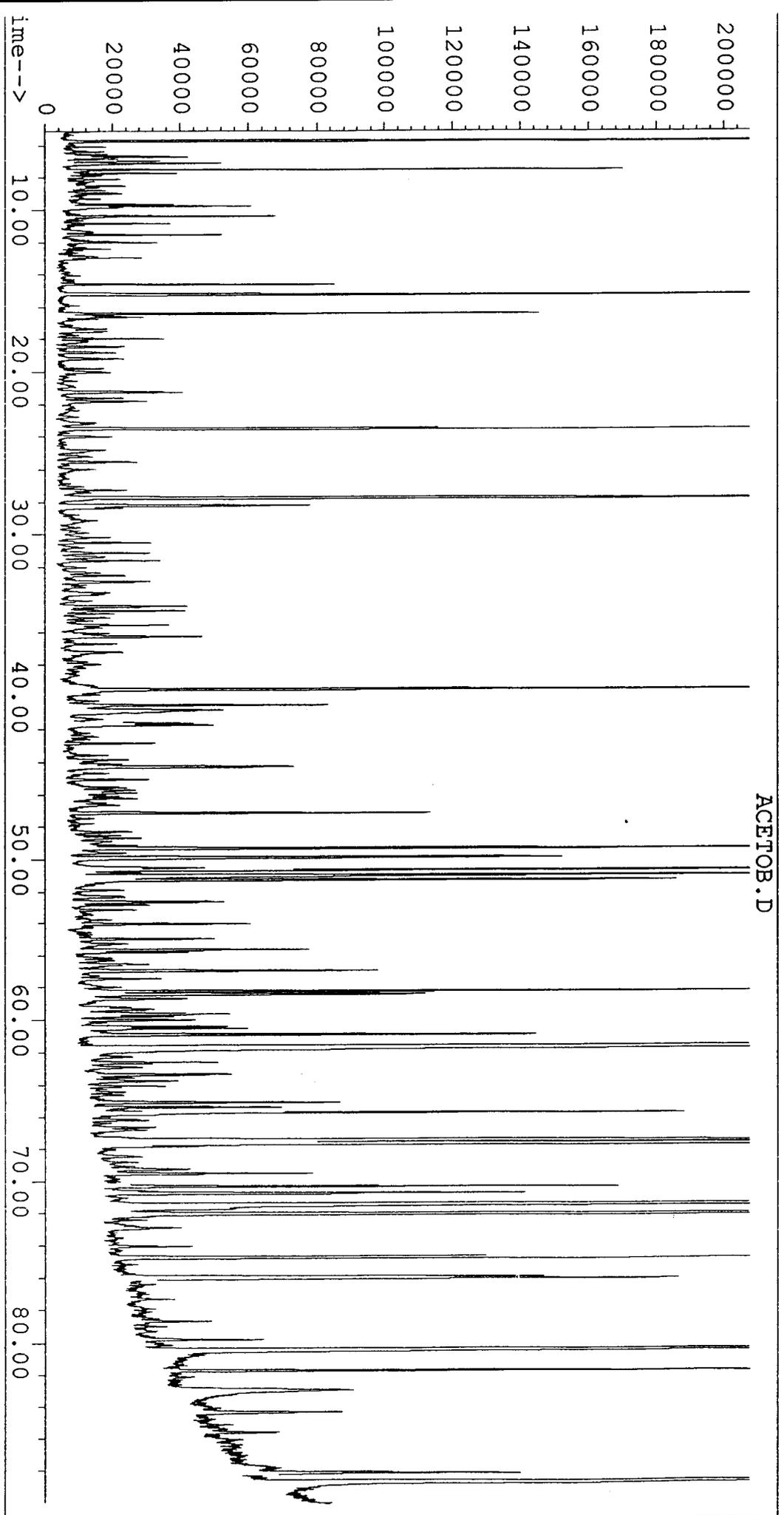
Annexe 19 : Analyse chromatographique sur colonne apolaire d'un extrait de distillat après une fermentation mixte avec un *Lactobacillus*.



