

THESE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DU CENTRE INTERNATIONAL D'ETUDES SUPERIEURES EN SCIENCES AGRONOMIQUES –
MONTPELLIER SUPAGRO**

Ecole Doctorale : Sciences des Procédés – Sciences des Aliments
Spécialité : Biotechnologie, Microbiologie

Présentée et soutenue publiquement par

Sumallika MORAKUL

Le 11 Avril 2011

**Etude et modélisation de la composition du gaz
fermentaire en conditions œnologiques : intérêt
pour le contrôle de la fermentation**

JURY

Samuel LUBBERS	Maître de Conférences, AgroSup Dijon France	Rapporteur
Ricardo PEREZ	Professeur, P. Universidad Catolica de Chile Santiago Chili	Rapporteur
Carole JOUVE	Professeur, INSA Toulouse France	Examinatrice
Sophie LANDAUD	Maître de Conférences, AgroParisTech Grignon France	Examinatrice
Violaine ATHES	Maître de Conférences, AgroParisTech Grignon France	Co-encadrante
Jean-Marie SABLAYROLLES	Directeur de Recherche, INRA Montpellier France	Directeur de Thèse

Remerciements

Avant tout propos, je tiens à remercier Guy ALBAGNAC et Jean-Marie SABLAYROLLES, directeurs successifs de l'UMR de Sciences Pour l'œnologie de l'INRA de Montpellier de m'avoir reçue et hébergée au sein de leur UMR.

J'exprime tout spécialement ma gratitude à Jean-Marie SABLAYROLLES pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse. Avec sa patience à toute épreuve il m'a dirigée, encouragée et soutenue au cours de cette thèse et facilité mon séjour en France. Je le remercie de m'avoir fait bénéficier de ses compétences en œnologie et notamment de ses précieux et judicieux conseils scientifiques. Jean-Marie, merci infiniment pour ton aide.

Je remercie tout particulièrement et très chaleureusement Violaine ATHES, ma co-directrice de thèse pour tous les conseils scientifiques (spécialement pour l'aspect physico-chimique du projet – qui n'était pas à l'origine mon domaine de compétences, tu m'as beaucoup appris), les encouragements et la qualité de nos rapports malgré la distance géographique. Un grand merci aussi de m'avoir laissé te voler tes vacances☺.

Je remercie également Samuel LUBBERS, Ricardo PEREZ, Sophie LANDAUD et Carole JOUVE, qui me font l'honneur d'accepter de juger cette thèse. Merci pour cette journée inoubliable.

Tous mes remerciements vont vers Jean-Roch MOURET (secours scientifique général), pour son enthousiasme, son aide et sa patience lors de mes nombreuses sollicitations (également par mail et skype) scientifiques et techniques.

Je tiens également à remercier Ioan Cristian TRELEA mon coach en modélisation, merci pour ton aide. Mes remerciements vont aussi vers les membres de mon comité de thèse, Andrée VOILLEY et Carole JOUVE.

Je n'oublie pas non plus mes collègues de l'INRA de Pech Rouge, plus particulièrement Paméla NICOLLE, Magaly ANGENIEUX et Evelyne AGUERA, qui m'ont toujours accueillie avec beaucoup de gentillesse et aidée dans les expérimentations. Merci pour à toutes pour votre contribution.

Un grand merci à Marc (secours CPG) et Christian (le grand ; secours général).

Les remerciements qui vont suivre s'adressent à toutes les personnes qui ont partagé avec moi des moments de cette thèse. Merci à l'ensemble de l'équipe Microbiologie ; Isabelle (secours statistique), Catherine, Vivi (mon prof de français hors école), Pascale, Cécile, Sylvie, Carole, Jean-Michel, Bruno, Erick, Pierre, Brigitte, Stéphane, Fred et Jean-Luc... merci pour votre amitié. Un énorme merci va aussi à Jean-Paul pour m'avoir laissé utiliser le combipal et le spectromètre de masse (ils ne me font plus peur). Je remercie également l'ensemble de l'équipe du plateau volatils (Peggy, Aurélie, Laurent, Florence, Nico, Rémi, Clément, Virginie) pour m'avoir gentiment accueillie pendant leurs pauses cafés et leurs apéros. Je n'oublie surtout pas Jocelyne Billot (« les français sont aussi gentils », ça commence par toi), Isabelle Delmas, Jacqueline Legrand, Patrick Berger pour leur aide. Merci à l'ensemble des personnes de SPO et au personnel de Pech Rouge pour leur amitié.

J'adresse avec beaucoup d'émotion tous mes remerciements à mes amis : Maryam, alors que les autres avaient peur de parler anglais avec moi, tu as été la première qui est venue vers moi ; merci aussi à Maéva, Soline et Peggy d'avoir accepté de parler anglais avec moi. Axelle, tu n'aime pas trop parler anglais mais finalement par écrit c'était pas mal n'est pas? Merci pour ton amitié depuis le début (merci également pour les HARIBOooooo et les Lions). Un autre grand merci à mes amis espagnols, Maité, Trini, Juan Jose et Rafa ; je n'oublie pas nos soirées espagnoles - thaïlandaise. Mon séjour en France aurait été moins drôle sans Maud, la reine de l'organisation (des soirées), Valentin et Amélie (les sorties œnologies), Chloé, Claire, Jessica (t'es trop forte), le petit Christian (t'es comme mon petit frère), Cocotillon et Pierrot (on arrive mieux à décrire le vin), Marie-France (Marf Marf), Aurélie (M), Nico (dommage que tu aies raté le jour de ma thèse). Un grand courage à ma Magalie, c'est dur la vie de thésard... surtout à la fin ! Allez, tu vas y arriver. Fida nos discussions et pauses n'ont pas fait avancer le boulot mais ont toujours été sympas et contribuer à la santé (morale) et enfin, JR un grand merci pour les soirées picooooooooooooooooole.

Et comment ne pas remercier tendrement ma grande Normande et ma grande baladeuse, Pam et Mag. Simplement merci, je ne peux pas tout écrire sinon ce remerciement va être très long... Lulu et Tiphaine, vous savez déjà tout ce que je veux dire « vous êtes mes vrais amies » et merci pour la saucisse aux herbes aussi.

Enfin, merci à Laurent VAYSSE et Eric DUBREUCQ pour m'avoir encouragée à venir en France, et m'avoir permis d'y faire toutes ces rencontres.

ขอบคุณสำหรับกำลังใจและความช่วยเหลือจากเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ทุกคน ปอ เกต กบ ออย ก้อย แหวน และคนอื่นๆ ที่ไม่ได้ลงชื่อ แต่จำได้หมดทุกคนนั้นแหละ รวมถึงพี่น้องไทย-ลาวในม้งค์ทุกคน และที่สำคัญที่สุด ขอบคุณกำลังใจจาก แม่ พี่ป้อ และญาติๆ ทุกคน

Sommaire

REMERCIEMENTS	2
SOMMAIRE	4
LISTE DES TABLEAUX	7
LISTE DES FIGURES	8
LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS	9
NOMENCLATURE	9
ABREVIATIONS	10
LISTE DES COMMUNICATIONS LIEES A CE TRAVAIL	11
PUBLICATIONS	11
POSTERS - CONFERENCES	11
INTRODUCTION	12
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	15
1. CARACTERISTIQUES DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE EN ŒNOLOGIE	16
1.1. DEROULEMENT DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE	16
1.1.1. Cinétique d'une fermentation 'standard'	16
1.1.1.1. Phase de latence	16
1.1.1.2. Phase de croissance	17
1.1.1.3. Phase stationnaire	18
1.1.2. Effet des principaux paramètres	18
1.1.2.1. Azote assimilable	18
1.1.2.2. Autres nutriments	20
1.1.2.3. Souche de levure	21
1.1.2.4. Température	22
1.2. LES AROMES FERMENTAIRES	24
1.2.1. Les arômes du vin	24
1.2.1.1. Les arômes variétaux	24
1.2.1.2. Les arômes fermentaires	24
1.2.1.3. Les arômes de vieillissement	25
1.2.2. Synthèse des alcools supérieurs et esters	27

1.2.2.1. Synthèse des alcools supérieurs	27
1.2.2.2. Synthèse des esters	29
1.2.3. Effet des principaux paramètres de fermentation	30
1.2.3.1. Effet de la température	30
1.2.3.2. Effet de la souche de levure	30
1.2.3.3. Effet des ajouts d'azote	31
2. TRANSFERT DES COMPOSES D'AROME ENTRE UNE MATRICE LIQUIDE ET UNE PHASE GAZEUSE	32
2.1. LES PROPRIETES D'EQUILIBRE LIQUIDE - GAZ	32
2.1.1. Le cas idéal	32
2.1.2. Le cas général	33
2.1.3. Expression du coefficient de partage comme un rapport de concentrations	34
2.1.4. Influence des facteurs opératoires sur le coefficient de partage	34
2.1.4.1. Effet de la concentration en composés d'arôme	35
2.1.4.2. Effet de l'éthanol	35
2.1.4.3. Effet des sucres simples	36
2.1.4.4. Effets des polysaccharides et des protéines	36
2.1.4.5. Effet du glycérol	37
2.1.4.6. Effet des composés phénoliques	37
2.1.4.7. Effet de la température	37
2.1.5. Méthodes de détermination du coefficient de partage	39
2.1.5.1. Les méthodes différentielles	39
2.1.5.2. Les méthodes dynamiques d'espace de tête	39
2.1.5.3. Les méthodes statiques	40
2.1.5.4. Synthèse des méthodes de détermination du coefficient de partage gaz – liquide et critères d'application	43
2.2. LES PROPRIETES DYNAMIQUES	45
2.2.1. Transfert de composés d'arôme entre deux phases agitées	45
2.2.2. Etude de la libération de composés volatils à partir de matrices alimentaires liquides	47
3. DEMARCHE ADOPTEE	49
MATERIELS ET METHODES	51
1. MESURE DES PROPRIETES D'EQUILIBRE GAZ – LIQUIDE	52
1.1. COMPOSES VOLATILS ETUDIES	52
1.2. MILIEUX MODELES	52
1.2.1. Milieux modèles simulant le moût et le vin	52
1.2.2. Milieux modèles simulant des moûts à différentes étapes de fermentation	52
1.3. DETERMINATION DES COEFFICIENTS DE PARTAGE GAZ-LIQUIDE (k_i)	54

1.3.1. Préparation de l'échantillon	54
1.3.2. Chromatographie en phase gazeuse	54
1.3.3. Calcul des coefficients de partage	54
1.3.4. Effet du dioxyde de carbone	55
1.3.5. Mesure du coefficient de partage sur des prélèvements de moût en cours de fermentation	55
2. SUIVI DE LA PRODUCTION DES COMPOSES VOLATILS EN FERMENTATION ŒNOLOGIQUE	55
2.1. CONDITIONS OPERATOIRES	55
2.1.1. Souches de levure	55
2.1.2. Milieux de fermentation	56
2.1.2.1. Moût synthétique	56
2.1.2.2. Moûts naturels	58
2.1.3. Cuves de fermentation	58
2.1.4. Conditions de fermentation	60
2.1.4.1. Fermentation isotherme	60
2.1.4.2. Fermentation anisotherme	60
2.1.4.3. Fermentation à vitesse constante	60
2.2. SUIVI DES COMPOSES VOLATILS	60
2.2.1. Dosage des composés volatils dans la phase gazeuse	60
2.2.2. Dosage des composés volatils dans la phase liquide (hors ligne)	61
2.2.3. Détermination du ratio de concentration entre les phases gaz et liquide	64
2.3. EXPLOITATIONS DES DONNEES	64
2.3.1. Bilan gaz - liquide sur les composés volatils	64
2.3.1.1 Evolution des concentrations dans la phase liquide	64
2.3.1.2 Etablissement des bilans gaz – liquide	65
2.3.2. Calculs cinétiques : vitesses de production, d'accumulation et de perte	65
<u>RESULTATS ET DISCUSSION</u>	<u>66</u>
CHAPITRE 1 Etude de l'évolution des coefficients de partage gaz – liquide de composés d'arôme dans des milieux représentant le déroulement d'une fermentation alcoolique en conditions œnologiques	67
Vérification de la validité de l'hypothèse « solutions infiniment diluées » en composés d'arôme	75
CHAPITRE 2 Modélisation de la répartition des composés d'arôme entre les phases gaz et liquide en cours de fermentation alcoolique pour l'élaboration d'un vin et prédiction des pertes aromatiques	76
Vérification des résultats expérimentaux	84
CHAPITRE 3 Bilan de production des composés d'arômes lors de la fermentation œnologique	88
<u>CONCLUSION GENERALE</u>	<u>116</u>
<u>REFERENCES</u>	<u>122</u>

Liste des tableaux

Tableau 1. Effet du SO ₂ et de l'acétaldéhyde sur la phase de latence	17
Tableau 2. Effet du régime de température sur la durée de fermentation et la vitesse maximale de fermentation	24
Tableau 3. Esters, alcools supérieurs et autres composés d'arôme trouvés communément dans le vin	26
Tableau 4. Principaux alcools supérieurs synthétisés et précurseurs d'acides aminés correspondants	28
Tableau 5. Synthèse des méthodes de détermination du coefficient de partage air/produit des composés d'arôme et critères d'application	44
Tableau 6. Principales caractéristiques physico-chimiques des composés volatils étudiés	53
Tableau 7. Composition d'un litre de moût synthétique	56
Tableau 8. Solution mère d'acides aminés (pour 1 L)	57
Tableau 9. Solution mère d'oligo-éléments (pour 1 L)	57
Tableau 10. Solution mère de vitamines (pour 1 L)	58
Tableau 11. Solution mère de facteurs anaérobies (pour 100 mL)	58
Tableau 12. Estimation du paramètre x , représentant l'écart éventuel du ratio de concentration entre les phases gaz et liquide par rapport à l'équilibre ($x=1$), pour différentes configurations de transfert	87

Liste des figures

Figure 1. Description d'une fermentation cinétique 'standard'	17
Figure 2. Relation entre la concentration en azote assimilable et la vitesse maximale de production de CO ₂ , à T=24°C	19
Figure 3. Effet du moment d'ajout de DAP sur la vitesse de production de CO ₂ et la population de cellules	20
Figure 4. Evolution de la vitesse de production de CO ₂ et de la quantité d'azote ajoutée lors d'une fermentation à vitesse constante, à T=24°C	20
Figure 5. Influence du régime de température sur la cinétique fermentaire	23
Figure 6. Principales voies métaboliques chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
Figure 7. Biosynthèse des alcools supérieurs à partir des acides aminés	28
Figure 8. Synthèse des esters d'acétate par la levure	29
Figure 9. Evolution des coefficients de partage d'esters en fonction de la température	38
Figure 10. Représentation du profil de concentration d'un composé d'arôme dans un système biphasique agité	46
Figure 11. Photos des cuves de 100 L	59
Figure 12. Système de CPG en ligne utilisé pour la mesure des composés volatils dans les gaz de sortie de fermentation	61
Figure 13. Coefficients de partage de l'acétate d'éthyle pour des concentrations comprises entre 10 et 50 ppm dans la solution tampon à 25°C	75
Figure 14. Schéma présentant le transfert de composés d'arôme vers la phase gazeuse	84

