J. Int. Sci. Vigne Vin, 1997, **31**, n°2, 85-92

ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE QUANTITATIVE DES GAZ ÉMIS ET ÉTABLISSEMENT DU BILAN CARBONE LORS DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE

GAS CHROMATOGRAPHIC QUANTITATIVE ANALYSIS OF THE GASEOUS EMISSIONS AND CARBON BALANCE IN THE ALCOHOLIC FERMENTATION

C. CHON*, A. POULARD** et C. RABILLER*

*Laboratoire de Recherches en Biocatalyse, Faculté des Sciences et des Techniques
2, rue de la Houssinière, B.P. 92208, 44322 Nantes cedex 3 (France)
Email : rabiller@chimbio.sciences.univ-nantes.fr
**Institut Technique de la Vigne du Vin, Château de la Frémoire, 44120 Vertou (France)

Résumé : Ce travail décrit une méthode qui utilise la chromatographie en phase vapeur pour analyser quantitativement les principaux composés (dioxyde de carbone et éthanol) constituant les émissions gazeuses de la fermentation alcoolique. Les résultats obtenus, joints à ceux résultant de l'analyse de la phase liquide par RMN quantitative du ^{13}C, permettent d'établir un bilan du devenir de la masse carbonée. On montre que sous certaines conditions de balayage par l'air de l'espace de tête du fermenteur, 10 p. cent de l'éthanol synthétisé s'est évaporé au cours du processus de fermentation. Les expériences ainsi présentées sont susceptibles d'expliquer les pertes en éthanol observées lors de certaines vinifications en cuve ouverte.

Abstract : The balance of the carbon transfers occuring during the fermentation of sugar is still poorly defined. To our knowledge, no description exists which accounts at each moment of the process for the components in the liquid phase and the evolution of the gaseous carbon components. However, this question is of prime importance for the vinification process. The gap between the concentration of fermentable sugars in a must and the theoritical potential alcoholic degree is always significant. The same is true for chaptalisation, in which vinters generally use more sugar than needed to obtain a given alcoholic degree. In both cases, the question is : what happens to the carbon matter lost. Is it transformed into liquid and/or gaseous metabolites or simply evaporated as ethanol or as other volatile components ?
In order to try to answer this question, methods able to analyse simultaneously and quantitatively the liquid phase, the gaseous emissions and the biomass are needed. Recently, we have shown that under suitable defined conditions ^{13}C NMR spectroscopy allows the quantitative measurement of at least eight components present at a concentration up to 5 x 10^{-3}M (glycerol, glucose, butandiols, tartric, malic, lactic, citric and succinic acids) in a short time (one hour) with a precision of about 3 p. cent. The measurements of the ethanol concentrations and of the amount of carbon transferred in the biomass are easily achieved using respectively ebullioscopic and standard combustion techniques. We are now able to extend these results and to show that, by using gas chromatography in a continuous dynamic mode and under a sweep of air at the head space of the fermentor, it is possible to measure quantitatively the mixture of volatile substances (composed mainly of air, carbon dioxide, ethanol and water) emanating from an alcoholic fermentation. The results obtained, when correlated with quantitative ^{13}C NMR spectroscopy on the medium components permits the total balance sheet of the carbon transfers occuring during the fermentation process between the liquid and the gaseous phases to be established. Our results indicate that the losses of ethanol during the fermentation process conducted under an air flow at the head space of the fermentor, may reach about 10 p. cent of the theoretical maximal amount of ethanol produced. The experiments presented here could explain the ethanol losses observed during some vinification processes conducted in open tanks.

Mots clés : chromatographie phase vapeur, fermentation, composés volatils, bilan carbone

Key words : gas phase chromatography, fermentation, volatile components, carbon balance

INTRODUCTION

L'étude quantitative du transfert de carbone intervenant entre les phases liquide et gazeuse lors de la fermentation alcoolique n'a pas été effectuée de façon systématique jusqu'à présent. Ainsi, à notre connaissance, les conditions analytiques permettant d'établir un bilan carbone total à chaque instant d'une fermentation n'ont pas été décrites. Pourtant cette question est de première importance en vinification du fait de la différence souvent significative entre le degré alcoolique espéré sur la base de la concentration en sucres dans

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

les moûts et le degré réellement obtenu. Dans le même ordre d'idée, lors de la chaptalisation des vins, on utilise, en général, une quantité de sucre supérieure à celle théoriquement nécessaire pour atteindre le degré désiré. Ainsi, afin d'augmenter le degré d'un vin rouge d'une unité, on considère qu'il faut 17 g de saccharose. Un simple calcul supposant la conversion totale du sucre en éthanol et en glycérol (lesquels représentent 99 p. cent de la masse carbonée en fin de fermentation dans le milieu de fermentation) montre que seulement 15 g sont suffisants. La même question se pose dans ces deux exemples : comment peut-on expliquer la perte en masse carbonée? Y-a-t-il apparition de métabolites éventuellement présents en quantité suffisante dans les phases gazeuse ou liquide ou s'agit-il d'évaporation de l'éthanol ou d'un autre composé volatil?