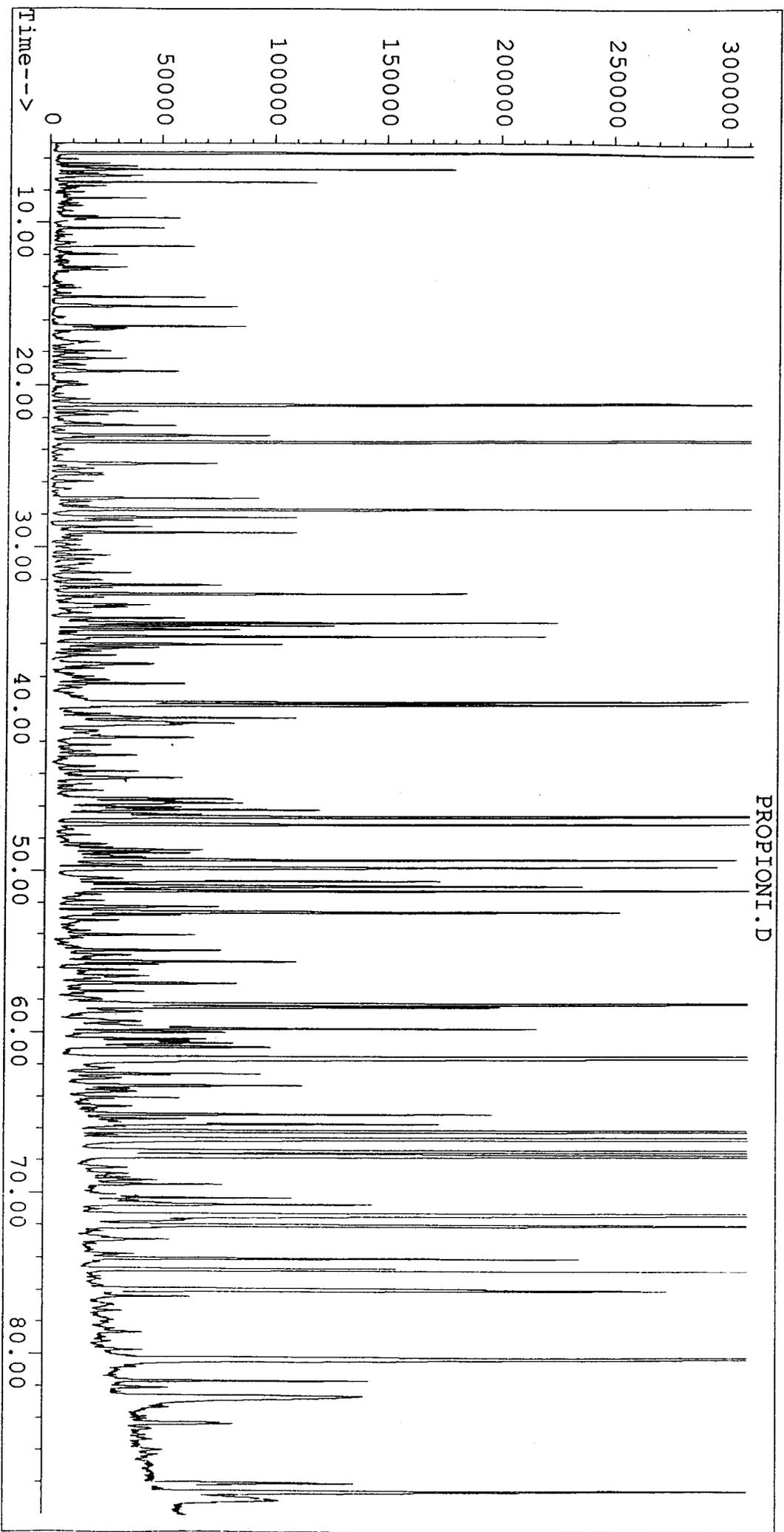
Annexe 20 : Analyse chromatographique sur colonne polaire d'un extrait de distillat après une fermentation mixte avec un *Clostridium butyricum*.