Liste des symboles et des abréviations

Nomenclature

A	Aire des pics obtenus en CPG
A_b	Aire de la surface d'échange (des bulles) (m^2)
C_i^{gas}	Concentration molaire (mol/L) ou massique (mg/L) du constituant i dans la phase gazeuse
C_i^{liq}	Concentration molaire (mol/L) ou massique (mg/L) du constituant i dans la phase liquide
C^{gas*}	Concentration à l'interface côté phase gazeuse (mg/L)
C^{liq*}	Concentration à l'interface côté phase liquide (mg/L)
C_{ini}^{liq}	Concentration du composé d'arôme dans le produit à l'instant initial (mg/L)
He	Constante de Henry (Pa)
j^l	Flux de transfert de matière dans la phase liquide ($kg/s.m^2$)
j^g	Flux de transfert de matière dans la phase gazeuse ($kg/s.m^2$)
k^l	Coefficient de transfert de matière dans la phase liquide (m/s)
k^g	Coefficient de transfert de matière dans la phase gazeuse (m/s)
k_0	Coefficient de transfert de matière global (m/s)
K_i	Volatilité absolue ou coefficient de partage du constituant i en rapport de fractions molaires
k_i	Coefficient de partage du constituant i en rapport de concentration
$LogK_{ow}$	Coefficient de partage octanol-eau (également noté LogP)
P_T	Pression totale (Pa)
p_i	Pression partielle du constituant i (Pa)
$P_{i(T)}^0$	Pression de vapeur saturante du constituant i (Pa)
Q	Débit volumique du gaz (L CO_2 / L moût)
R	Constante universelle des gaz parfaits (8.314 J/mol.K)
t	Temps (min, h, jour)
T	Température ($^{\circ}C$ ou K)
T_{ini}	Température initial ($^{\circ}C$)
T_{fin}	Température finale ($^{\circ}C$)
v	Vitesse de dégagement de CO_2 (dCO_2/dt) (g/L.h)
v_{max}	Vitesse maximale de dégagement de CO_2 (g/L.h)
V_g	Volume de gaz au dessus de la matrice liquide (mL)
V_l	Volume de matrice liquide (mL)
V_v	Volume d'un flacon (mL)
X	Population levurienne (cellule/L)
X_{max}	Population levurienne maximale (cellule/L)

x_i	Fraction molaire du constituant i dans la phase liquide
y_i	Fraction molaire du constituant i dans la phase gazeuse
f	Facteur de réponse du détecteur
β	Rapport entre le volume de gaz et celui de la matrice liquide dans le flacon
γ_i	Coefficient d'activité du constituant i
γ_i^∞	Coefficient d'activité du constituant i à dilution infinie
ΔH_{vap}	Enthalpie de vaporisation (J/mol)

Abréviations

APCI-MS	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation Mass Spectrometry
CA	Composés d'arôme
CO ₂	Dioxyde de carbone
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
Df	Durée de fermentation
DT	Régime d'augmentation de température
DAP	Phosphate diammonique
EPICS	Equilibrium Partitioning In Closed Systems
FID	Détecteur à ionisation de flamme
HS	Headspace
LC-SH	Liquid Calibration-Static Headspace
MS	Spectrométrie de masse
Nas	Azote assimilable
ppm	Partie par million
PRV	Phase Ratio Variation
PTR – MS	Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry
SO ₂	Dioxyde de soufre
UNIFAC	UNIversal Functional Activity Coefficient (modèle prédictif des coefficients d'activité)
VPC	Vapour Phase Calibration

Liste des communications liées à ce travail

Publications

Morakul, S., V. Athes, J.-R. Mouret & J.-M. Sablayrolles. (2010). Comprehensive study of the evolution of gas-liquid partitioning of aroma compounds during wine alcoholic fermentation. *J Agric Food Chem*, **58**, 10219-10225.

Morakul, S., J.-R. Mouret, P. Nicolle, I. C. Trelea, J.-M. Sablayrolles & V. Athes. (2011). Modelling of the gas-liquid partitioning of aroma compounds during wine alcoholic fermentation and prediction of aroma losses. *Process Biochem*, 46,1125-1131.

Morakul, S., J.-R. Mouret, P. Nicolle, E. Aguera, J.-M. Sablayrolles & V. Athès. Aroma compounds balance in winemaking. Submitted to *Food and Bioprocess Technology*.

Posters – conferences

Morakul, S., V. Athes & J.-M. Sablayrolles. (2009). Relation between gas and liquid composition during alcoholic fermentation. *Journée de l'ED-SPSA*. Montpellier, France. Poster

Morakul, S., V. Athes, J.-R. Mouret, P. Nicolle & J.-M. Sablayrolles. (2010). Effect of CO₂ stripping on the gas – liquid partitioning of volatile compounds during wine alcoholic fermentation. *Journée de l'ED-SPSA*. Montpellier, France. Poster

Mouret, J.-R., S. Morakul, P. Nicolle, E. Aguera, M. Perez & J.-M. Sablayrolles. (2010). On-line measurement of 'quality markers' during winemaking fermentation. *4th Conference on Biocatalysis in the Food and Drink Industries*. Toulouse, France. Conférence

Mouret, J.-R., S. Morakul, P. Nicolle, E. Aguera, M. Perez & J.-M. Sablayrolles. (2010). Interest of on line higher alcohol and ester determinations during winemaking fermentation. *4th International Congress on Bioprocesses in Food Industry*. Curitiba, Brésil. Conférence

Introduction

La fermentation alcoolique est une étape clé dans l'élaboration du vin. Au cours de ce processus, les sucres sont, pour l'essentiel, convertis en éthanol et dioxyde de carbone. Mais de très nombreux autres produits sont aussi synthétisés parmi lesquels certains jouent un rôle important sur les propriétés sensorielles du vin final. La souche de levure joue un rôle majeur mais la composition du moût et le mode de conduite de la fermentation sont aussi très importants.

Optimiser le contrôle de la fermentation alcoolique en œnologie est complexe. En effet, les objectifs d'ordre technologique, tels que l'épuisement des sucres, la durée de la fermentation ou la quantité d'énergie nécessaire pour réguler la température de fermentation, sont importants et constituent généralement une condition préalable, mais l'objectif principal est l'optimisation de la qualité du produit. Or ce critère est très difficilement mesurable et n'est accessible que par l'analyse sensorielle, qui nécessite une forte expertise et constitue une technique lourde et mal adaptée au contrôle des fermentations. Heureusement, des molécules spécifiques de différents 'styles de vins' ont été mises en évidence. Elles sont :

- soit issues du métabolisme levurien. Il s'agit des arômes fermentaires, avec parmi les molécules les plus abondamment produites (plusieurs mg/L à plusieurs dizaines de mg/L) les alcools supérieurs et les esters. Ces composés peuvent avoir un fort impact organoleptique, plus particulièrement dans le cas des vins jeunes et fruités.

- soit issues de molécules précurseurs déjà présentes dans le raisin et libérées par la levure. Il s'agit des arômes variétaux, qui sont spécifiques de certains cépages. L'exemple le mieux décrit (Tominaga & Dubourdieu 2000) est celui du Sauvignon blanc mais des 'molécules marqueurs' ont aussi été décrites pour d'autres cépages : Chardonnay, Riesling, Syrah, Melon B., Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot noir et Muscat (Francis & Newton 2005). Ces molécules, qui ont des seuils de perception très bas sont généralement présentes en très faibles concentrations (quelques $\mu\text{g/L}$, voire quelques ng/L).

De plus en plus de connaissances sont disponibles sur l'impact des conditions de fermentation sur la synthèse de ces molécules. Il est par exemple acquis que les basses températures favorisent la production d'esters. Il reste malgré tout encore beaucoup de questions, d'autant plus que des paramètres tels que la composition du milieu sont très complexes et agissent en interaction avec d'autres.

Une autre problématique, paradoxalement peu étudiée, concerne les phénomènes physico chimiques régissant le partage de ces molécules aromatiques entre les phases liquide et gazeuse. Il est ainsi communément admis que ces molécules, généralement très volatils, peuvent être partiellement perdues par entraînement par le CO_2 effluent mais très peu d'auteurs ont quantifié ces phénomènes. Or, une telle quantification présenterait plusieurs intérêts. Elle permettrait :

- **de réaliser, tout au long de la fermentation, des bilans** dans lesquels seraient différenciées (i) la quantité globale produite représentative des potentialités de la levure (intérêt microbiologique), (ii) la quantité restant dans la phase liquide (intérêt organoleptique) et (iii) la quantité perdue dans le gaz effluent, avec pour objectif de la minimiser (intérêt technologique)

- de relier la composition de la phase liquide à celle de la phase gaz. Il suffirait ainsi de mesurer la composition en composés volatils de la phase gazeuse, qui est généralement plus facile à réaliser, pour estimer celle de la phase liquide. Cet intérêt est encore plus marqué au sein de l'UMR Sciences pour l'œnologie et de l'Unité Expérimentale de Pech Rouge qui disposent d'un dispositif permettant le suivi en ligne de la composition de la phase gaz, avec une grande fréquence d'analyse (jusqu'à une mesure par heure, comme décrit par Mouret et al. (2010)). Au-delà du suivi en ligne de ces molécules d'intérêt aromatique, l'objectif à moyen terme poursuivi par ces équipes est **d'ajouter des critères d'ordre qualitatif aux stratégies de pilotage de la fermentation**, actuellement uniquement basées sur un suivi en ligne et un contrôle de la cinétique fermentaire (Sablayrolles 2009).

Plusieurs auteurs ont étudié les équilibres gaz – liquide dans des solutions hydro alcooliques (Athes et al. 2008, Conner et al. 1998, Tsachaki et al. 2008) et sucrées (Covarrubias-Cervantes et al. 2005), mais leurs résultats ne peuvent pas être directement extrapolés à la fermentation œnologique. En effet, au cours de celle-ci, on observe une évolution continue de la composition du milieu, avec une variation simultanée des concentrations en sucre et éthanol. Cette fermentation est aussi caractérisée par une forte production de CO₂ et, très souvent, des conditions de non isothermie avec une différence entre la température initiale et la température finale pouvant dépasser 10°C.

L'objectif de ce travail est précisément de décrire et quantifier les équilibres gaz – liquide dans ces conditions, en nous focalisant sur les alcools supérieurs et esters les plus abondants : isobutanol (2-methylpropan-1-ol), alcool isoamylique (3-methylbutan-1-ol), acétate d'éthyle, acétate d'isoamyle (3-methyl-1-butyl acetate) et hexanoate d'éthyle (2-ethyl hexanoate).

Nous quantifierons d'abord les coefficients de partage de ces molécules, en étudiant l'impact de la composition de la matrice, de la température et du dégagement de CO₂. Nous modéliserons ensuite la valeur des rapports de concentration entre phase gaz et liquide en fonction de ces variables et enfin, nous utiliserons cette modélisation pour calculer des bilans de production de ces composés tout au long de la fermentation, en accordant une importance plus particulière à l'effet de la température.

Synthèse bibliographique

Ce chapitre décrit les principales caractéristiques et spécificités de la fermentation alcoolique en œnologie puis expose les mécanismes impliqués dans les transferts de composés volatils entre la phase liquide et la phase gaz lors de cette fermentation.

1. Caractéristiques de la fermentation alcoolique en œnologie

1.1. Déroulement de la fermentation alcoolique

Le moût de raisin est caractérisé par une forte concentration en sucres (glucose et fructose en quantité équimolaire), entre 170 et 260 g/L suivant le degré de maturité, un pH acide (3,0-3,5) et par la présence de (i) certains nutriments en concentrations limitantes (azote assimilable, oxygène, vitamines, lipides) et (ii) d'agents inhibiteurs de la croissance microbienne tels que le SO₂.

La plupart des fermentations sont ensemencées avec des levures, sous forme de levures sèches actives (LSA), à des taux d'inoculation de 1 à 5×10⁶ cellules/mL. Le nombre de souches commercialisées a augmenté de façon très importante au cours des 20 dernières années pour atteindre environ 200. Il s'agit, sauf rares exceptions, de *Saccharomyces cerevisiae*.

1.1.1. Cinétique d'une fermentation 'standard'

Durant la fermentation, la levure est soumise à une succession de stress qui nécessitent une adaptation continue de son métabolisme. La **Figure 1** décrit le déroulement d'une fermentation en conditions 'standards', c'est à dire en phase liquide, avec ensemencement par une souche sélectionnée et avec une température régulée à une valeur constante.

1.1.1.1. Phase de latence

La phase de latence, qui a lieu en tout début de fermentation, correspond à la saturation progressive du milieu en gaz carbonique (environ 1,5 g/L de CO₂). A la fin de cette phase, lorsque le gaz carbonique (CO₂) commence à se dégager, la population levurienne atteint environ 10⁷ cellules/mL, ce qui correspond à 2-3 générations dans les conditions habituelles d'ensemencement. Pendant cette phase, la composition du milieu est très peu modifiée, à l'exception notable de la consommation de la thiamine. En effet, il a été montré que, dans un moût inoculé à 10⁶ cellules/mL, la thiamine est épuisée en quelques heures (Bataillon et al. 1996).

La durée de la phase de latence peut varier de quelques heures à plusieurs jours. Elle est surtout fonction de la température, du taux d'inoculation et de la présence d'inhibiteurs, principalement le dioxyde de soufre (SO₂). Ce dernier peut causer des phases de latence très longues, comme le montre le **Tableau 1**. Ce tableau indique aussi que l'effet du SO₂ est très différent suivant les souches : en présence d'une faible concentration en SO₂, la phase de latence est plus courte avec la souche B, mais c'est le phénomène inverse qui est observé lorsque la concentration est plus élevée. La concentration en acétaldéhyde est, elle aussi, importante et le **Tableau 1** indique que la concentration en cet

intermédiaire du métabolisme levurien, qui possède la caractéristique de se combiner avec le SO₂, est identique, quelle que soit la souche, lorsque débute la phase de croissance.

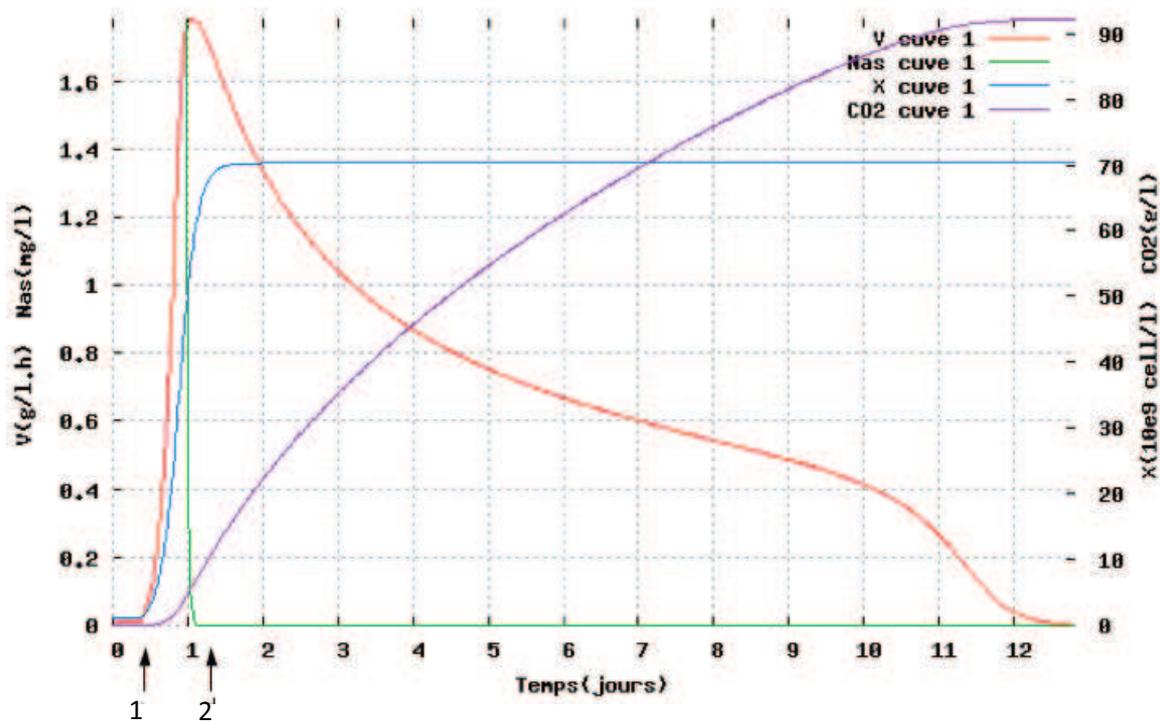


Figure 1. Description d'une fermentation cinétique 'standard'. Evolution de la population levurienne (X), du dégagement de CO₂ (proportionnel à la concentration en éthanol), de la vitesse de consommation du sucre (V) et de la concentration résiduelle en azote assimilable (Nas). 1 : fin de la phase de latence, 2 : fin de la phase de croissance (Logiciel SOFA[®] INRA-Intelli'oeno).