Les travaux décrits dans la littérature à ce sujet, bien que très abondants, sont d'une part relativement anciens (AMERINE et JOSLYN, 1991) et traitent ces questions de façon incomplète en général. Ainsi, l'éthanol évaporé lors de fermentations a été quantifié par diverses méthodes, mais ni la phase liquide, ni la présence d'autres composés volatils ne sont analysées en parallèle (ZIMMERMAN *et al.*, 1964 ; NÈGRE, 1946 ; NÈGRE et MARICHAL, 1950 ; MATHIEU L. et MATHIEU R., 1938 ; FLANZY et BOUDET, 1949 ; WARKENTIN et NURY, 1963). Des modèles théoriques ont également été proposés pour rendre compte des pertes en éthanol par évaporation (STRADELLI, 1951 ; BOULTON, 1979 ; CARO *et al.*, 1991). Les pertes alcooliques constatées lors de ces expériences ou prévues à l'aide des modèles théoriques n'excèdent jamais 1,5 p. cent. Ces valeurs ne permettent pas de rendre compte de la disparition de matière carbonée observée par exemple lors de la chaptalisation au cours de laquelle le devenir d'environ 10 p. cent de la matière carbonée reste inexpliqué (voir ci-dessus).

La mise au point de méthodes capables d'analyser qualitativement et quantitativement les constituants de la phase liquide, des émissions gazeuses et la biomasse simultanément s'avère ainsi nécessaire. Il est connu que la RMN du ^{13}C constitue une bonne technique pour analyser les vins (RAPP et MARKOWETZ, 1989 ; 1990 ; 1993 ; RAPP *et al.*, 1989 ; 1991). Nous avons récemment montré que cette technique utilisée sous certaines conditions permettait de déterminer les concentrations d'au moins huit composants majoritairement présents dans le vin (pour des concentrations supérieures à 5×10^{-3} M) dans un temps raisonnable (1 h) avec une précision d'environ 3 p. cent (CHON *et al.*, 1996). La mesure de la quantité de carbone transférée des sucres vers la biomasse s'effectue aisément en utilisant les techniques standards de combustion. L'objectif de ce travail est de montrer qu'en utilisant la chromatographie en phase gazeuse (CPG) sous certaines conditions, il est alors possible de déterminer quantitativement les gaz émanant d'une cuve en fermentation. Les résultats ainsi obtenus joints à ceux obtenus par RMN ^{13}C et analyse de la biomasse permettent d'établir un bilan carbone complet à chaque instant du processus fermentaire.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I — ANALYSE QUANTITATIVE PAR CPG

1) Chromatographe

Le chromatographe utilisé est un Varian 3300 équipé d'un catharomètre (T = 180°C, température du filament = 200°C). Les échantillons sont introduits dans une boucle d'injection (volume = 280 ml) à T = 180°C. Le gaz vecteur est l'hélium (qualité C, Air Liquide). Le mélange de gaz est tout d'abord séparé sur une première colonne de Porapak Q (longueur de la colonne : 2 m, diamètre : 0,32 cm). Cette opération permet la séparation de l'air, du dioxyde carbone et l'eau. On place une seconde colonne de tamis moléculaires (tamis 3 Å, longueur : 2 m, diamètre : 0,32 cm) à la sortie du détecteur et à l'extérieur du four. Cette colonne également connectée au catharomètre (figure 1), permet de capter l'eau et assure une meilleure séparation du mélange gazeux (oxygène et azote se trouvent ainsi détectés individuellement). Le retour de ces gaz au détecteur s'effectuant sur une polarité inverse de l'initiale, les pics apparaissent alors en négatif (figure 2). Le chromatogramme représenté en figure 2 montre dans l'ordre de sortie, les pics d'air, de dioxyde de carbone, puis après passage dans la seconde colonne les pics d'oxygène et d'azote. L'éthanol est détecté au bout de 18 minutes à la sortie de la première colonne. La programmation de température utilisée pour le four est : 5 min à 50°C, 50°C/min jusqu'à 120°C, 120°C pendant 5 min, 50°C/mn jusqu'à 240°C, 240°C pendant 6 min. Les chromatogrammes et l'intégration des pics ont été réalisés grâce à un enregistreur-intégrateur Spectra-Physics SP-4290.

2) Préparation des mélanges de gaz pour l'établissement des courbes d'étalonnages

Les échantillons de concentrations connues en éthanol et en dioxyde de carbone dans l'air sont préparés dans un tube en U de volume connu (25 ml) muni à chaque extrémité de deux robinets étanches (Kontes™) et équipé d'un septum sur la partie inférieure. Ce tube est placé dans une enceinte chauffante. Des quantités connues d'éthanol (0 à 5 p. cent en rapport molaire éthanol/air) ou de dioxyde de carbone (0-100 p. cent en