Annexe 21 : Analyse chromatographique sur colonne polaire d'un extrait de distillat après une fermentation mixte avec un *Micrococcus*.



Annexe 22 : Analyse chromatographique sur colonne polaire d'un extrait de distillat après une fermentation mixte avec un *Acetobacter*.



Annexe 23 : Analyse chromatographique sur colonne polaire d'un extrait de distillat après une fermentation mixte avec un *Propionibacterium*.

# TABLE DES MATIERES.

---

## CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

I- QU'EST CE QUE LE RHUM?	2
I-1. Origine du mot « rhum »	2
I-2. La technologie rhumière dans le temps.	2
I-3. Les étapes de fabrication du rhum de mélasse.	4
I-4. Définition des différents types de rhum.	6
II- LE RHUM ET LA REUNION : UN PEU D'HISTOIRE	8
III- L'IMPORTANCE ECONOMIQUE DE LA PRODUCTION RHUMIERE	11
CHAPITRE 2 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.	17
I- ETUDES MICROBIOLOGIQUES	18
I-1. Origine de la flore rhumière	18
I-1.1. Les levures responsables de la fermentation.	18
I-1.2. Les accidents de fermentation.	19
I-2. Les levures rencontrées dans le milieu rhumier.	23
I-2.1. Evolution des recherches.	23
I-2.2. Les différentes levures et leur impact sur la fermentation	24
I-3. Les bactéries rencontrées dans le milieu rhumier.	25
I-3.1. Evolution des recherches et résultats.	25
I-3.2. Les différentes familles de bactéries rencontrées et leur impact sur la fermentation.	26

II- ETUDES BIOCHIMIQUES	28
II-1. Les constituants majoritaires du non-alcool.	29
II-1.1. Définition du non-alcool.	29
II-1.2. Les alcools supérieurs.	29
II-1.3. L'acétate d'éthyle et l'éthanal.	30
II-1.4. L'acide acétique et le furfural.	39
II-2. Les constituants minoritaires du non-alcool.	39
II-2.1. Les composés indésirables.	41
II-2.2. Les composés utilisés pour caractériser les rhums.	41
 III- LES ETUDES SUR LA COMPOSITION CHIMIQUE DES RHUMS	 44
III-1. Origine de l'arôme du rhum.	45
III-2. Les composés du rhum.	46
III-2.1. Evolution des recherches.	46
III-2.2. Les différentes familles de composés et leur intérêt.	46
III-2.2.1. Les composés utilisés dans les appellations.	47
III-2.2.2. Les autres composés intervenant dans l'arôme.	48
III-3. Les rapports quantitatifs entre les composés.	50
 IV- CONCLUSION ET OBJECTIFS.	 51
 CHAPITRE 3 : ETUDE DE LA MATIERE PREMIERE : LA MELASSE	 54
I- L'ORIGINE DE LA MELASSE.	54
II- LA COMPOSITION DE LA MELASSE	56
II-1. Le brix.	56
II-2. Les sucres fermentescibles.	56