Tableau 1. Effet du SO₂ et de l'acétaldéhyde sur la phase de latence (Zhao 2005).

SO ₂ ajouté (mg/L)	SO ₂ libre (mg/L)	pH	SO ₂ moléculaire (mg/L)	Phase de latence (h)		[Acetaldehyde] à la fin de la phase de latence (mg/L)	
				Souche A	Souche B	Souche A	Souche B
30	9	3,24	0,32	10	29	40	43,5
45	12	3,24	0,42	20	40	42	40
45	14	3,07	0,71	53	45	/	/
60	22	3,24	0,77	55	54	40	39
90	29	3,24	1,02	88	70	41	44

1.1.1.2. Phase de croissance

La phase de croissance dure jusqu'à l'obtention de la population maximale, lorsqu'environ ¼ de la concentration en sucre a été consommé. C'est à la fin de cette phase qu'est atteinte la vitesse

maximale de fermentation (**Figure 1**). C'est donc à cet instant que le dégagement de CO₂, ainsi que les besoins énergétiques pour réguler la température de fermentation, sont maximaux. Par contre, c'est dès le début de la phase de croissance qu'est atteint le maximum de la vitesse spécifique de fermentation qui rend compte de l'activité fermentaire moyenne de chaque levure, activité qui ne cesse de diminuer par la suite.

La population atteinte est très variable suivant les moûts. D'après Bely et al. (1990a), elle est comprise entre 50 et 250×10⁶ cellules/ml. Dans la plupart des cas, la multiplication cellulaire prend fin suite à l'épuisement du moût en azote assimilable. De nombreux auteurs ont étudié l'assimilation de l'azote et montré la complexité du transport des différentes sources d'azote assimilable (principalement acides aminés et azote ammoniacal) à l'intérieur des levures. On peut cependant retenir que l'azote ammoniacal est assimilé rapidement et en même temps que les acides aminés les plus facilement assimilables. Il est à noter que cette consommation d'azote conduit à une légère baisse du pH qui atteint sa valeur minimum à la fin de la phase de croissance.

1.1.1.3. Phase stationnaire

C'est pendant la phase stationnaire que l'essentiel du sucre est fermenté, ce qui constitue une particularité des fermentations œnologiques par rapport aux fermentations brassicoles, par exemple. Pendant cette phase, les levures ne se multiplient plus et leur activité diminue régulièrement même si leur viabilité reste généralement supérieure à 80-90 %, excepté dans les cas d'arrêts de fermentation. Cette baisse d'activité correspond à une diminution régulière de la vitesse de transport des sucres induite par l'épuisement en azote assimilable (Salmon & Barre 1998). Plusieurs mécanismes d'inhibition sont aussi impliqués, mettant en jeu les acides gras à moyenne chaîne, les toxines killer, etc..., mais c'est l'éthanol qui joue le rôle inhibiteur essentiel. En effet, il a été montré qu'il y avait généralement une corrélation directe entre la concentration en éthanol dans le milieu et la vitesse de fermentation (Ansanay-Galeote et al. 2001).

Tout au long de la phase stationnaire, la taille des levures augmente et donc leur poids sec, principalement à cause de la synthèse de tréhalose et glycogène. Le glycogène peut être considéré comme un sucre de réserve alors que le tréhalose joue un rôle plus complexe. Il est impliqué dans les mécanismes de réponse au stress (Wiemken 1990), de résistance à la pression osmotique et à l'éthanol (Lucero et al. 2000) mais aussi de régulation fine de la glycolyse.

1.1.2. Effet des principaux paramètres

1.1.2.1. Azote assimilable

Rôle et variabilité de l'azote assimilable

Pour synthétiser les protéines, donc les acides aminés nécessaires à la croissance, la levure utilise les sources d'azote à sa disposition dans le moût. L'azote assimilable est généralement le nutriment le plus limitant pour les levures dans les moûts et joue donc un rôle essentiel sur la cinétique fermentaire. Bely et al. (1990b) ont montré qu'il existait une relation directe entre les concentrations en azote assimilable et les vitesses maximales de production de CO₂ (proportionnelles aux vitesses de fermentation) (**Figure 2**). Les carences en azote assimilable peuvent donc être considérées comme les causes essentielles des fermentations « lentes ». La concentration en azote assimilable est très variable suivant les moûts. Cette variabilité a été décrite par Bely et al. (1990b) qui ont étudié une centaine de moûts issus des principales régions viticoles françaises. Sur cet échantillonnage, les teneurs en azote assimilable variaient de 53 à 444 mg/L. En conditions standardisées, cela conduisait à des vitesses maximales de production de CO₂ comprises entre 0,4 et 2,8 g/L.h et à des populations levuriennes de 50 à 220×10⁶ cellules/mL. Si d'un point de vue microbiologique, on peut considérer que l'azote est quasiment toujours limitant, l'effet de la carence est surtout sensible lorsque sa concentration initiale est inférieure à 140-180 mg/L. C'est la raison pour laquelle ces auteurs proposent un seuil de « carence technologique » dans cette zone.

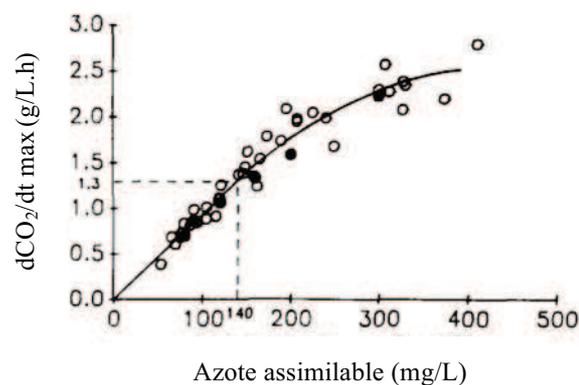


Figure 2. Relation entre la concentration en azote assimilable et la vitesse maximale de production de CO₂ (dCO₂/dt), à T=24°C. Moût naturel (O), moût synthétique (●) (Bely et al. 1990b).

Effet des ajouts d'azote sur la cinétique fermentaire

Dans le cas des milieux fortement carencés, l'addition de sels d'ammonium (diammonium phosphate (DAP) ou sulfate diammonique) accélère de façon spectaculaire la vitesse de fermentation et, par voie de conséquence, raccourcit fortement les fermentations. Mais le moment d'ajout est aussi très important. Si l'azote est ajouté au moment de l'inoculation, il conduit à une augmentation de la population levurienne, alors que s'il est ajouté pendant la phase stationnaire (vers la mi-fermentation), il augmente l'activité des levures, grâce, notamment, à une réactivation des systèmes de transport des sucres (**Figure 3**).

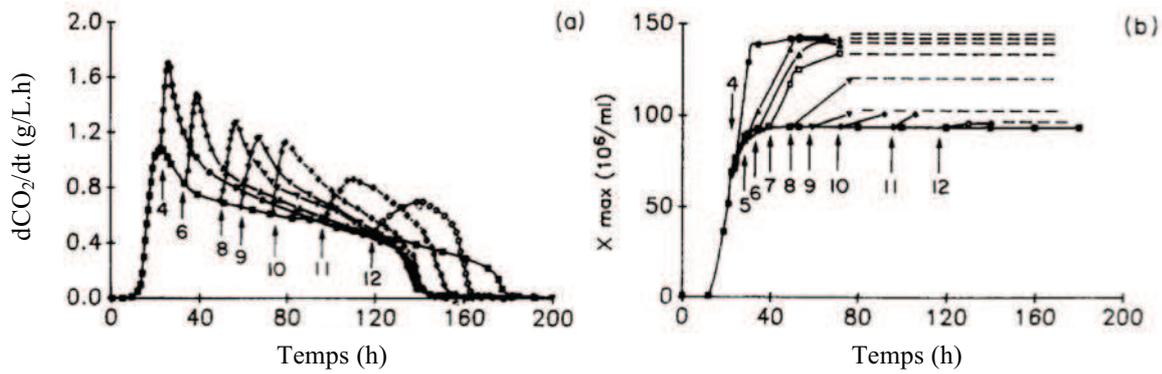


Figure 3. Effet du moment d'ajouts de DAP sur la vitesse de production de CO₂ (a) et la population de cellule (b). ↑ : Moments de l'ajout (Bely et al. 1990b).

Fermentation à vitesse constante

Grâce au très fort impact des ajouts de sources azotées, telles que le DAP, sur la cinétique fermentaire, il est possible de réaliser des fermentations à vitesse constante (Manginot et al. 1997). Lors de telles fermentations, après l'obtention de la vitesse maximale de CO₂, la vitesse est maintenue constante grâce à un apport contrôlé d'azote (**Figure 4**).

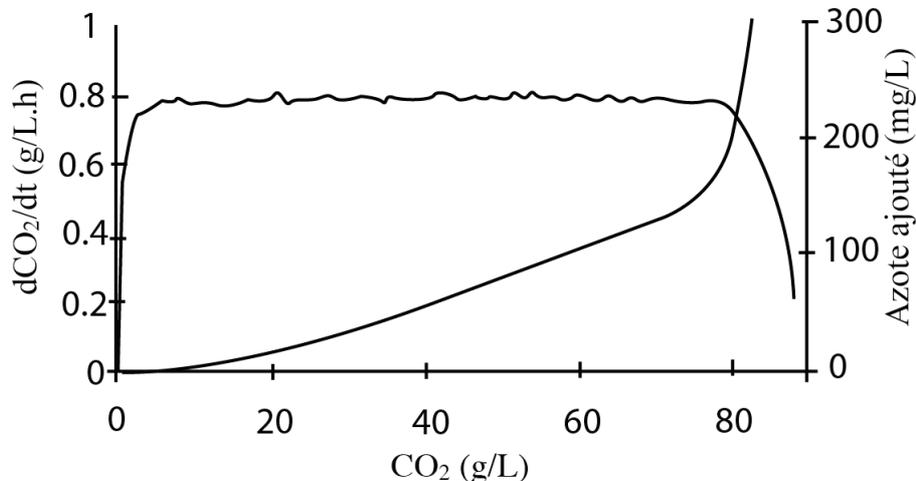


Figure 4. Evolution de la vitesse de production de CO₂ et de la quantité d'azote ajoutée lors d'une fermentation à vitesse constante, à T=24°C, concentration initiale en azote assimilable = 100 mg/L (Manginot et al. 1997).

1.1.2.2. Autres nutriments

Oxygène

L'oxygène est nécessaire aux levures pour la synthèse de composés lipidiques, principalement l'ergostérol, qui sont des constituants essentiels de la membrane cytoplasmique. En pratique, les

carences en oxygène sont parmi les causes essentielles des arrêts de fermentation et l'ajout d'au moins 10 mg/L d'oxygène est généralement nécessaire. Le moment le plus favorable pour l'oxygénation est la fin de la phase de croissance (vers le quart de la fermentation) avec une efficacité encore très grande à mi-fermentation.

Buescher et al. (2001) ont montré qu'une forte oxygénation pouvait permettre d'obtenir un vin à 20, 95% d'éthanol à partir d'un moût de raisin concentré. Il s'agit là de conditions extrêmes qui illustrent l'efficacité potentielle d'ajouts d'oxygène. En conditions œnologiques, cette efficacité a été étudiée par Blateyron et al. (2001), en couplant l'oxygénation à des ajouts de DAP (300 mg/L). Ces auteurs ont montré, sur un grand nombre de moûts difficilement fermentescibles, que ces ajouts permettaient d'éviter quasi-systématiquement les arrêts de fermentation et diminuaient très fortement les durées de fermentation (40 à 50 %) lors des fermentations 'languissantes'.

Sels minéraux et vitamines

Même si l'azote assimilable et l'oxygène peuvent être considérés comme les nutriments principaux en conditions œnologiques, ils ne sont pas les seuls susceptibles d'influer sur le déroulement des fermentations. La concentration en magnésium peut, dans certaines conditions, aussi avoir un effet sur la croissance et la dégradation des sucres (Birch et al. 2003). En effet, les ions Mg^{2+} , avec les phospholipides, jouent un rôle important pour stabiliser la membrane cytoplasmique et ainsi participer à la protection des cellules vis à vis de différents facteurs de stress, principalement l'éthanol.

Les concentrations en vitamines ne sont généralement pas limitantes dans les moûts, à l'exception de la thiamine qui est très rapidement consommée par les levures, y compris par la plupart des populations indigènes. Cela peut conduire à une carence induite des moûts au moment de l'inoculation et être la cause de fermentations difficiles. Dans ces conditions, l'addition de thiamine permet de restaurer une cinétique de fermentation normale (Bataillon et al. 1996).

1.1.2.3. Souche de levure

Colombie et al. (2005) ont caractérisé les cinétiques de fermentation obtenues avec 20 souches de levures choisies au hasard parmi celles disponibles sur le marché français. Les résultats obtenus, sur un milieu synthétique simulant un moût de raisin facilement fermentescible, mettent en évidence des différences relativement faibles avec, respectivement, des vitesses maximales de production de CO_2 comprises entre 1,85 et 2,52 g/L.h (moyenne: 2,33, écart type: 0,18), des durées de fermentation de 80 à 109 heures (moyenne: 90, écart type: 6,8) et des populations comprises entre 114 et 188 $\times 10^6$ cellules/mL.

Des différences beaucoup plus importantes sont rapportées par Blateyron et al. (2001), qui ont comparé les performances de 13 souches choisies au hasard dans un moût très difficile à fermenter et donc beaucoup plus discriminant. 3 souches ont conduit à des arrêts de fermentation, avec des concentrations résiduelles en sucres parfois considérables (10 à 56 g/L), alors que les 10 autres ont permis l'épuisement des sucres avec des durées de fermentation variant de 119 à 170 heures.

Plusieurs travaux ont montré que ces différences étaient principalement causées par des besoins différents en azote assimilable et oxygène (Julien et al. 2000).

1.1.2.4. Température

Nécessité de contrôle de la température

La fermentation est un processus très exothermique qui provoque le dégagement de 23,4 kcal par mole de sucre (Williams 1982). Dans les cuves industrielles, les pertes thermiques sont faibles et il y a nécessité de régulation de la température. En effet, des températures excessives peuvent être néfastes à la qualité des vins et conduire à des arrêts de fermentation, en synergie avec les fortes teneurs en éthanol en fin de fermentation.

En pratique, les températures maximales de fermentation sont inférieures 20°C pour les vinifications en blanc, alors qu'elles peuvent atteindre 30°C dans les vinifications en rouge, pour augmenter l'extraction de composés polyphénoliques présents dans les particules solides (Williams & Boulton 1983).