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

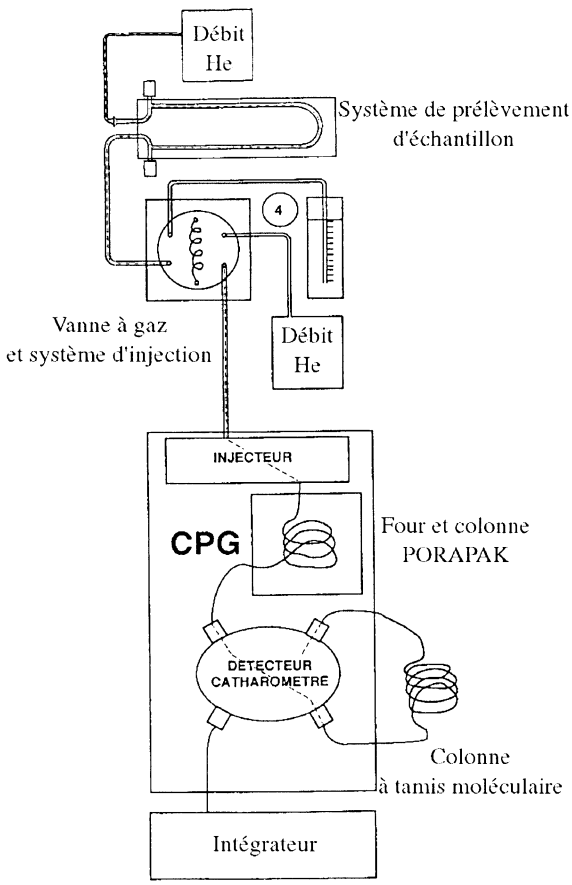


Fig. 1 — Schéma du montage utilisé pour l'analyse quantitative des effluents volatils en chromatographie phase gazeuse

Fig. 1 - Scheme of the apparatus used for the quantitative analysis of the volatile effluents by means of gas chromatography

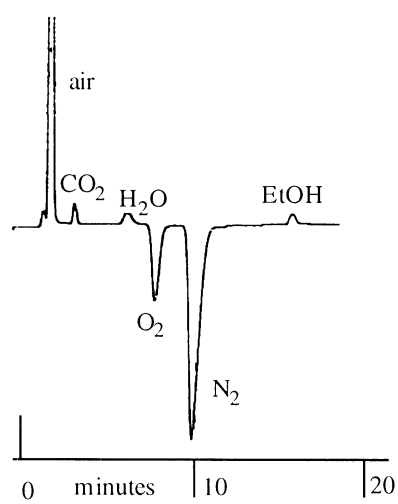


Fig. 2 — Chromatogramme d'un mélange d'effluents volatils émanant du fermenteur

Fig. 2 — Gas chromatogram of the volatile effluents emanating from the fermentor

rapport molaire dioxyde de carbone/air) sont introduites dans le tube en U par l'intermédiaire du septum alors que l'un des robinets est ouvert. On ferme ce dernier et le mélange est chauffé à 120°C avant d'être introduit dans l'injecteur du chromatographe. Cette dernière opération est réalisée en poussant le mélange de gaz dans la boucle d'injection grâce à un courant d'hélium. Afin de dégazer la boucle d'injection, on effectue son remplissage à trois reprises avant d'en diriger le contenu vers la colonne Porapak. Chaque mesure est répétée 5 fois.

3) Collecte des échantillons gazeux

Le couvercle du fermenteur est équipé de deux ouvertures. L'une d'entre elles est utilisée pour introduire un courant d'air de débit connu (5 l/min) balayant la surface de la phase liquide. Le volume total de gaz est mesuré à l'entrée et à la sortie fermenteur grâce à deux compteurs à gaz hydrauliques. Une dérivation placée en sortie de cuve permet la collecte des échantillons gazeux contenant les substances volatiles émanant du réacteur. On utilise à cet effet un tube en U identique à celui décrit en 2). L'analyse chromatographique de ces échantillons s'effectue également de manière identique à celle des gaz étalons.

II — ANALYSE DE LA PHASE LIQUIDE PAR RMN DU ^{13}C

La procédure utilisée a déjà décrite dans une publication antérieure (CHON *et al.*, 1996).

II — MESURE DU DEGRÉ ALCOOLIQUE

Elle est effectuée grâce à l'ébulliomètre Dujardin-Salleron. Bien que non officiellement reconnue, cette méthode est commode de par sa rapidité. On peut estimer la précision sur les degrés alcooliques à 2 p. cent.

IV — FERMENTATION DU GLUCOSE PAR LA LEVURE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Les fermentations sont conduites dans un réacteur hermétiquement clos et muni, ainsi qu'indiqué plus haut, de deux orifices permettant l'entrée et la sortie des gaz. Un robinet, disposé sur la partie inférieure, est utilisé pour collecter les échantillons liquides pour l'analyse RMN et la mesure du degré alcoolique. Un manomètre gradué permet la mesure du volume de la phase liquide. On introduit 25 l d'eau distillée avec 120 g de sulfate d'ammonium, 90 g de de phosphate de potassium dibasique (anhydre), 30 g de sulfate de magnésium et 33,2 M de glucose monohydrate (6576 g correspondant à 5979 g de glucose anhydre). Le pH de la solution est ajusté à 5,5 avec une solution 1M de soude. On ajoute alors de l'eau distillée pour compléter exactement le volume à 30 l. Le milieu est alors

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

ensemencé avec 15 g de levure *Saccharomyces cerevisiae* (Type II, Sigma). Au bout de 10 jours d'incubation à température ambiante, le glucose est entièrement consommé. Pendant la durée de la fermentation, un débit d'air de 5 l/min, balayant la surface du liquide, est introduit dans le fermenteur. Tous les produits chimiques fournis par Aldrich ont été utilisés sans purification ultérieure.