II-3. Les éléments minéraux et les acides organiques.	57
II-4. Les acides aminés.	59
II-5. Les composés aromatiques.	59
II-5.1. Analyse de l'espace de tête par SPME.	61
- Les composés possédant un noyau furanne	61
- Les composés azotés	64
- Les produits de dégradation des nor-caroténoïdes.	64
- Autres composés.	67
II-5.2. Analyse de la mélasse après extraction au Lickens.	68
- Les aldéhydes.	68
- Les alkylypyrazines.	71
- Les acides gras.	71
- Les alcanes.	74
- Les composés issus de la dégradation des nor-caroténoïdes.	74
- Les monoterpènes et les terpénols.	76
- Les composés phénoliques.	76
- Les cétones.	78
- Les alcools.	79
- Les autres composés.	79
III- CAS PARTICULIER DES PRECURSEURS D'AROME.	
LES TERPENES GLYCOSYLES ET LEUR POTENTIEL AROMATIQUE.	82
III-1. Les composés terpéniques.	82
III-1.1. Les terpènes.	82
III-1.2. Les hétérosides terpéniques.	84
III-2. Etude des hétérosides terpéniques de la mélasse.	87
III-2.1. Mode opératoire.	87
III-2.2. Résultats et discussion.	91

CONCLUSION.	93
CHAPITRE 4 : ETUDE DE L'INFLUENCE DE QUELQUES MICRO-ORGANISMES DANS LA FERMENTATION RHUMIERE.	94
I- LES LEVURES ETUDIEES.	94
I-1. Les levures du genre <i>Saccharomyces</i> .	95
I-1.1. Caractères morphologiques.	95
I-1.2. Caractères physiologiques.	95
I-2. Les levures du genre <i>Schizosaccharomyces</i> .	96
I-2.1. Caractères morphologiques.	96
I-2.2. Caractères physiologiques.	97
II- LES BACTERIES ETUDIEES	97
II-1. Les bactéries aérobies.	98
II-1.1. Les bactéries du genre <i>Acetobacter</i> .	98
II-1.2. Les bactéries du genre <i>Micrococcus</i> .	98
II-1.3. Les bactéries du genre <i>Bacillus</i> .	99
II-2. Les bactéries microaérophiles.	99
II-2.1. Les bactéries du genre <i>Lactobacillus</i> .	99
II-2.1.1. <i>Lactobacillus hilgardii</i> .	100
II-2.1.2. <i>Lactobacillus pentosus</i> .	100
II-2.2. Les bactéries du genre <i>Propionibacterium</i> .	100
II-3. Les bactéries anaérobies strictes :	
les bactéries du genre <i>Clostridium</i> .	102

III- ETUDE DES FERMENTATIONS	102
III-1. Evolution du degré alcoolique, du temps de fermentation et de l'acidité.	103
III-1.1. Les fermentations par les levures du genre <i>Saccharomyces</i> .	103
- Temps de fermentation.	105
- Le T.A.V.	105
- L'acidité.	105
- Evolution des paramètres au cours de la fermentation	105
III-1.2. Les fermentations par les levures <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .	107
- Temps de fermentation.	107
- Le T.A.V.	107
- L'acidité.	107
III-1.3. Les fermentations mixtes.	108
III-1.3.1. L'utilisation de bactéries aérobies.	108
- La souche <i>Acetobacter diazotrophicus</i> .	108
- La souche <i>Bacillus subtilis</i> .	110
- La souche <i>Micrococcus luteus</i> .	110
III-1.3.2. L'utilisation de bactéries microaérophiles.	110
- Les souches de <i>Lactobacillus</i> .	110
- La souches <i>Propionibacterium jensenii</i> .	111
III-1.3.3. L'utilisation de bactéries anaérobies : les souches de <i>Clostridium</i> .	111
III-2. Etude de la composition chimique des distillats.	112
III-2.1. Composition en méthanol, alcools supérieurs et en acétate d'éthyle.	112
III-2.1.1. Etude des fermentations levuriennes.	113
- Les souches de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	113
- La souche de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .	115