Effet du régime de température

La température a un effet majeur sur la cinétique fermentaire. Entre 15 et 25°C, la vitesse de fermentation est doublée lorsque la température est augmentée d'environ 8°C (Bely et al. 1990a). Le profil de température est, lui aussi, important et une augmentation de plusieurs degrés en cours de fermentation (cas très courant en œnologie) modifie profondément la courbe de fermentation. Le **Figure 5** compare l'évolution de la vitesse de production de CO₂ entre une fermentation menée à 30°C et des fermentations commencées à 18, 21 et 24°C, et dont la température évolue librement jusqu'à 30°C (Sablayrolles & Barre 1993).

Le **Tableau 2** illustre l'impact du régime de température sur la durée de fermentation ainsi que sur la vitesse maximale de fermentation. Dans tous les cas, la température est comprise entre 15°C et 22°C. De façon logique, les fermentations menées en non isotherme ont des valeurs intermédiaires entre les 2 isothermes à 15°C et 22°C, avec des fermentations plus rapides lorsque la température augmente dès le début. On peut cependant noter l'effet très significatif de l'augmentation de température pendant la

deuxième partie de la fermentation. En effet, comparativement à l'isotherme à 15°C, ce régime de température (qui correspond à une pratique courante) permet de raccourcir la fermentation alcoolique de 7 jours.

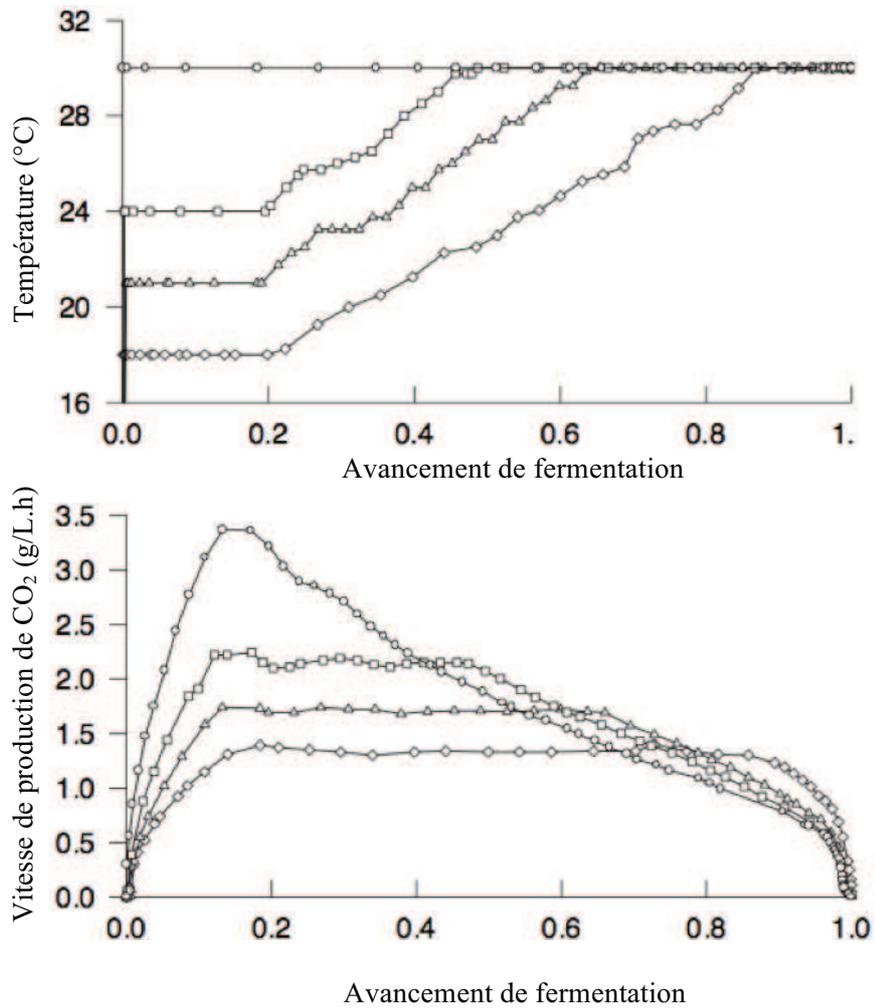


Figure 5. Influence du régime de température sur la cinétique fermentaire. Evolution de la température et de la vitesse de production de CO₂ en fonction de l'avancement de fermentation (Sablayrolles & Barre 1993).

Tableau 2. Effet du régime de température sur la durée de fermentation (Df) et la vitesse maximale de fermentation (V_{\max}), T_{ini} : température initiale, T_{fin} : température finale, DT : régime d'augmentation de température (début : augmentation de la température dès le début de la fermentation ; mi FA : augmentation de la température à partir de la mi-fermentation).

T_{ini} (°C)	T_{fin} (°C)	DT	Df (jours)	v_{\max} (g/L.h)
15	15		23	1,24
15	22	début	12,5	1,77
15	22	mi FA	16	1,24
22	22		11	2,27

Conditions simulées : cuve de 500 hL, moût contenant 220g/L de sucre et 170 mg/L d'azote assimilable, température extérieure = 15°C (Logiciel SOFA® INRA-Intelli'oeno).

1.2. Les arômes fermentaires

1.2.1. Les arômes du vin

Le vin est un produit complexe, avec de très nombreuses molécules impliquées dans ses caractéristiques organoleptiques, plus particulièrement son arôme (Swiegers et al. 2005). Les principales molécules d'arôme sont listées dans le **Tableau 3**, avec leurs seuils de perception et les concentrations habituellement rencontrées dans les vins. Elles ont pour origine le raisin ainsi que les processus de fermentation - qui nous intéresse plus particulièrement dans ce travail - et de vieillissement.

1.2.1.1. Les arômes variétaux

Les arômes variétaux donnent au vin sa typicité en même temps que sa structure de base. Ils sont caractérisés par des 'molécules marqueurs' représentatives de différents cépages (Francis & Newton 2005). Par exemple, les monoterpènes floraux sont typiques des vins type Muscat. Les thiols volatils fruités sont représentatifs des vins type Sauvignon (Tominaga & Dubourdieu 2000). Les composés d'arômes variétaux peuvent exister (i) sous forme libre et sont alors directement perceptibles par les récepteurs olfactifs de la muqueuse nasale ou (ii) sous forme de précurseurs inodores dans la baie de raisin, dont le clivage en composé odorant intervient au cours des différentes étapes de la vendange, de la vinification ou du vieillissement.

1.2.1.2. Les arômes fermentaires

Les arômes fermentaires sont synthétisés par les levures au cours de la fermentation. Il s'agit avant tout d'alcools supérieurs et d'esters.

Les alcools supérieurs sont divisés en deux classes : (i) les alcools aliphatiques : propanol, alcool isoamylique, isobutanol et alcool amylique et (ii) les alcools aromatiques, principalement 2-phényléthanol et tyrosol. Globalement, les alcools supérieurs sont peu favorables à l'arôme du vin, à l'exception du 2-phényléthanol qui apporte des notes florales (odeur de rose). Des concentrations excessives (supérieures à 400 mg/L) risquent d'entraîner une odeur forte et piquante, alors que des niveaux modérés (inférieures à 300 mg/L) peuvent participer au caractère fruité et, de façon plus générale contribuer à la complexité aromatique des vins (Bell & Henschke 2005).

La production d'esters peut avoir un fort effet sur les notes florales et fruitées du vin. Il existe deux principaux groupes d'esters. Le premier est constitué des esters d'acétate tels que l'acétate d'éthyle (note de solvant), l'acétate d'isoamyle (note de banane), et l'acétate de phényl éthyle (note de rose, de miel). Le deuxième est celui des esters éthyliques avec, notamment, l'hexanoate d'éthyle (notes d'ananas et de pomme), l'octanoate d'éthyle (note de pomme aigre), et le décanoate d'éthyle (note fleurie) (Verstrepen et al. 2003). La plupart des esters d'éthyle participent à l'arôme des vins jeunes et sont à l'origine de notes fruitées agréables. Parmi les acétates d'alcools supérieurs, seuls les acétates d'amyle, d'isoamyle et de 2-phényléthyle contribuent aux notes fruitées et florales. De façon générale, la contribution des esters est dépendante du type de vin. Elle est d'autant plus complexe à décrire et à quantifier qu'elle met en jeu des phénomènes d'interactions et de synergies.

Les voies de synthèse des alcools supérieurs et esters sont détaillées dans les paragraphes 1.2.2.1 et 1.2.2.2.

1.2.1.3. Les arômes de vieillissement

Les arômes de vieillissement proviennent de réactions chimiques post fermentaires. L'hydrolyse de composés fermentaires tels que les esters est responsable de la modification des notes fruitées du vin. Par ailleurs, les composés variétaux subissent des transformations chimiques produisant des molécules odorantes. Enfin, au cours de l'élevage en fût, les substances volatiles du bois diffusent dans le vin avec des cinétiques différentes suivant les composés chimiques mais également en fonction de l'origine botanique et géographique du bois de chêne et de la fabrication et utilisation des barriques.

Tableau 3. Esters, alcools supérieurs et autres composés d'arôme trouvés communément dans le vin (Swiegers et al. 2005).

Composé	Concentration dans le vin (mg/L)	seuil de perception (mg/L)	Descripteur
Acétate d'éthyle	22,5–63,5	7,5*	Solvant, fruité
Acétate d'isoamyle	0,1–3,4	0,03*	Banane, poire
Acétate de phényl éthyle	0–18,5	0,25*	Floral, rose, fruité
Acétate d'isobutyle	0,01–1,6	1,6****	Banane, fruité
Acétate d'hexyle	0–4,8	0,7**	Bonbon, parfum
Butanoate d'éthyle	0,01–1,8	0,02*	Floral, fruité
Hexanoate d'éthyle	0,03–3,4	0,05*	Pomme verte
Octanoate d'éthyle	0,05–3,8	0,02*	Savon
Décanoate d'éthyle	0–2,1	0,2*****	Floral, savon
Propanol	9,0–68	500**	Piquant, âpre
Butanol	0,5–8,5	150*	Fusel, spiritueux
Isobutanol	9,0–174	40*	Fusel, spiritueux
Alcool isoamylique	6,0–490	30*	Apré, vernis à ongles
Hexanol	0,3–12,0	4**	Vert, herbacé
2-Phényléthanol	4,0–197	10*	Floral, rose
Acid acétique	100–1150	280*	Vinaigre
Acétaldéhyde	10–75	100**	Xérès, pomme abimée
Diacétyl	<5	0,2** / 2,8****	Beurré
Glycérol	5–14 g/L	5,2 g/L**	sans odeur, goût doux
Linalol	0,0017–0,010	0,0015*****/0,025*****	Rose
Géranol	0,001–0,044	5*****/30*	Rose
Citronellole	0,015–0,042	8*****/100*	Citronnelle
2-acétyl-1-pyrroline	Trace	0,0001*****	Odeur de souris
2-acétyltetrahydropyridine	0,0048–0,1	0,0016*****	Odeur de souris
4-éthylphénol	0,012–6,5	0,14*/0,6****	Médicinal, basse-cour
4-éthyl guaiacol	0,001–0,44	0,033*/0,11****	Phénolique, doux
4-vinyl phénol	0,04–0,45	0,02*****	Pharmaceutique
4-vinyl guaiacol	0,0014–0,71	10*****	Clou de girofle

* 10% éthanol, ** vin, *** vin rouge, **** bière, ***** vin synthétique, ***** eau

1.2.2. Synthèse des alcools supérieurs et esters

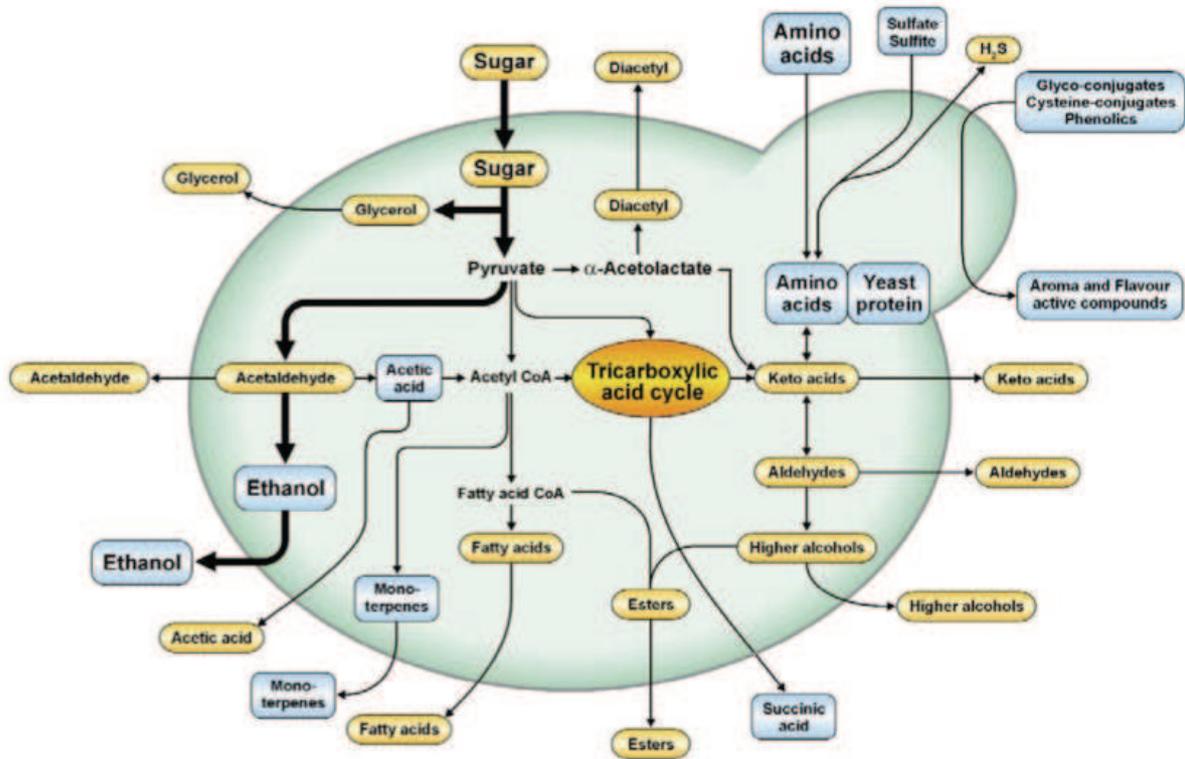


Figure 6. Principales voies métaboliques chez *Saccharomyces cerevisiae* (Swiegers et al. 2005).

La **Figure 6** récapitule les principales voies métaboliques chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Si la production d'éthanol représente plus de 90% de la consommation de sucre, il existe de nombreuses autres voies d'utilisation des hexoses et des sources azotées. Parmi celles-ci, on peut noter plus particulièrement la formation de glycérol, de succinate et d'acétate qui sont parmi les composés les plus abondants et qui sont impliqués dans les mécanismes de maintien de l'équilibre redox de la cellule (régulation des ratios de cofacteurs NAD/NADH et NADP/NADPH).

Les alcools supérieurs et esters font l'objet de voies de synthèse spécifiques détaillées ci-après.

1.2.2.1. Synthèse des alcools supérieurs

La première étape dans la synthèse d'alcools supérieurs implique la synthèse d' α -cétoacides (**Figure 6**), qui sont formés par la voie catabolique des acides aminés appelée voie d'Ehrlich (**Figure 7**). La première étape de cette voie est une transamination catalysée par des amino-transférases cytosoliques ou mitochondriales. La pyruvate décarboxylase transforme l' α -cétoacide en aldéhyde correspondant, et l'alcool déshydrogénase catalyse la réduction NADH-dépendante de cet aldéhyde en alcool

(Swiegers et al. 2005). Les alcools et leurs précurseurs d'acide aminé synthétisés par la voie d'Ehrlich sont présentés dans le **Tableau 4**.