IV — MESURE DU CARBONE ORGANIQUE TOTAL

Le carbone organique total dans les levures avant et après la fermentation est déterminé grâce à un analyseur élémentaire Carlo Erba NA-1500-1.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

I — OPTIMISATION DES CONDITIONS DE MESURE EN CPG

L'analyse quantitative des gaz émanant du fermenteur suppose que l'on dispose d'une méthode permettant de recueillir des échantillons représentatifs de la situation à un instant donné. A cette fin, nous avons mis en œuvre la procédure suivante : le réacteur est clos, cependant, deux ouvertures aménagées sur la partie supérieure permettent l'introduction d'un courant d'air (débit constant de 5 l/min) et l'expulsion du mélange gazeux contenant en particulier les effluents de la cuve. Le brassage ainsi produit à la surface du liquide permet une homogénéisation rapide du mélange gazeux présent au-dessus du liquide. Par ailleurs, l'air ainsi introduit est supposé modéliser les mouvements naturels de l'air à la surface d'une cuve dans une cave. Il est difficile d'apprécier si le débit choisi présente une analogie avec la réalité qui de plus doit être extrêmement variable selon les situations. Cependant, compte tenu des conditions expérimentales utilisées (voir partie expérimentale), on constate que l'air au-dessus de la cuve est renouvelé chaque minute. Un tel mouvement des gaz ne semble pas déraisonnable dans le cas de vinifications menées en cuve ouverte. Par ailleurs, un débit de cette intensité est également nécessaire si l'on veut entraîner des volumes suffisants d'effluents gazeux pour en réaliser une mesure quantitative la plus exacte possible.

L'analyse des chromatogrammes des effluents gazeux révèle la présence d'air, de dioxyde de carbone, d'eau et d'éthanol comme seuls composants. D'autres substances sont probablement présentes en très faibles quantités. Nous les avons négligées car elles représentent moins de 0,5 p. cent de la masse carbonée totale. De tels composés existant dans les boissons alcoolisées (esters, aldéhydes, acides...) et participant à l'arôme ont pu être analysées par CPG dans des conditions très différentes de celles utilisées dans ce travail (JOURET et MOUTOUNET, 1970 ; LAVIGNE *et al.*, 1993 ; HABA *et al.*, 1993) ou par chromatographie liquide haute pression (SUAREZ *et al.*, 1996 ; GARCIA-ROMERO *et al.*, 1993).

S'il est relativement aisé de mesurer la composition des gaz composant les effluents à un instant donné, un autre problème est de déterminer pour chacun la quantité totale émise pendant toute la durée de la fermentation. La solution idéale consisterait à effectuer un très grand nombre de mesures aussi rapprochées que possible dans le temps et de réaliser une sommation de l'ensemble des résultats. La justesse des mesures dépend donc dans une large mesure du laps de temps qui s'écoule entre chaque prélèvement et de la variabilité des événements susceptibles de s'y produire. Prenant en considération la durée de la fermentation (environ 10 jours), nous avons fait l'hypothèse que l'on pouvait espacer les mesures d'une heure et qu'en ce laps de temps, le système variait de façon linéaire. A l'aide des chromatogrammes enregistrés à chaque heure et connaissant le volume gazeux émis en sortie de cuve, la somme des résultats obtenus permet dans ces conditions de calculer la quantité totale de chacun des composés volatils émis.

Les prélèvements d'échantillons s'effectuent par une dérivation disposée à la sortie de la cuve à l'aide d'un tube en U (voir partie expérimentale). Nous avons évalué la répétabilité du système de prélèvement à l'aide d'un mélange constitué d'eau, d'éthanol et de dioxyde de carbone en concentrations connues en utilisant comme test de comparaison la surface des pics du chromatogramme. Au début de nos expériences, la répétabilité s'est avérée mauvaise du fait de la liquéfaction aisée de l'éthanol et de l'eau. Nous avons par contre trouvé une excellente répétabilité dès que les parties « froides » (la boucle d'injection, les tubulures de connection, et la vanne six voies permettant l'injection des gaz) du chromatographe et l'échantillon ont été portées à une température de 120°C à l'aide d'un ruban de chauffage.