III-2.1.2. Etude des fermentations mixtes.	118
- Fermentation mixte avec la souche	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> sd13	118
- Analyses de la fermentation en présence	
du <i>Bacillus subtilis</i> .	118
- Analyses de la fermentation en présence	
d'un <i>Lactobacillus</i> .	121
- Analyses de la fermentation en présence	
d'un <i>Clostridium</i> .	121
- Fermentation mixte avec la souche	
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> .	125
III-2.1.3. Conclusion sur la composition	
en alcools supérieurs et en acétate d'éthyle.	127
III-2.2. Composition des distillats obtenus après fermentations.	128
III-2.2.1. Etude de la composition des distillats	
obtenus après des fermentations par des levures.	128
III-2.2.1.1. Composition des distillats obtenus	
après fermentation par les souches de	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	128
- Les alcools aliphatiques.	129
- Les terpénols.	129
- Les alcools cycliques.	137
- Les composés phénoliques.	137
- Les acides gras.	140
- Les esters.	140
- Les aldéhydes et les acétals.	144
- Les alkylpyrazines.	146
- Les cétones.	146
- Les hydrocarbures.	150
- Les composés soufrés.	150

III-2.2.1.2. Composition des distillats obtenus après fermentation avec la souche de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .	152
III-2.2.1.3. Comparaison des proportions relatives de quelques composés communs aux deux types de fermentation.	155
- Les esters éthyliques d'acides gras.	155
- Les acides gras.	157
- Les autres composés.	157
III-2.2.2. Etude de la composition des distillats après des fermentations mixtes.	162
III-2.2.2.1. Les composés nouvellement identifiés.	162
- Les alcools aliphatiques.	162
- Les dérivés terpéniques.	164
- Les cétones.	170
- Les esters.	170
- Autres composés identifiés.	170
III-2.2.2.2. Etude des proportions relatives de quelques composés communs à toutes les fermentations : recherche de critères de différenciation des micro-organismes.	175
- Les esters éthyliques.	176
- Les acides gras saturés.	180
- Les composés provenant de la dégradation des acides cinnamiques substitués.	180
- Le lactate d'éthyle, l'heptan-2-ol et le benzoate d'éthyle.	186
- Les terpénols, les alcools cycliques et la bêta-damascénone.	186
CONCLUSION	192

CHAPITRE 5 : CONCLUSION GENERALE	193
CHAPITRE 6 : MATERIELS ET METHODES	196
CHAPITRE 7 : BIBLIOGRAPHIE.	216
CHAPITRE 8 : ANNEXES	227
TABLE DES MATIERES.	251

**Année : 1997**

**NOM DE L'AUTEUR : MAGNET Raphaël**

**UNIVERSITE DE LA REUNION**

**RESUME :**

Le rhum de la distillerie de Savanna est obtenu après fermentation par les levures puis distillation d'un moût constitué de mélasse et d'eau.

Nous avons donc étudié la composition de la mélasse. Celle-ci se révèle riche en composés aromatiques qui sont à l'origine des nombreux composés chimiques présents dans les rhums. Nous avons identifié plus de 100 composés chimiques dans la mélasse dont un isomère de la bêta-damascénone. Cet isomère pourrait présenter les notes organoleptiques caractéristiques du rhum. Un travail particulier sur des précurseurs d'arômes existant sous forme glycosylée a été entrepris.

Puis nous avons étudié le comportement de sept souches de levure et de neuf souches de bactérie en fermentation. Certains paramètres de la fermentation ont été suivis. Nous avons ensuite travaillé sur la composition des distillats. Une étude quantitative et qualitative sur les composés des distillats a été menée. Elle permet de différencier les micro-organismes en fonction des composés chimiques formés pendant la fermentation. Plus de 250 composés ont été identifiés dont 11 n'avaient jamais été mentionnés auparavant dans les rhums.

Ce travail permet de se rendre compte de l'importance de la composition de la matière première utilisée et de la nature du micro-organisme employée pendant la fermentation, dans la composition finale du produit.

**MOTS CLES : Arôme, Bactérie, Composés aromatiques, Extraction, Fermentation, Levure, Mélasse, Rhum.**

**KEY WORDS : Aroma, Bacteria, Aromatic compounds, Extraction, Fermentation, Yeast, Molasses, Rum.**