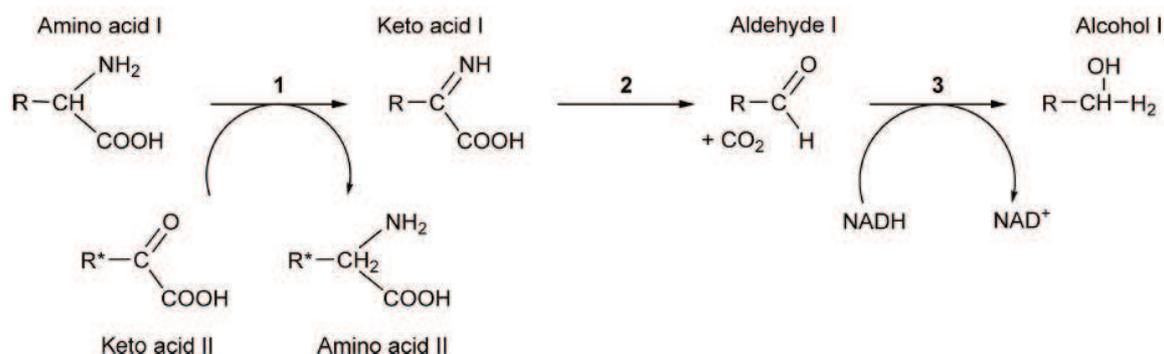


Figure 7. Biosynthèse des alcools supérieurs à partir des acides aminés. 1 : transamination, 2 : décarboxylation, 3 : réduction (Ribereau-Gayon et al. 2006).

La plupart des alcools supérieurs peuvent aussi être formés à partir du glucose (métabolisme carboné). Par exemple, l' α -cetoisocaproate, qui est le précurseur de l'alcool isoamylique et un produit intermédiaire dans la synthèse de la leucine, peut aussi être produit à partir de l' α -acétolactate, qui dérive du pyruvate (Ribereau-Gayon et al. 2006).

Tableau 4. Principaux alcools supérieurs synthétisés et précurseurs d'acides aminés correspondants (Ribereau-Gayon et al. 2006).

Alcools supérieurs	Acides aminés
Alcool isoamylique	Leucine
Alcool amylique	Isoleucine
Isobutanol	Valine
2 phényléthanol	Phénylalanine
Tyrosol	Tyrosine
Propanol	Thréonine
Butanol	?
Tryptophol	Tryptophane
γ -Butyrolactone	Acide glutamique
Méthionol	Méthionine

1.2.2.2. Synthèse des esters

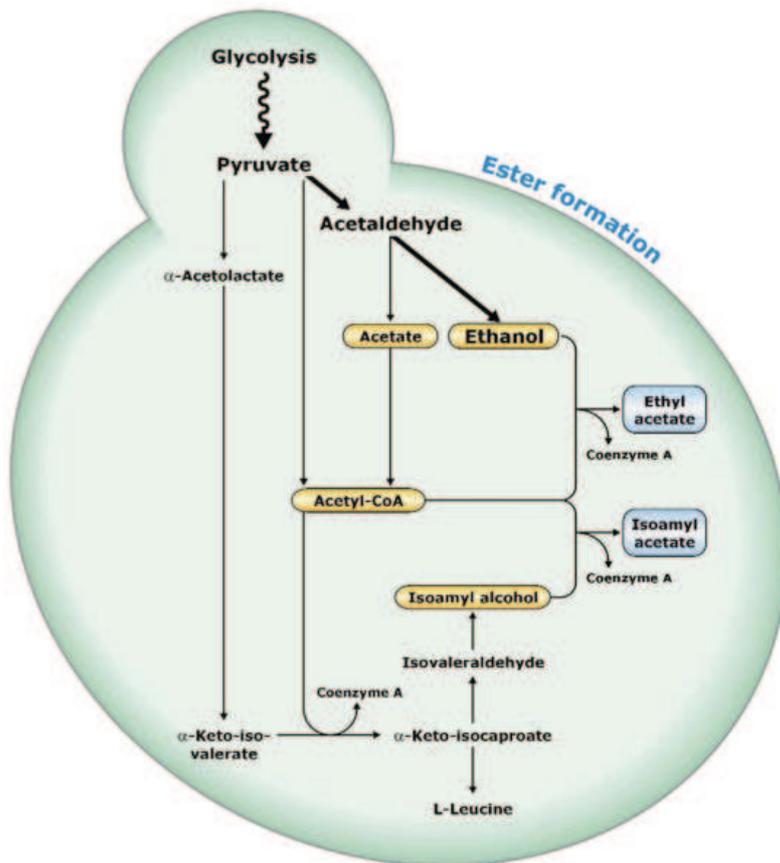


Figure 8. Synthèse des esters d'acétate par la levure (Swiegers et al. 2005).

La synthèse des esters d'acétate a fait l'objet de nombreuses études. Elle est catalysée par les alcool-*O*-acétyltransférases (AAT ; EC 2.3.1.84), qui utilisent les alcools (éthanol ou alcools supérieur) et l'acétyl-CoA comme substrats (**Figure 8**). Deux alcool-*O*-acétyltransférases ont été identifiées chez *S. cerevisiae* : Atf1 et Atf2. Atf1 est la plus importante car elle est considérée comme responsable de la synthèse de 80% d'acétate d'isoamyle, 75% d'acétate de phényl éthyle, et environ 40% d'acétate d'éthyle (Verstrepen et al. 2003). De plus, la surexpression du gène ATF1 a permis l'augmentation de plus de 100 fois de la production d'acétate d'isoamyle et de 10 à 200 fois la production de l'acétate d'éthyle et de l'acétate de phényl éthyle. Par ailleurs, la surexpression et la délétion du gène ATF1 ont montré que l'enzyme Atf1 est seulement impliquée dans la synthèse d'esters d'acétate (Saerens et al. 2006, Sumby et al. 2010).

Contrairement aux enzymes responsables de la formation d'esters d'acétate, les enzymes impliquées dans la formation d'esters éthyliques sont encore mal décrites. Récemment, deux nouvelles protéines ont été rapportées (Saerens et al. 2006) : Eht1 (éthanol hexanoyle transférase) et Eeb1 (ester éthylique biosynthétase). Eht1 catalyse la synthèse d'hexanoate d'éthyle à partir d'éthanol et d'hexanoyle-CoA.

Eeb1 est une éthanol acyltransférase responsable de la majeure partie de la biosynthèse d'esters d'éthyle au cours de la fermentation, qui possède en outre une activité estérase des esters à courte chaîne et peut être impliquée dans le métabolisme des lipides. Saerens et al. (2006) supposent aussi l'existence d'une ou plusieurs autres enzymes impliquées dans la synthèse d'esters d'acétate d'acide gras à moyenne chaîne.

1.2.3. Effet des principaux paramètres de fermentation

Plusieurs paramètres influencent la production de composés volatils, en particulier des alcools supérieurs et des esters, et ont ainsi un impact sur les caractéristiques aromatiques des vins.

1.2.3.1. Effet de la température

Beltran et al. (2006) ont comparé les concentrations de composés volatils produits, sur un moût de muscat, à 13 et 25°C. Ils montrent que la somme des concentrations des alcools supérieurs augmente avec la température alors que la production des esters diminue, cette baisse étant plus forte dans le cas des esters éthyliques d'acide gras. Ces observations sur les esters sont confirmées par différents autres auteurs (notamment Molina et al. 2007). Par contre, pour les alcools supérieurs, Molina et al. (2007) observent que seule la concentration de 2-phényl éthanol augmente avec la température alors que les concentrations des autres alcools supérieurs (isobutanol, alcool isoamylique et alcool amylique) diminuent. Ces différences de comportement illustrent la complexité des mécanismes mis en jeu dans la synthèse des alcools supérieurs et suggèrent l'existence d'interactions entre l'effet température et les effets souche et composition du milieu. A l'inverse, l'effet néfaste des températures élevées (supérieures à 20°C) sur les concentrations finales en esters est systématiquement observé. Il est d'ailleurs une des causes principales de l'utilisation de températures relativement basses (15-20°C) lors des vinifications en blanc et rosé.

1.2.3.2. Effet de la souche de levure

Plusieurs études ont montré le fort impact des souches de levure sur la production de composés volatils. On peut retenir plus particulièrement celle de Molina et al. (2009) qui ont comparé deux souches commerciales largement utilisées dans la pratique œnologique et ayant un impact très différent sur les caractéristiques aromatiques des vins : EC1118 et VIN13. La quasi-totalité des 23 composés analysés a été produit en quantités significativement différentes par les deux souches, 15 étant au-dessus du seuil de perception pour VIN13 et 13 pour EC1118. Les moûts fermentés avec VIN13 présentaient la plus forte concentration d'esters éthyliques à courte chaîne et à chaîne ramifiée. Ils étaient caractérisés par des arômes doux et fruités, qui constituent des traits positifs dans la production de produits frais et les vins blancs jeunes (Molina et al. 2009).

Torija et al. (2003) ont comparé les vins produits par 3 souches de levure à 2 températures différentes et déduit que l'effet souche était au moins aussi important que l'effet température.

1.2.3.3. Effet des ajouts d'azote

Les additions d'azote ont non seulement un impact très fort sur les vitesses de fermentation, mais aussi sur la synthèse de sous produits du métabolisme pouvant se traduire par un impact sur les caractéristiques organoleptiques du produit final. Bell & Henschke (2005) insistent, à ce sujet, sur la nécessité de maîtrise des ajouts de sorte à rester dans une fourchette acceptable d'azote assimilable (initial plus ajouté) disponible pour les levures. Des quantités trop faibles conduisent souvent à des productions excessives de composés soufrés indésirables, en particulier de sulfure d'hydrogène (H₂S) et d'alcools supérieurs alors qu'elles limitent les synthèses d'esters. A l'inverse, les quantités excessives d'azote peuvent augmenter les concentrations en acétate d'éthyle et en acide acétique. Ces risques liés aux quantités excessives d'azote doivent être d'autant plus pris en considération que l'ajout maximum autorisé a été augmenté, ces dernières années, de 300 mg/L à 1 g/L de DAP (soit de 63 mg/L à 210 mg/L d'azote).

Les composés d'arôme produits au cours de la fermentation contribuent donc de façon importante à la qualité globale d'un vin. Au cours de la fermentation, ces composés volatils vont transférer de la phase liquide dans laquelle ils sont produits vers la phase gazeuse. Le chapitre suivant permet d'aborder les notions et principes qui régissent les transferts de composés volatils au cours d'une fermentation.

2. Transfert des composés d'arôme entre une matrice liquide et une phase gazeuse

Le transfert de composés volatils d'une phase vers une autre dépend de différents facteurs. Tout d'abord, il est fonction des propriétés d'équilibre, paramètres thermodynamiques liés aux conditions de température et de pression, ainsi qu'à l'environnement physicochimique. Ensuite, il dépend de propriétés dynamiques : coefficients de transferts, force motrice du transfert, comme la différence de pression partielle en composé volatil entre deux phases. Le transfert de composés d'arôme n'est effectif que lorsque l'équilibre thermodynamique est perturbé. En d'autres termes, seul le fait de ne pas être à l'équilibre va permettre le transfert de matière, La détermination de données relatives à un état d'équilibre entre une phase gazeuse et une phase liquide n'est possible que s'il n'y a pas de transfert effectif au voisinage de l'interface entre la matrice et la phase gazeuse, dans les couches limites côté liquide et gaz (van Ruth & Roozen 2010).

2.1. Les propriétés d'équilibre liquide – gaz

Un soluté i présent dans une phase au contact d'une seconde phase évolue jusqu'à atteindre un équilibre thermodynamique (égalité des potentiels chimiques entre les phases, à une température fixée). C'est à partir de cet état d'équilibre que l'on peut définir le coefficient de partage d'un composé, qui rend compte de sa distribution entre la phase liquide et la phase gazeuse (Poling et al. 2000). Ce coefficient de partage est à la base des mécanismes qui régissent la libération des composés d'arôme d'un liquide vers la phase gazeuse en conditions d'équilibre (Taylor 1998). Il peut être exprimé comme un rapport des fractions molaires de ce constituant entre la phase gazeuse et la matrice par l'équation suivante :

$$K_i = \frac{y_i}{x_i} \quad \text{Equation 1}$$

où K_i est la volatilité absolue ou coefficient de partage du constituant i , y_i et x_i sont les fractions molaires du constituant i respectivement dans la phase gazeuse et la matrice, à savoir le milieu de fermentation dans la configuration œnologique qui nous intéresse dans cette étude.

2.1.1. Le cas idéal

Dans le cas où (i) la phase gazeuse a un comportement idéal et (ii) la phase liquide se comporte comme une solution idéale, la loi de Raoult s'applique (Smith et al. 2005).

$$y_i P_T = x_i P_{i(T)}^0 \quad \text{Equation 2}$$

où P_T est la pression totale et $P_{i(T)}^0$ est la pression de vapeur saturante du constituant i à une température donnée. Le produit $y_i P_T$ dans l'**Equation 2** est la pression partielle (p_i) d'un constituant i (loi de Dalton).

Ainsi, le coefficient de partage défini précédemment devient :

$$K_i = \frac{y_i}{x_i} = \frac{P_{i(T)}^0}{P_T} \quad \text{Equation 3}$$

2.1.2. Le cas général

Lorsqu'on s'éloigne de l'idéalité dans le liquide, des interactions apparaissent entre les molécules constituant le mélange. Ces déviations à l'idéalité dans la solution sont représentées par le coefficient d'activité (γ_i) du constituant i dans la matrice, modifiant ainsi la loi de Raoult. L'**Equation 2** devient (Smith et al. 2005) :

$$y_i P_T = \gamma_i x_i P_{i(T)}^0 \quad \text{Equation 4}$$

γ_i rend compte de l'écart à l'idéalité. Il est fortement dépendant de la composition de la phase liquide et dépend peu de la température. Cependant, dans le cas où x_i est très faible ($x_i < 10^{-4}$), ce qui est le cas des composés d'arôme dans une matrice alimentaire, on considère que γ_i est constant et prend sa valeur maximale notée γ_i^∞ . Ce cas particulier correspond au cas de la dilution infinie (Alessi et al. 1991). En présence de plusieurs molécules d'arôme à très faible concentration dans une phase diluante (matrice), il sera considéré que chacune des molécules d'arôme interagit indépendamment l'une de l'autre avec la matrice et le coefficient d'activité à dilution infinie pourra être appliqué à chaque composé d'arôme en mélange (Atlan 2007). Le K_i défini précédemment (**Equation 3**) devient :

$$K_i = \frac{y_i}{x_i} = \frac{\gamma_i^\infty P_{i(T)}^0}{P_T} \quad \text{Equation 5}$$

Certains auteurs définissent le coefficient de partage air/produit par la constante de Henry (Mahmud et al. 2000), définie comme le produit du coefficient d'activité à dilution infinie γ_i^∞ et de la pression de vapeur saturante $P_{i(T)}^0$:

$$He = \gamma_i^\infty P_{i(T)}^0 \quad \text{Equation 6}$$

avec He , la constante de Henry (Pa).

2.1.3. Expression du coefficient de partage comme un rapport de concentrations

Il est parfois difficile de déterminer une fraction molaire, en particulier dans le cas des matrices alimentaires complexes. Le coefficient de partage d'un constituant i entre la phase gazeuse et la matrice est alors exprimé par le rapport des concentrations en i dans chacune des phases (Atlan 2007, Taylor 1998)

$$k_i = \frac{C_i^{gas}}{C_i^{liq}}$$

Equation 7

où k_i est le coefficient de partage en rapport des concentrations, C_i^{gas} et C_i^{liq} sont les concentrations molaires (mol/L) ou massiques (kg/L) du constituant i à l'équilibre dans la phase gazeuse et la matrice liquide.