Les courbes d'étalonnage pour le dioxyde de carbone et l'éthanol (figures 3 et 4) ont été établies dans les domaines de rapports molaires éthanol/air et dioxyde de carbone/air respectivement de 0-5 p. cent et 0-100 p. cent. L'utilisation de ces domaines de concentration est justifiée par la faible concentration en éthanol dans l'air même lorsque le degré alcoolique est élevé alors que le rapport entre le nombre de moles d'air et de CO_2 peut atteindre 1 en cours de fermentation. Les conditions requises à l'analyse quantitative par CPG

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

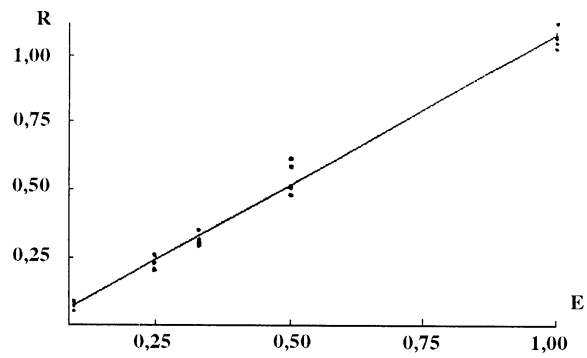


Fig. 3 — CPG, courbe d'étalonnage du dioxyde de carbone

R = 7,46 x 10^{-3} + 1,066 E (R est le rapport entre les intégrales des pics du dioxyde de carbone et de l'air, E est le rapport entre les fractions molaires du dioxyde de carbone et l'air. Déviations standards sur a et b : S_a = ± 3, 2 x 10^{-2} et S_b = ± 0,055, erreur standard σ = 0,037, coefficient de régression linéaire r^2 = 0.989, valeurs déterminées à partir de 25 points (MILLER, 1991).

Fig. 3 — Gas chromatography, calibration curve for carbon dioxide

R = 7.46 x 10^{-3} + 1.066 E (R is the ratio between the integrals of the peaks for carbon dioxide and air, E is the ratio between the molar fractions of carbon dioxide and air). Standard déviations for a and b : S_a = ± 3.2 x 10^{-2} and S_b = ± 0.055, standard error s = 0.037, linear regression coefficient r^2 = 0.989, values determined from 25 points (MILLER, 1991).

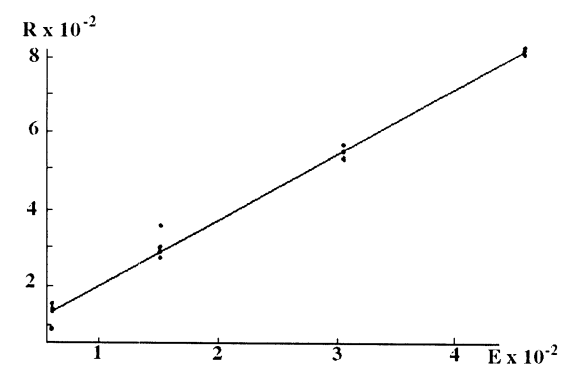


Fig. 4 — CPG , courbe d'étalonnage de l'éthanol

R = - 1,92 x 10^{-3} + 1,82 E (R est le rapport entre les intégrales des pics d'éthanol et de l'air, E est le rapport entre les fractions molaires de l'éthanol et l'air. Déviations standards sur a et b : S_a = ± 2,5 x 10^{-3} et S_b = ± 0,09, erreur standard σ = 2,5 x 10^{-3}, coefficient de régression linéaire r^2 = 0.992, valeurs déterminées à partir de 21 points (MILLER, 1991).

Fig. 4 — Gas chromatography, calibration curve for ethanol

R = - 1.92 x 10^{-3} + 1.82 E (R is the ratio between the integrals of the peaks for ethanol and air, E is the ratio between the molar fractions of ethanol and air). Standard déviations for a and b : S_a = ± 2.5 x 10^{-3} and S_b = ± 0.09, standard error σ = 2.5 x 10^{-3}, linear regression coefficient r^2 = 0.992, values determined from 25 points (MILLER, 1991).

TABLEAU I

Évolution de la masse des composés les plus abondants lors de la fermentation du glucose

Les mesures sont effectuées par : (1), ébulliométrie, (2) chromatographie en phase vapeur, (3), RMN du ^{13}C - nm : non mesuré

Table I — Evolution of the mass of the major components during the fermentation of glucose

The measurements were made by means of : (1), ébulliometry, (2), gas chromatography, (3), ^{13}C NMR - nm : not measured

Temps (heures)	Volume de la phase liquide (l)	masse d'éthanol (g) dans le fermenteur	masse d'éthanol évaporé (g) (2)	masse d'éthanol (g) dans les échantillons (1)	masse totale d'éthanol (g)	masse de glycérol (g) (3)	masse de butanediols (g) (3)	masse d'acide lactique (g) (3)	masse d'acide succinique (g) (2)	masse de dioxyde de carbone (g) (2)	masse de glucose (g) (3)
0,0	30,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5979,0
19,2	30,1	100,4	22,8	23,0	146,2	18,1	nm	nm	nm	215,2	5482,0
48,0	29,9	627,9	50,8	44,5	723,2	65,8	nm	nm	9,0	606,1	4416,8
72,0	29,7	1024,7	104,7	64,6	1194,0	109,9	nm	nm	14,9	1019,3	3586,3
96,0	29,4	1359,9	175,4	84,0	1619,3	135,2	nm	nm	17,6	1463,4	2687,3
139,2	29,0	2067,7	210,6	101,6	2379,9	165,3	11,6	11,6	23,2	2116,0	1140,0
148,8	28,7	2181,2	232,7	117,1	2531,0	175,1	11,5	14,4	25,8	2326,1	852,5
163,2	28,4	2226,6	295,2	132,6	2654,4	178,9	14,2	14,2	25,6	2465,1	647,3
187,2	28,0	2393,9	367,4	147,2	2908,5	190,4	14,0	14,0	28,0	2718,5	103,3
216,0	27,8	2332,4	449,5	160,4	2942,3	191,8	13,9	13,9	27,8	2784,8	nm
244,8	27,3	2229,3	537,2	173,1	2939,6	202,0	16,4	13,7	27,3	2802,8	nm

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

des composants majoritairement présents dans les effluents gazeux d'une cuve de fermentation se trouvent ainsi réunies.

II — ÉTABLISSEMENT DU BILAN CARBONE LORS DE LA FERMENTATION

Le vin étant un milieu complexe, nous avons choisi d'établir les bilans carbone sur un système plus simple. Nous avons ainsi opté pour la fermentation du glucose. Par ailleurs, les expériences ont été conduites à l'aide de fermenteurs de 30 l. Un tel volume est nécessaire si on veut éviter une trop grande perturbation du milieu par les nombreux prélèvements nécessaires à la détermination du degré alcoolique et à l'analyse par RMN du carbone. Nous avons ainsi effectué 10 prélèvements d'un volume unitaire de 250 ml, ce qui représente moins de 10 p. cent du volume total en fermentation.

Les résultats issus des mesures par CPG, RMN du carbone ou des degrés alcooliques sont rassemblés dans le tableau I. Ils sont également exprimés en masse de carbone dans le tableau II. Ainsi la masse totale de carbone issue de l'éthanol est la somme des masses de carbone provenant de la phase liquide (mesurée par ébulliométrie) et de la phase gazeuse (déterminée par CPG). De même, les masses de carbone contenues dans le glycérol, les butanediols ou les acides lactique et succinique ont été calculées à partir des spectres de RMN du carbone. Ces résultats sont la moyenne de ceux obtenus au cours de trois expériences menées dans des conditions identiques. Les données relatives à la biomasse qui n'apparaissent pas dans le tableau I ont été négligées car les transferts en masse carbonée sont faibles. Ainsi, les 15 g de levure lyophilisée utilisés au cours des expériences contiennent 10,8 g de carbone (déterminé par analyse élémentaire quantitative). En fin de fermentation, on récupère par centrifugation et lyophilisation 34 g de biomasse qui renferment 24,1 g de carbone. Cela signifie que 13,3 g seulement de masse carbonée (soit 0,6 p. cent de la masse totale) ont été utilisés par la croissance cellulaire.

Exception faite de l'éthanol, la matière organique dans la phase liquide est essentiellement composée de glucose, de glycérol, de butanediols et des acides lactique et succinique. D'autres produits sont également présents, nous avons négligé leurs contributions du fait de leur très faible concentration. Le tableau II et la figure 5 expriment les résultats en termes de la contribution de chacun des composés organiques au bilan du carbone. On constate que la masse totale de carbone obtenue par addition de chacune de ces contributions reste constante à chaque moment étudié de la fermentation. Un écart maximum de 3 p. cent est observé entre la valeur de départ et celle obtenue lors de la plus mauvaise mesure. En considérant les mesures chromatographiques, on remarque que l'éthanol évaporé en cours de fermentation représente environ 10 p. cent de la masse carbonée initialement introduite dans le fermenteur. À ce sujet, il faut remarquer que les travaux

TABLEAU II

Évolution de la masse de carbone lors de la fermentation du glucose

(valeurs calculées à partir du tableau I). nm = non mesuré

Table II — Evolution of the carbon mass during the fermentation of glucose

(values calculated from table I). nm = not measured

Temps (heures)	masse de carbone issue de l'éthanol (g)	masse de carbone issue du glycérol (g)	masse de carbone issue des butanediols (g)	masse de carbone issue de l'acide lactique (g)	masse de carbone issue de l'acide succinique (g)	masse de carbone issue du CO_2 (g)	masse de carbone issue du glucose (g)	masse totale de carbone (g)
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2391,6	2391,6
19,2	76,3	7,1	nm	nm	nm	58,7	2192,8	2334,9
48,0	377,3	25,7	nm	nm	3,6	165,3	1766,7	2338,6
72,0	623,0	43,0	nm	nm	6,0	278,0	1434,5	2384,5
96,0	844,9	52,9	nm	nm	7,2	399,1	1074,9	2379,0
139,2	1241,7	64,7	6,2	4,6	9,4	577,1	456,0	2359,7
148,8	1320,5	68,5	6,1	5,7	10,5	634,4	341,0	2386,7
163,2	1384,9	70,0	7,6	5,7	10,4	672,3	258,9	2409,8
187,2	1517,5	74,5	7,5	5,6	11,4	741,4	41,3	2399,2
216,0	1535,1	75,1	7,4	5,6	11,3	759,5	nm	2394,0
244,8	1533,7	79,1	8,7	5,5	11,3	764,4	nm	2402,7