Qu'il soit exprimé en rapport de fraction molaire (K_i) ou en rapport de concentration (k_i), le coefficient de partage est sans dimension mais prend des valeurs numériques différentes. Le choix d'utiliser l'expression dépend de la méthodologie expérimentale utilisée pour sa détermination mais également de l'utilisation par la suite dans des équations dont l'homogénéité doit être respectée.

2.1.4. Influence des facteurs opératoires sur le coefficient de partage

La répartition de composés volatils entre les phases liquide et gazeuse est principalement régie par la volatilité des composés d'arôme et leur solubilité dans la matrice. Plusieurs facteurs peuvent influencer le coefficient de partage : la température, le pH, les propriétés de la molécule (groupements chimiques, pression de vapeur saturante, taille...) et la composition du milieu (teneur en matière grasse, en protéines, en sucres, en éthanol...). Il existe de nombreux travaux sur les effets de ces différents facteurs sur la volatilité de certaines molécules en solution (Tehrany & Desobry 2004, Linforth & Taylor 2006, Athès et al. 2004, Athes et al. 2008). Quelques propriétés des composés d'arôme vont particulièrement déterminer les interactions avec les constituants d'une matrice, comme l'hydrophobicité, souvent disponible dans les bases de données sous la forme d'un coefficient de partage octanol-eau, exprimée en LogP ou LogK_{ow} (van Ruth & Roozen 2010). La volatilité devrait être influencée par les constituants présents dans un milieu de fermentation (teneur en sucre et éthanol pour un milieu œnologique notamment). Des interactions au niveau moléculaire conduisent à des changements au niveau macroscopique et modifient l'équilibre thermodynamique, changeant notamment la volatilité. Il existe de nombreux travaux sur les effets de différents facteurs sur la volatilité de molécules en solution (Pozo-Bayon & Reineccius 2009), développés plus précisément ci-après.

2.1.4.1. Effet de la concentration en composés d'arôme

Dans le domaine de la dilution infinie, le coefficient de partage d'une molécule entre une phase liquide et une phase gazeuse est indépendant de la concentration. En dehors de ce domaine, le coefficient de partage augmente généralement avec la concentration dans la phase liquide (Buck et al. 2001, Lazzara & Deen 2004).

Des mesures expérimentales portant sur 5 composés d'arôme (l'hexanoate d'éthyle, l'acétate d'éthyle, l'octanoate d'éthyle, le linalool et le diacétyl) dans l'eau ont montré que le coefficient de partage était indépendant de la concentration en composés d'arôme entre 1 et 32 mg/kg (Saint-Eve 2006).

Sachant que dans le vin, les composés d'arôme sont à des concentrations de quelques mg/L, nous pourrions adopter l'hypothèse de la dilution infinie (aucune interaction entre molécules). Le coefficient de partage est donc constant pour la gamme de concentration étudiée.

2.1.4.2. Effet de l'éthanol

L'effet de l'éthanol est lié à sa capacité à modifier la polarité d'une solution, ce qui peut changer de façon importante les coefficients de partage gaz – liquide des solutés. Une augmentation de la teneur en éthanol conduit à diminuer les coefficients d'activité de nombreux composés volatils dans le vin en raison d'une augmentation de la solubilité (Voilley et al. 1991). Whiton & Zoecklein (2000) ont signalé qu'une légère augmentation de la teneur en éthanol (passage de 11% v/v à 14% v/v) réduit la quantité de composés volatils dans la phase gaz. Ces études suggèrent que l'augmentation de la teneur en alcool diminue la libération des composés volatils à partir des vins.

Aznar et al. (2004) ont utilisé une méthode de suivi de la composition de l'espace de tête associée à une détection par APCI-MS (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation – Mass Spectrometry) pour étudier la libération des composés volatils à partir d'eau et de mélanges hydro alcooliques (12%v/v). Ils ont montré une diminution de la concentration de composés volatils dans l'espace de tête avec une augmentation de l'hydrophobicité des molécules d'arômes, jusqu'à des valeurs de Log P proches de 3. Néanmoins, pour des composés très apolaires ($\log P > 3$), ils n'ont pas retrouvé cette tendance, ce qui pourrait être dû aux changements dans les interactions hydrophobes dans la solution.

A des concentrations d'éthanol plus élevées (17 à 20 %v/v), une diminution de la volatilité des esters éthyliques et des aldéhydes a été observée par Conner et al. (1998) et cet effet est expliqué par une augmentation de la solubilité des composés d'arôme liée à l'éthanol ajouté. Cette diminution de la volatilité de molécules d'arôme en solutions hydro alcooliques a également été montrée par Athès et al. (2004) sur l'hexanoate d'éthyle et l'alcool isoamylique, pour des concentrations en éthanol de 10 et 20%v/v, avec des diminutions observées du coefficient de partage de 30 à 70% par rapport à des

volatilités mesurées dans l'eau. Cet effet a été expliqué par D'Angelo et al. (1994), Conner et al. (1998), et Escalona et al. (1999) par des changements dans la structure de la solution où les molécules d'éthanol peuvent s'agréger lorsque leur fraction molaire est supérieure à 0,05 à 0,06 (15 à 17 %v/v) créant ainsi une zone hydrophobe capable de retenir d'autres composants faiblement solubles dans l'eau.

2.1.4.3. Effet des sucres simples

L'ajout de sucres simples a un effet variable selon les molécules d'arôme étudiées pour des concentrations en glucose comprises entre 0 et 60 % (Nahon et al. 2000). Une étude sur 40 composés d'arôme a également montré que l'ajout de sucres simples (saccharose) entre 0 et 65 % augmentait la concentration dans l'espace de tête de 29 composés d'arômes (dont l'acétate d'éthyle, l'acétate d'isoamyle et l'hexanoate d'éthyle) mais le diminuait pour 8 autres (par exemple le décanoate d'éthyle). Pour l'acétaldéhyde, la concentration dans l'espace de tête reste inchangée (Friel et al. 2000). Covarrubias-Cervantes et al. (2005) ont également montré que pour des concentrations en saccharose de 30 et 57,5 % la solubilité de l'acétate d'éthyle et de l'hexanoate d'éthyle augmentait de 30 à 70% par rapport à des solubilités mesurées dans l'eau. Par contre, les solubilités de l'acétate d'éthyle et de l'hexanoate d'éthyle ne sont que légèrement modifiées par la présence de glucose à une concentration de 30%.

2.1.4.4. Effets des polysaccharides et des protéines

Les protéines sont présentes dans les vins à des concentrations variables mais très faibles (entre 30 et 269 mg/L). Leur concentration dépend de la technologie de vinification utilisée et du type de raisin. Il s'agit généralement de glycoprotéines avec un poids moléculaire entre 25 et 35 kDa (Pozo-Bayon & Reineccius 2009).

Dufour & Bayonove (1999a) ont étudié l'effet de différents polysaccharides et protéines, isolés à partir du vin, sur les coefficients d'activité de certains composés volatils (acétate d'isoamyle, hexanoate d'éthyle, 1-hexanol et diacétyl). Ils ont étudié en particulier l'effet de la présence d'AGPs (Arabino Galactan Proteins), de mRG-II et dRG-II (monomeric and dimeric RhamnoGalacturonanes II) et de mannoprotéines (MP). Ils ont trouvé des effets différents selon le type de polysaccharide et selon la nature de l'arôme. Ils ont observé que la volatilité de l'acétate d'isoamyle et de l'hexanoate d'éthyle n'est pas affectée par la présence de ces polysaccharides à des concentrations de 5 à 20 g/L. A des concentrations plus élevées, la volatilité de ces deux esters est diminuée par la présence de polysaccharides riches en protéines, et plus faiblement affectée pour des AGP riches en acide uronique. Toutefois, des travaux plus récents montrent que la concentration en polysaccharides du vin ne dépasse généralement pas 0,5 à 1,5 g/L. Ces polysaccharides proviennent principalement des

cellules primaires de raisins murs et de l'autolyse des micro-organismes, principalement les levures utilisées dans la vinification (Pozo-Bayon et al. 2009). A ces faibles concentrations, il est possible de négliger l'effet de ces composants sur la volatilité des molécules d'arôme dans un vin.

2.1.4.5. Effet du glycérol

Le glycérol est le composé le plus abondant dans les vins, après l'éthanol. Sa concentration finale varie de 5 à 14 g/L (Swiegers et al. 2005). Sa présence contribue à donner une saveur légèrement sucrée et confère une certaine viscosité. Par contre, Lubbers et al. (2001) ont constaté que le glycérol, à des concentrations comprises entre 5 à 50 g/L ne modifiait pas la volatilité de l'alcool isoamylique, de l'isobutanol, de l'hexanoate d'éthyle, ou de l'acétate d'isoamyle.

2.1.4.6. Les composés phénoliques

Les polyphénols, composants essentiels du vin et responsables de la couleur et de l'astringence, ont été signalés comme pouvant interagir de façon non covalente avec des composés d'arôme en solution. Ces interactions pourraient influencer sur la libération de ces composés d'arôme. Il a été montré que l'élimination des polyphénols par filtration ou par traitement de « collage », ainsi que les précipitations induites par polymérisation au cours du vieillissement d'un vin, pouvaient induire des modifications de l'équilibre des arômes (Pozo-Bayon et al. 2009), mais les modifications éventuelles de la volatilité des arômes n'ont pas été étudiées.

Dufour & Bayonove (1999b) ont constaté l'existence d'interactions faibles entre les catéchines et certains composés d'arôme dont l'acétate d'isoamyle, l'hexanoate d'éthyle et la benzaldéhyde dans des systèmes modèles représentant un vin et ils ont également conclu que l'hydrophobicité des composants en présence était responsable de ces interactions conduisant à une baisse du coefficient d'activité des composés d'arôme de 13 à 16%, pour 10 g/L de catéchine.

2.1.4.7. Effet de la température

Une augmentation de la température accroît l'agitation moléculaire et s'accompagne d'une augmentation de la pression de vapeur saturante, ce qui se traduit par une augmentation du coefficient de partage air/matrice (Ettre et al. 1993, Jouquand et al. 2004).

A titre d'exemple, l'effet de la température sur le coefficient de partage air/matrices laitières de quelques composés d'arôme est montré sur la **Figure 9** (Meynier et al. 2003).

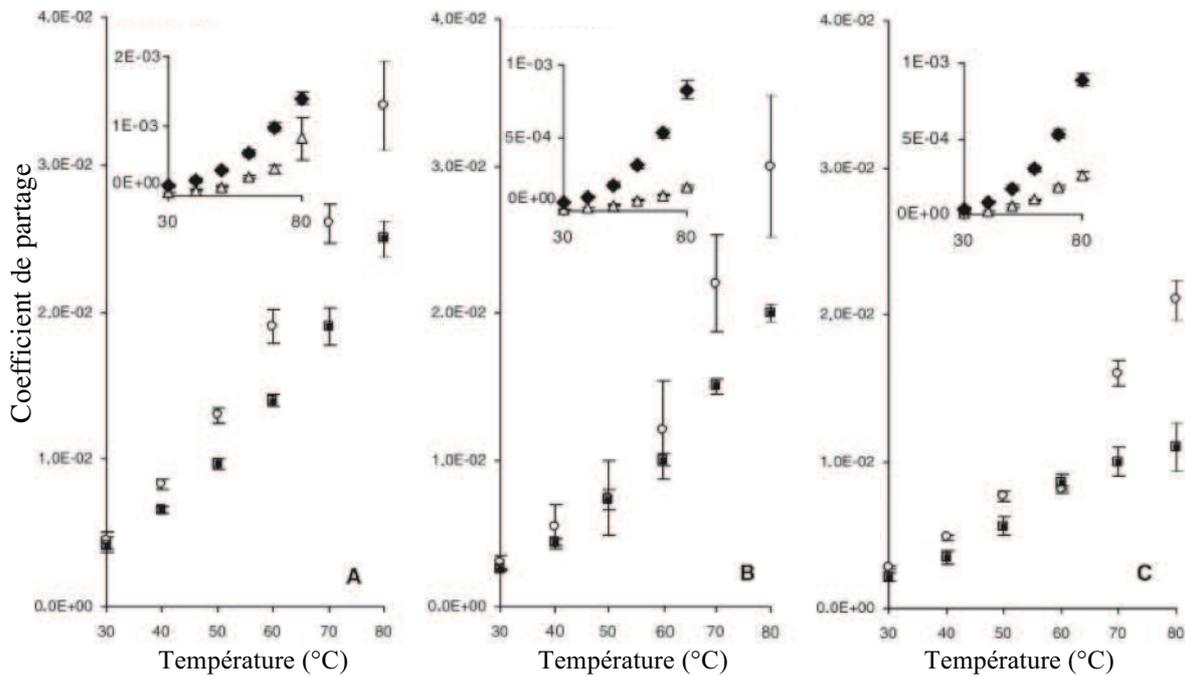


Figure 9. Evolution des coefficients de partage d'esters (A : acétate d'isoamyle ; B : acétate d'amyle ; C : pentanoate d'éthyle) en fonction de la température dans différentes matrices laitières : eau (o), lait écrémé (■), lait entier (Δ), crème entière (◆).

Une relation linéaire existe en représentant le logarithme du coefficient de partage en fonction de $1/T$. L'évolution du coefficient de partage en fonction de la température résulte de la dépendance de γ_i et de P_i^0 à la température. Toutefois γ_i varie peu avec la température et c'est principalement P_i^0 qui varie de façon exponentielle selon la loi de Gibbs-Duhem, représentée dans les bases de données par l'équation d'Antoine. Cette relation donne la pression de vapeur d'un constituant pur en fonction de la température (Poling et al. 2000) :

$$\text{Log } P_i^0(T) = A - B/(T+C) \quad \text{Equation 8}$$

La pression est exprimée en bar, la température en °C. Les paramètres A , B et C , dits paramètres d'Antoine, sont déterminés de manière empirique et ne sont valables que sur un intervalle de température donné. Certains sont disponibles sur le site de l'Institut National des Standards et de la Technologie (webbook.nist.gov/), et dans le livre *Lange's Handbook of Chemistry* (Dean 1999).

La dépendance à la température peut être représentée par l'équation de Clausius-Clapeyron

$$\frac{d \ln P_i^0(T)}{dT} = \frac{\Delta H_{vap}}{RT^2} \quad \text{Equation 9}$$

où R est la constante universelle des gaz parfaits (8.314 J/mol.K), T est la température en Kelvin (K), et ΔH_{vap} est l'enthalpie de vaporisation (J/mol).

Pour exprimer les variations du coefficient de partage entre une matrice et de l'air en fonction de la température, l'**Equation 10** peut être proposée, à partir de la loi de Clausius-Clapeyron.

$$\ln K_i = -\frac{\Delta H_{vap}}{RT} + C \quad \text{Equation 10}$$

La relation linéaire existant entre le logarithme du coefficient de partage et l'inverse de la température permet d'accéder à la valeur de l'enthalpie de vaporisation ΔH_{vap} pour un composé i dans une matrice donnée.

2.1.5. Méthodes de détermination du coefficient de partage

Il existe différentes méthodes expérimentales pour déterminer les coefficients de partage gaz – liquide ou gaz – matrice alimentaire, applicables aux composés d'arôme.

Les méthodes les plus fréquemment utilisées peuvent être classées en trois groupes : les méthodes différentielles, les méthodes dynamiques d'espace de tête et les méthodes statiques.