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

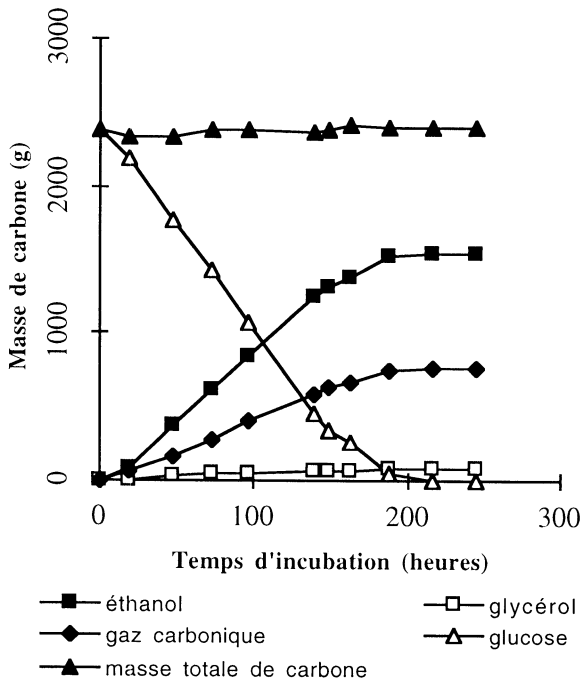


Fig. 5 — Evolution de la masse carbonée de chacun des constituants majoritaires intervenant lors de la fermentation du glucose

Les fermentations sont menées sur des solutions de 5979 g (33,22 M) de glucose dans 30 l d'eau distillée.

Fig. 5 — Evolution of the carbon mass of the major components in the fermentation of glucose

(experiments conducted on 5979 g (33,22 M) of glucose in 30 l of distilled water)

TABLEAU III

Comparaison entre les masses de carbone provenant de l'éthanol (C_e) et du gaz carbonique (C_{gc})

$\rho = C_e/2\ C_{gc}$ (l'éthanol contient 2 atomes de carbone)

Table III — Comparison between the carbon masses calculated from ethanol (C_e) and from carbon dioxide (C_{gc})

$\rho = C_e/2\ C_{gc}$ (the ethanol contains 2 carbon atoms)

Temps (heures)	Masse de carbone issue de l'éthanol (C_e en g)	Masse de carbone issue du CO_2 (C_{gc} en g)	ρ
19,2	76,3	58,7	0,6
48,0	377,3	165,3	1,1
72,0	623,0	278,0	1,1
96,0	844,9	399,1	1,1
139,2	1241,7	577,1	1,1
148,8	1320,5	634,4	1,0
163,2	1384,9	672,3	1,0
187,2	1517,5	741,4	1,0
216,0	1535,1	759,5	1,0
244,8	1533,7	764,4	1,0

antérieurs indiquent en général des pertes d'éthanol par évaporation nettement plus faibles (entre 0,5 et 1 p. cent) (STRADELLI, 1951 ; BOULTON, 1979 ; CARO *et al.*, 1991). Cela n'est pas vraiment étonnant dans la mesure où nous avons mené les fermentations sous balayage d'air supposé modéliser des conditions de vinification en cuve ouverte. La mesure des pertes en éthanol par évaporation se trouve confirmée par la très bonne corrélation obtenue entre la masse de carbone issue de l'éthanol réellement synthétisé et celle provenant du dioxyde de carbone (voir tableau III). En effet, on sait qu'une mole de glucose produit le même nombre de moles de dioxyde de carbone et d'éthanol. À l'examen du tableau III, on constate que nos résultats vérifient cette relation puisque la masse carbonée issue de l'éthanol est le double de celle du CO_2. La mauvaise corrélation observée après 19,2 heures d'incubation est très probablement due à une importante erreur sur la mesure d'une faible concentration en éthanol présente à ce moment (0,4 p. cent).

Dans nos conditions expérimentales, on observe des pertes en éthanol avoisinant 10 p. cent. L'excédent de sucre utilisé dans les chaptalisations étant du même ordre de grandeur (environ 12 p. cent), il n'est pas impropable que la masse carbonée « disparue », se soit évaporée sous forme d'éthanol.

CONCLUSION

Au cours de ce travail, nous avons mis au point la mesure quantitative par chromatographie en phase gazeuse, du dioxyde de carbone et de l'éthanol émis dans l'atmosphère lors de la fermentation du glucose. Les résultats ainsi obtenus permettent en combinaison avec l'analyse quantitative par RMN du ^{13}C des composés organiques présents dans le milieu de fermentation, d'établir un bilan du devenir de la masse carbonée initialement présente dans le fermenteur. On montre en particulier qu'un balayage par un flux d'air de la surface de la phase liquide associé au dégagement du gaz carbonique amène une évaporation d'environ 10 p. cent de l'éthanol produit. Bien qu'éloignées des conditions dans lesquelles sont effectuées les vinifications ou les chaptalisations, nos expériences de fermentation alcoolique seraient ainsi susceptibles de rendre compte des pertes en éthanol observées lorsque la fermentation des moûts est menée en cuve ouverte.

Remerciements : Les auteurs sont reconnaissants au Ministère de l'Agriculture pour un support financier à ce travail ainsi qu'au Département de Loire Atlantique pour l'attribution d'une bourse « Atlanthèse » (C. CHON). Nous remercions également le Laboratoire de RMN et Réactivité Chimique (URA CNRS 472) pour l'utilisation du spectromètre RMN Bruker WM250.

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AMERINE M.A. and JOSLYN M.A., 1991. *Table Wines.* University of California Press, Berkeley .

BOULTON R., 1979. Kinetic model for the control of wine fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, **9**, 167-177.

CARO I., PEREZ L. and CANTERO D., 1991. Development of a kinetic model for the alcoholic fermentation of must. *Biotechnology and Bioengineering*, **38**, 742-748.

CHON C., POULARD A. et RABILLER C., 1996. Analyse quantitative des principaux constituants du vin par RMN du carbone-^{13} : optimisation de la méthode. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **30**, n°2, 73-83.

FLANZY M. et BOUDET V., 1949. Les pertes d'alcool au cours de la transformation des jus de raisin en vin. *Vitic. Arboric.*, **95**, 104-107.

GARCIA-ROMERO E., SÀNCHEZ-MUNOZ G., MARTIN-ALVAREZ P.J. and CABEZUDO-IBÀNEZ M.D., 1993. Determination of organic acids in grape musts, wines and vinegars by liquid high performance chromatography. *J. Chromatogr. A*, **655**, 111-117.

HABA M., CHIRIVELLA C., MENDEZ J. et PEREZ A., 1993. Étude sur les arômes récupérés lors de la fermentation des vins issus des variétés Bobal et Macabeo. *Rev. Fr. Œnol.*, **142**, 45-48.

JOURET C. et MOUTOUNET M., 1970. Comparaison des substances volatiles émises au cours de la vinification de raisin foulés ou non foulés. *Ann. Technol. agric.*, **19**, 59-68.

LAVIGNE V., BOIDRON J.-N. et DUBOURDIEU D., 1993. Dosage des composés soufrés volatils légers dans les vins par chromatographie en phase gazeuse et photométrie de flamme. *J. Int. Sc. Vigne Vin*, **27**, 1-12.

MATHIEU L. et MATHIEU R., 1938. Problèmes pratiques sur la vinification. *Institut Œnotechnique de France.*

MILLER J.N., 1991. Errors in Calibration Graphs. *Spectroscopy International*, **3**, n°7, 45-47.

NÈGRE E., 1946. Aérations et pertes d'alcool. *Progrès Agric. Vitic.*, **126**, 238-242.

NÈGRE E. et MARICHAL M., 1950. Récupération de l'alcool entraîné par le gaz carbonique. *Progrès Agric. Vitic.*, 331-337.

RAPP A. et MARKOWETZ A., 1989. Anwendung der ^{13}C-NMR-Spektroskopie in der Weinanalytik. *Lebensmittelchem.Gerichtl. Chem.*, **43**, 73-75.

RAPP A.et MARKOWETZ A., 1990. Weinanalytik mit Kernresonanz spektroskopie.*Weinwirtschaft Technik*, **4**, 14-19.

RAPP A. et MARKOWETZ A., 1993. NMR-Spektroskopie in der Weinanalytik. *Chemie in unserer Zeit.*, **27**, 149-155.

RAPP A., MARKOWETZ A., SPRAUL, M. und HUMPFER E., 1989. Nachweis und quantitative Bestimmung von Zuckern, Zuckeralkoholen und Zuckersäuren im Wein mit ^{13}C-NMR-Spektroskopie. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **188**, 138-143.

RAPP A., MARKOWETZ A. et NIEBERGALL H., 1991. Anwendung der ^{13}C-NMR-Spektroskopie in der Aminosäureanalytik in Wein und Fruchtsäften. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **192**, 1-6.

STRADELLI A., 1951. Evaporazione di alcol durante la fermentazione dei mosti. *Rivista Vitic. Enol.*, **4**, 50-53.

SUÀREZ B., PICINELLI A. and MANGAS J.J., 1996. Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic determination of polyphenols in apple musts and ciders. *J. Chromatogr. A*, **727**, 203-209.

WARKENTIN H. and NURY M.S., 1963. Alcohol losses during fermentation of grape juice in closed fermenters. *Am. J. Enol. Vitic.*, **14**, 68-74.

ZIMMERMAN H.W., ROSSI E.A. and WICK E.,1964. Alcohol losses from entrainment in carbon dioxide evolved during fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.*, **15**, 63-68.

Manuscrit reçu le 5 mars 1997 ;
accepté pour publication le 12 mai 1997

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)