2.1.5.1. Les méthodes différentielles

Le principe de ces méthodes est basé sur la mesure d'une propriété particulière d'un soluté dans différents systèmes (le point d'ébullition, le point de condensation ou encore la pression partielle) (Alessi et al. 1991, Eckert & Sherman 1996, Raal 2000). Par comparaison, on peut ainsi quantifier l'impact de l'environnement du soluté sur les propriétés étudiées. Les méthodes différentielles sont principalement utilisées pour déterminer des coefficients d'activité à dilution infinie (γ_i^∞) et permettent de remonter au coefficient de partage. Ces méthodes sont certes précises mais peu adaptées à des systèmes complexes et polyphasiques tels que des aliment réels (Athès et al. 2004).

2.1.5.2. Les méthodes dynamiques d'espace de tête

La plupart des méthodes dynamiques sont basées sur la méthode dite de « dilution exponentielle ». Une quantité connue de solution contenant les composés d'arôme est introduite dans un flacon de volume connu. Un gaz inerte est injecté et entraîne les composés volatils contenus dans le flacon (Leroi et al. 1977). La concentration des composés d'arôme dans le gaz récupéré en sortie est suivie par chromatographie en phase gazeuse (Jouenne & Crouzet 2000) ou plus récemment par spectrométrie de masse par réaction de transfert de proton (PTR - MS) (Karl et al. 2003). On obtient

alors soit une surface de pic A proportionnelle à la concentration dans la phase gazeuse, soit directement une concentration. Au cours de l'entraînement par le gaz, l'équilibre thermodynamique s'établit entre les bulles de gaz et la solution. Dans les premières minutes, la concentration croît puis se stabilise et décroît rapidement de manière exponentielle. Le coefficient d'activité à dilution infinie γ_i^∞ est déterminé à partir du profil de concentration obtenu expérimentalement lors de la décroissance exponentielle (Jouenne & Crouzet 2000, Duhem & Vidal 1978) à partir de l'**Equation 11** :

$$\ln(A) = -\frac{Q}{RT} \frac{P_{i(T)}^0}{n} \gamma_i^\infty t + \ln(A_0) \quad \text{Equation 11}$$

où A est la surface du pic à l'instant t , A_0 la surface de pic extrapolée au temps initial, t le temps passé depuis l'introduction de la matrice dans le flacon (min), Q le débit volumique du gaz vecteur (mL/min), n le nombre de moles du solvant dans la matrice (mol), R la constante universelle des gaz parfaits exprimée en mL.atm/mol.K, T la température (K) et $P_{i(T)}^0$ la pression de vapeur saturante du composant i (atm).

Cette technique peut être utilisée pour un grand nombre de composés d'arôme, mais n'est pas adaptée pour le cas de composés d'arôme en mélange car le suivi de la décroissance exponentielle de chaque molécule par chromatographie en phase gazeuse devient difficile à cause du délai lié à l'étape de séparation de la chromatographie. Par ailleurs, la nécessité de connaître la valeur de la pression de vapeur saturante du composé pur pour accéder au coefficient de partage rend son utilisation difficile (Dufour & Bayonove 1999a, Atlan 2007).

2.1.5.3. Les méthodes statiques

Méthode avec étalonnage en phase liquide (Liquid Calibration-Static Headspace, LC-SH)

Cette méthode, la plus répandue depuis les années 1970 (Buttery et al. 1969), découle directement de la définition du coefficient de partage puisque elle est basée sur la mesure de la concentration de l'espace de tête par chromatographie en phase gazeuse lorsque l'équilibre thermodynamique entre le produit et la phase gazeuse est atteint. Le coefficient de partage est calculé en réalisant le rapport des concentrations dans chacune des phases (**Equation 7**). Pour déterminer les concentrations gazeuses en composés d'arôme, un étalonnage liquide est préalablement réalisé. Cependant, cet étalonnage en phase liquide peut être une source d'erreur car il multiplie les modes d'injection : gazeux pour l'échantillon et liquide pour l'étalon. Une autre source d'erreur peut provenir de la détermination de la concentration des composés d'arôme dans la matrice. De nombreux auteurs considèrent raisonnablement que la concentration à l'équilibre est très proche de la concentration initiale, ce qui peut entraîner un biais pour les composés les plus volatils (Nahon et al. 2000).

Méthode avec étalonnage en phase vapeur (Vapour Phase Calibration, VPC)

Cette méthode, mise au point par Kolb et al. (1992) et basée sur le même principe que la méthode précédente, présente l'avantage de s'affranchir des erreurs liées à l'utilisation des deux modes d'injection (liquide pour la calibration et gazeux pour l'échantillon). En effet, l'étalonnage et le dosage de l'échantillon se font en phase gazeuse. Pour l'étalonnage, une quantité connue de composés d'arôme est introduite dans un flacon vide et mise à l'équilibre thermodynamique à une température donnée. La surface de pic résultante est proportionnelle à la concentration en phase gazeuse à un facteur F près qui correspond à la réponse du détecteur. Étant donné que la concentration dans la phase gazeuse est connue, le facteur F peut alors être déterminé. Whitehead et Sandler (1999) ont modifié l'étape de calibration en utilisant de l'arôme pur dans le flacon d'étalonnage à différentes températures. Ils peuvent ainsi faire le lien entre la pression de vapeur saturante et la surface de pic conduisant à la droite d'étalonnage. Il est nécessaire pour cela de connaître la loi de variation de la pression de vapeur saturante du composé étudié avec la température (loi d'Antoine). De plus, l'utilisation de composés purs augmente considérablement le coût de cette méthode (Athès et al. 2004).

Comme nous venons de le voir, les étapes d'étalonnage sont bien souvent des sources d'erreur (Chaintreau et al. 1995). C'est pour cette raison que des méthodes ne nécessitant pas d'étalonnage ont été développées.

Méthode basée sur la variation du rapport des volumes de phases (Phase Ratio Variation, PRV)

La méthode PRV, développée par Ettre et al. (1993) permet de déterminer le coefficient de partage en s'affranchissant de l'étape d'étalonnage du détecteur. Le principe est de mesurer la quantité de matière dans plusieurs flacons contenant différents volumes de matrice. Plusieurs flacons de volume V_v sont remplis de différents volumes V_l mesurés de matrice, de concentration initiale en composé d'arôme (C_{ini}^{liq}). En considérant qu'il n'y a pas de perte de composé d'arôme au cours du temps, à l'équilibre thermodynamique les composés d'arôme sont répartis entre la matrice et la phase gazeuse et vérifient le bilan de matière suivant :

$$C_{ini}^{liq}V_l = C_i^{liq}V_l + C_i^{gas}V_g \quad \text{Equation 12}$$

avec C_{ini}^{liq} la concentration du composé d'arôme dans le produit à l'instant initial, C_i^{liq} et C_i^{gas} les concentrations respectivement dans la matrice et la phase gazeuse à l'équilibre thermodynamique, V_l et V_g les volumes de matrice et de gaz au dessus de la matrice.

L'analyse de l'espace de tête par chromatographie en phase gazeuse conduit à une surface de pic, proportionnelle à la concentration dans la phase gazeuse au facteur de réponse f du détecteur près.

$$A = fC^{gas} \quad \text{Equation 13}$$

Ettre et al. (1993) ont introduit le paramètre β représentant le rapport entre le volume de gaz et celui de la matrice dans le flacon.

$$\beta = \frac{V_g}{V_l} \quad \text{Equation 14}$$

En divisant les termes du bilan de matière (**Equation 12**) par C_i^{gas} et V_g , et à l'aide du rapport β et du coefficient de partage gaz/liquide k_i , la relation entre la surface de pic et le coefficient de partage gaz/liquide peut être établie :

$$A = \frac{fC_{ini}^{liq}}{k_i^{-1} + \beta} \quad \text{Equation 15}$$

Cette équation peut également s'écrire de la manière suivante :

$$\frac{1}{A} = \frac{1}{fC_{ini}^{liq}} \beta + \frac{1}{fC_{ini}^{liq}} \frac{1}{k_i} \quad \text{Equation 16}$$

Expérimentalement, une variation du rapport β conduit à une variation de la surface de pic A . On retrouve donc une équation linéaire du type $y = ax+b$, avec $x = \beta$, $y = \frac{1}{A}$, $a = \frac{1}{fC_{ini}^{liq}}$ et $b = \frac{1}{fC_{ini}^{liq}} \frac{1}{k_i}$.

Le coefficient de partage est alors égal au rapport entre pente et ordonnée à l'origine : $k_i = \frac{a}{b}$.

La résolution de cette équation passe donc classiquement par une régression linéaire (Ettre et al. 1993, Jouquand et al. 2004). Toutefois comme le montrent Atlan et al. (2006), ce type de résolution peut entraîner un biais dû à la transformation non-linéaire des surfaces de pic mesurées par la fonction inverse ($1/x$). Atlan et al. (2006) suggèrent que la méthode de résolution par régression non linéaire soit préférée pour le traitement des données car elle fournit des intervalles de confiance de largeur réduite.

L'avantage de la méthode est qu'elle ne nécessite ni la connaissance d'un γ_i^∞ ou de la pression de vapeur saturante du composé pur, ni un étalonnage. Cependant, les limites de cette méthode sont liées à la précision analytique de l'appareillage, puisque les mesures portent sur de petites différences de concentration. Elles reposent également sur la difficulté de mise en œuvre expérimentale, à savoir

l'introduction d'un petit volume de matrice (entre 50 et 2000 μL) dans les flacons.

Méthode basée sur le partage à l'équilibre dans des systèmes fermés (Equilibrium Partitioning In Closed Systems, EPICS)

Cette méthode repose sur le même principe que la méthode PRV (variation des volumes). Cependant, au lieu d'avoir une concentration constante en composés d'arôme dans la matrice, on utilise une quantité constante en composés d'arôme (Gosset 1987).

La principale limite de cette méthode réside dans la préparation des échantillons. En effet, il est nécessaire d'avoir des flacons dans lesquels la quantité de composés d'arôme est constante et connue avec précision.

2.1.5.4. Synthèse des méthodes de détermination du coefficient de partage gaz – liquide et critères d'application.

Les différentes méthodes décrites précédemment pour la détermination du coefficient de partage gaz – liquide des composés d'arôme dans différents milieux sont résumées dans le **Tableau 5**.

Le coefficient de partage entre une phase liquide (ou solide) et un gaz est une propriété caractéristique du système à l'équilibre. Les méthodes disponibles à ce jour s'appuient toutes sur des mesures par chromatographie en phase gazeuse, mais présentent des seuils de sensibilité différents suivant le type d'injection (en phase gazeuse ou en phase liquide) lors de la mise en œuvre expérimentale.

Toutes les méthodes présentées ne sont pas valides pour des matrices complexes, ou pour des composés d'arôme en mélange. Certaines méthodes de détermination sont expérimentalement difficiles à mettre en œuvre (EPICS) ou nécessitent un étalonnage externe (LC-SH, VPC).

Nous avons également vu qu'il existait plusieurs sources d'erreur dans la détermination du coefficient de partage, notamment la connaissance exacte de la concentration initiale de la matrice et l'étalonnage du détecteur. La méthode PRV semble la plus adaptée car elle permet de s'affranchir d'une de ces erreurs expérimentales (l'étalonnage du détecteur) et car elle est relativement simple à mettre en œuvre.

Nous avons présenté la propriété qui caractérise la répartition des composés d'arôme entre deux phases à l'équilibre, sa définition ainsi que les méthodes de détermination, et évoqué les interactions possibles entre composés d'arôme et matrice de type vin. Nous allons maintenant nous attacher aux propriétés dynamiques de la libération des composés d'arômes au sein d'une matrice.

Tableau 5. Synthèse des méthodes de détermination du coefficient de partage air/produit des composés d'arôme (CA) et critères d'application.

Nom de la méthode	Paramètre déterminé	Principe	Produit	Avantages	Inconvénients	Référence
Méthodes différentielles	Coefficient d'activité à dilution infinie	Mesure d'une propriété du CA (point d'ébullition, de condensation ou encore la pression partielle) en solution diluée et comparaison	Solution diluée d'un composé d'arôme	Précise	Non adaptée à des produits complexes et multiphasiques Non adaptée aux mélanges de CA	Alessi et al. 1991
Méthode de dilution exponentielle	Constante de Henry	Suivi au cours du temps de l'épuisement des CA dans la phase vapeur	Solution de composés d'arôme en mélange	Pas d'étalonnage	Non adaptée aux solutions gélifiées et aux produits solides	Leroi et al. 1977 Jouenne et Crouzet, 2000 Karl et al. 2003
Liquid Calibration – Static Headspace (LC-SH)	Coefficient de partage	Mesure de la concentration en CA dans l'espace de tête à l'équilibre thermodynamique par un étalonnage externe liquide	Tout type de produit	Rapide et simple	Étalonnage en phase liquide Connaissance parfaite de la C_{ini} en CA	Buttery et al. 1969 Nahon et al. 2000
Vapour Phase Calibration (VPC)	Coefficient de partage	Mesure de la concentration en CA dans l'espace de tête à l'équilibre thermodynamique par un étalonnage externe gazeux	Tout type de produit	Calibration et injection en phase gazeuse	Nécessité de connaître la loi de variation de la P_{sat} du composé étudié Méthode onéreuse	Kolb et al. 1992 Whitehead et Sandler, 1999
Phase Ratio Variation (PRV)	Coefficient de partage	Variation des ratios de volume de produit/gaz où les concentrations en CA dans le produit sont identiques	Tout type de produit	Pas d'étalonnage Pas nécessaire de connaître la C_{ini} en CA	Peu adapté dans le cas des CA peu volatils ($k < 10^{-4}$)	Ettre et al. 1993
Equilibrium Partitioning In Closed Systems (EPICS)	Coefficient de partage	Variation des ratios de volume gaz/produit où les quantités de CA dans le produit sont identiques	Tout type de produit	Pas d'étalonnage Pas nécessaire de connaître la C_{ini} en CA	Nécessité d'avoir une quantité en CA constante dans chaque flacon et parfaitement connue	Gosset, 1987

CA : composés d'arôme ; C_{ini} : concentration initiale en composé d'arôme

2.2. Les propriétés dynamiques

La quantification de la mobilité des composés d'arôme est un élément déterminant dans la compréhension des mécanismes de libération dans une matrice alimentaire dès son étape d'élaboration jusqu'au processus de consommation.

Le transfert des composés d'arôme peut avoir lieu vers le gaz qui entoure le produit (au cours du procédé, dans la bouche) ou encore vers l'emballage (pendant le stockage). La mobilité des molécules d'arôme peut être étudiée au sein d'une même phase (transport) ou entre plusieurs phases (transfert).

De nombreuses forces motrices peuvent être à l'origine du transport de molécules au sein d'un milieu : les différences de potentiel chimique et/ou de température, et/ou de pression, un entraînement global (convection), des interactions de nature électrique ou encore un couplage avec une autre espèce chimique. Considérons un système simple, composé de deux phases, 1 et 2, et un soluté i contenu dans la phase 1. Le soluté i peut migrer de la phase 1 à la phase 2 selon deux mécanismes qui diffèrent par la force motrice à l'origine de ce transfert (van Ruth & Roozen 2010) :

- i) le transport par **diffusion** des solutés au sein d'une phase non agitée, dû à un gradient de potentiel chimique. Cette diffusion moléculaire se traduit par un mouvement aléatoire au niveau moléculaire dit « mouvement brownien » dans le fluide stagnant.
- ii) la **convection**, qui découle de l'action d'une force extérieure. La convection peut être naturelle (gradient thermique) ou forcée (système agité).

La diffusion et la convection sont donc les deux mécanismes qui gouvernent les transferts de matière des composés d'arôme, les phénomènes convectifs étant prédominants dans la matrice type moût de fermentation alcoolique, pour la vinification, que nous étudions.

Quel que soit le mécanisme de transfert de matière d'un soluté i mis en jeu, le système tend vers un équilibre thermodynamique, correspondant à l'égalité des potentiels chimiques entre les phases, à une température donnée et caractérisé par le coefficient de partage à l'interface entre les phases.

2.2.1. Transfert de composés d'arôme entre deux phases agitées : définition du coefficient de transfert

Dans le cas où le système est agité, le transfert des composés s'opère selon le phénomène de **convection**. Si on considère un système fermé composé de deux phases liquide et gazeuse agitées et supposées homogènes, les concentrations en soluté i dans les phases liquide et gazeuse sont C^{liq} et C^{gas} , à l'interface les concentrations sont $C^{\text{liq}*}$ (côté phase liquide) et $C^{\text{gas}*}$ (côté phase gazeuse). k_i est le coefficient de partage du composé i suivi entre les phases gazeuse et liquide (**Figure 10**).

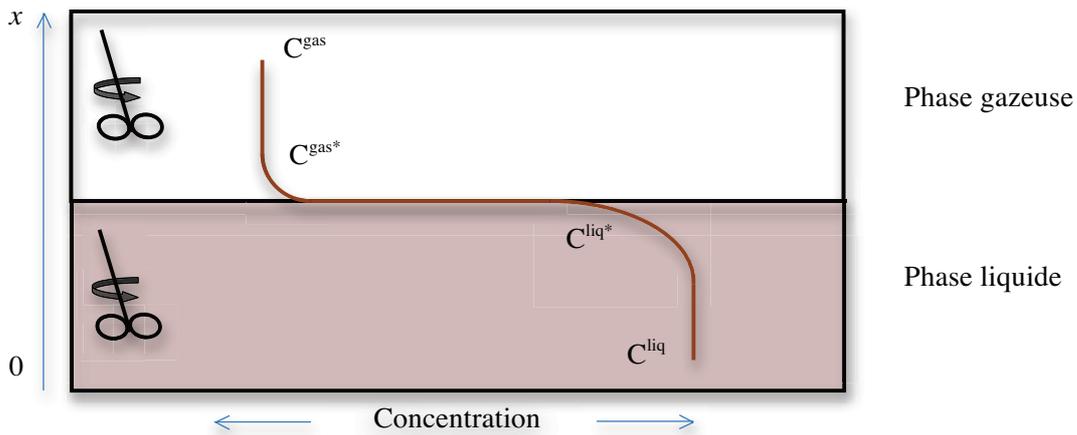


Figure 10. Représentation du profil de concentration d'un composé d'arôme dans un système biphasique agité.

L'expression de la densité de flux de transfert de matière par convection dans la phase liquide s'écrit :

$$j^l = k^l (C^{liq} - C^{liq*}) \quad \text{Equation 17}$$

où j^l est le flux de transfert de matière (en kg/s.m^2), k^l le coefficient de transfert de matière dans la phase liquide (en m/s).

De même, dans la phase gazeuse, la densité de flux de transfert de matière s'écrit :

$$j^g = k^g (C^{gas*} - C^{gas}) \quad \text{Equation 18}$$

où k^g est le coefficient de transfert de matière dans la phase gazeuse (en m/s).

En supposant que les couches interfaciales sont infiniment fines et qu'il n'y a pas d'accumulation à l'interface, les densités de flux de matières sont égales :

$$k^g (C^{gas*} - C^{gas}) = k^l (C^{liq} - C^{liq*}) \quad \text{Equation 19}$$

L'équilibre local au niveau de l'interface est supposé être atteint à tout moment. Le coefficient de partage est donné par la relation suivante :

$$k_i = \frac{C^{gas*}}{C^{liq*}} \quad \text{Equation 20}$$

En appliquant le principe des résistances en série, la densité de flux total j entre la matrice et la phase gazeuse peut alors être exprimée en fonction d'un coefficient de transfert de matière global k_0 (m/s) (Marin et al. 1999) :

$$j = k_0(k_i C^{liq} - C^{gas})$$

Equation 21

avec

$$\frac{1}{k_0} = \frac{1}{k^g} + \frac{k_i}{k^l}$$

Equation 22

Le coefficient de transfert de matière d'un soluté i dans un fluide est une grandeur propre à chaque système et dépend des propriétés de chaque soluté mais également du fluide et des conditions hydrodynamiques. Il s'avère donc difficile de comparer les valeurs d'un système à l'autre. Il permet néanmoins de comparer de manière relative les vitesses de libération de solutés d'une matrice à l'autre dans un même système.

2.2.2. Etude de la libération de composés volatils à partir de matrices alimentaires liquides

Pour représenter la dynamique de composés d'arôme dans des systèmes alimentaires, les modèles mécanistiques sont souvent privilégiés, car les phénomènes sont explicités (Atlan 2007). Ces modèles s'appuient sur l'écriture des lois de transfert des composés d'arôme (équations 17 à 22). L'étude de la libération des composés d'arôme nécessite la connaissance de la géométrie du système ainsi que des propriétés physicochimiques des matrices et des composés d'arôme. Le verrou restant souvent à lever pour l'analyse des transferts est la connaissance et la prédiction des propriétés d'équilibre aux interfaces de transfert.

Dans le cas de la vinification, nous avons vu précédemment que la synthèse d'alcools supérieurs et d'esters pendant la fermentation contribue de façon très significative à la qualité du vin. Le contrôle de la production et de la libération de ces composés volatils à partir du milieu de fermentation constitue donc l'un des principaux moyens pour maîtriser les caractéristiques organoleptiques des vins. Les concentrations en composés d'arôme à la fin de la fermentation dépendent bien sûr de la quantité synthétisée par les levures, mais elles peuvent aussi être sensiblement modifiées par les pertes dans le CO₂ libéré au cours de la fermentation. Par conséquent, la compréhension et la modélisation du transfert des composés d'arôme entre les phases gazeuse et liquide peuvent être extrêmement utiles. Le couplage à des modèles prédictifs de la synthèse de composés volatils, basés sur la connaissance des voies biochimiques impliquées, pourrait également apporter des éléments de compréhension, mais ces modèles n'existent pas pour l'instant dans le domaine œnologique. Quelques auteurs ont proposés des modèles en conditions de fermentation brassicoles (Gee & Ramirez 1994, Trelea et al. 2001b, Trelea et al. 2004).

Des modèles de libération des composés volatils à partir de matrices alimentaires liquides ont été développés, afin de quantifier les transferts entre matrices et phase gazeuse (Banavara et al. 2002).

Cependant, aucun n'est directement applicable à des conditions de vinification, la matrice étant en perpétuelle évolution au cours de la fermentation. De plus, les conditions hydrodynamiques sont très différentes, avec notamment la présence de bulles de CO₂ qui favorisent le transfert par entraînement des molécules volatiles. Néanmoins ces études sur la libération de composés d'arôme à partir de matrices alimentaires ont mis en évidence la nécessité de connaître ou de savoir prédire la volatilité, ou coefficient de partage k_i , pour pouvoir modéliser la libération des molécules.

Comme nous l'avons vu précédemment, les coefficients de partage peuvent être mesurés expérimentalement. Il est parfois possible d'accéder à des estimations de volatilités à partir de valeurs telles que la pression de vapeur d'un composé, les volumes molaires des phases gazeuse et liquide et le coefficient d'activité du composé dans une matrice donnée (Voilley et al. 1977), mais ces valeurs sont loin d'être connues pour tous les composés d'arôme. Il existe des modèles de prédiction de coefficient d'activité, complètement prédictifs comme UNIFAC, modèle de contribution de groupes (Reid et al. 1987), mais ces modèles ont été développés pour les milieux organiques et en mélanges simplifiés, loin de la réalité d'une matrice alimentaire. Certains modèles permettent d'estimer directement un coefficient de partage, en utilisant les relations quantitatives structure-propriété (QSPR). Ces modèles QSPR ont été notamment développés pour estimer la solubilité de composés dans l'eau et leurs pressions de vapeur saturante, permettant ainsi de calculer le coefficient de partage air/eau (Katritzky et al. 1998). Ce modèle a été généré, pour des études concernant le devenir de polluants environnementaux dans l'eau, là encore un mélange simplifié. Cependant l'équipe de Friel et al. (2000) a suggéré que le modèle QSPR est applicable au comportement de composés d'arôme et a modélisé l'effet de la présence de sucre sur la concentration de composés volatils en phase gazeuse.

Quelques auteurs ont étudié la libération de composés d'arôme dans un contexte œnologique, mais ces études étaient ciblées sur des vins finis (Robinson et al. 2009, Tsachaki et al. 2008) et ne concernaient pas l'évolution des propriétés des composés d'arôme en cours de fermentation.

Ferreira et al. (1996) ont estimé des pertes de composés volatils en simulant des fermentations alcooliques œnologiques, mais ce modèle ne prend pas en compte l'effet de l'évolution de la composition de la matrice en cours de fermentation (changement de la teneur en sucre et en éthanol).

3. Démarche adoptée

La détermination de grandeurs physico-chimiques telles que les coefficients de partage des composés d'arôme apparaît nécessaire pour la compréhension des mécanismes impliqués dans la libération des composés volatils lors de la fermentation alcoolique et en vue du développement de modèles mécanistiques simulant cette libération.

Ainsi, dans un premier temps, nous avons choisi de réaliser des mesures de coefficients de partage de ces composés, en conditions statiques, et pour différents milieux œnologiques, dans le but de quantifier des effets éventuels de variations de composition des matrices. Le choix des composés d'arômes s'est tourné vers l'acétate d'éthyle, l'acétate d'isoamyle, l'hexanoate d'éthyle, l'isobutanol et l'alcool isoamylique, qui sont de bons marqueurs de la famille des esters et des alcools supérieurs. Ces cinq composés sont en outre des arômes fermentaires présents dans le vin à des concentrations significatives. Les arômes variétaux, également cités dans la bibliographie comme importants au niveau organoleptique, ne sont pas pris en compte dans cette étude du fait de leurs très faibles concentrations dans les vins. En effet, ils sont très difficiles à détecter grâce aux méthodes choisies d'analyse de l'espace de tête couplée à la chromatographie en phase gazeuse.

L'analyse des travaux de la littérature nous a montré que plusieurs facteurs pouvaient influencer les coefficients de partage (k_i) des composés d'arôme mais trois d'entre eux semblent plus particulièrement importants : les concentrations en sucre et en éthanol et la température.

Dans le chapitre 1, nous avons donc choisi de nous focaliser sur ces paramètres. L'effet de la présence de dioxyde de carbone dans l'headspace sur les coefficients de partage de composés d'arôme n'ayant pas été étudiée, nous avons également réalisé des mesures en présence de CO_2 afin d'évaluer son effet potentiel. Pour étudier l'influence de la composition de la matrice nous avons travaillé avec des solutions synthétiques, simulant le début et la fin de la fermentation, à une température constante de 25°C. L'effet de la température a également été évalué dans la gamme d'intérêt œnologique, entre 15 et 30°C. La validité de l'utilisation d'un milieu synthétique en remplacement d'un moût réel pour ces mesures a été également vérifiée. Au vu de la bibliographie sur les différentes méthodes existantes pour déterminer les coefficients de partage liquide – gaz, nous avons choisi la méthode PRV (Phase Ratio Variation) qui paraît la mieux adaptée à nos conditions. Les niveaux usuels de leurs concentrations (de l'ordre de quelques dizaines de mg/L) permettent de poser l'hypothèse que les composés d'arôme se trouvent dans des conditions de solutions infiniment diluées, c'est à dire que (i) les interactions moléculaires entre les composés d'arôme sont négligeables et (ii) les coefficients de partage est indépendant de la concentration du composé volatil étudié.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la libération des composés volatils en conditions réelles de fermentation. Pour étudier l'effet du dégagement du CO_2 , nous avons réalisé des fermentations pendant lesquelles la vitesse de production du CO_2 était maintenue constante grâce à des ajouts contrôlés d'azote (cf 1.1.2.1). En modifiant la concentration initiale en azote assimilable, il était possible d'obtenir, pour une même température, différents niveaux de $d\text{CO}_2/dt$.

Dans le chapitre 2, après avoir décrit l'impact des différents paramètres (sucre, éthanol, température, dégagement de CO_2), nous avons élaboré un modèle permettant de calculer k_f et ainsi (i) d'estimer les concentrations dans le moût en fermentation à partir du suivi en ligne et (ii) de réaliser des bilans de production avec, en particulier, une estimation des pertes dans le gaz effluent.

Enfin, dans le chapitre 3, nous avons calculé les cinétiques de production et de pertes tout au long de la fermentation avant de nous focaliser sur l'effet de la température afin de déterminer, à l'aide des bilans de production, si cet effet était lié avant tout à des phénomènes microbiologiques (modification du métabolisme) ou physiques (pertes dans le gaz effluent).

Matériels et méthodes

1. Mesure des propriétés d'équilibre gaz – liquide

1.1. Composés volatils étudiés

Les composés volatils étudiés au cours de ce travail sont l'acétate d'éthyle, l'acétate d'isoamyle, l'hexanoate d'éthyle, l'isobutanol et l'alcool isoamylique.

Les composés utilisés sont tous de qualité analytique (>98%) et proviennent de chez Merck (Darmstadt, Allemagne) et Aldrich (Steinheim, Allemagne). Leurs propriétés physico-chimiques sont présentées dans le **Tableau 6**. A partir des composés purs, des solutions mère de composés d'arôme ont été préparées dans l'éthanol absolu (BDH, France) à 20000 ppm (v/v) pour les esters et à 100000 ppm (v/v) pour les alcools supérieurs. Ces solutions ont été stockées à -80°C et utilisées pour préparer des milieux modèles représentant le moût à différents stades de la fermentation et pour enrichir le moût naturel (lorsque c'était nécessaire pour mesurer le k_i par la méthode PRV en condition statique).

1.2. Milieux modèles

1.2.1. Milieux modèles simulant le moût et le vin

Dans les milieux modèles, les concentrations sont de 20 ppm (v/v) pour les esters et de 100 ppm (v/v) pour les alcools supérieurs.

Pour le milieu modèle simulant le moût, 220 g/L de glucose ont été ajoutés à une solution tampon contenant 6 g/L d'acide citrique et 6 g/L d'acide malique ajustée à pH 3,3 avec de l'hydroxyde de sodium. Pour le milieu modèle simulant le vin, la solution tampon a été additionnée de 13% (v/v) d'éthanol et des composés volatils, sans ajout de glucose.

1.2.2. Milieux modèles simulant des moûts à différentes étapes de fermentation

Pour simuler la matrice liquide œnologique à différents stades de la fermentation et mesurer le coefficient de partage (k_i) entre les phases gaz et liquide à ces avancements de réaction, nous avons complété la solution tampon contenant les composés volatils avec des concentrations en sucre et en alcool correspondant à 0, 20, 40, 60, et 100% d'avancement de la fermentation.

Tableau 6. Principales caractéristiques physico-chimiques des composés volatils étudiés.

Famille	N°CAS	Nom usuel	Pureté (%)	Masse molaire (g/mol)	Température d'ébullition ^(a) (°C)	Solubilité dans l'eau à 25°C ^(b) (g/L)	logK _{ow} à 25°C ^(b)	P _{i(T)} ⁰ à 25°C (mmHg)
Alcools	78-83-1	Isobutanol	99,5	74,1	107,8	85	0,76	10,5
	123-51-3	Alcool isoamylique	≥ 99	88,2	131,1	26,7	1,16	2,37
Esters	141-48-6	Acétate d'éthyle	99,8	88,1	77,1	80	0,73	93,2
	123-92-2	Acétate d'isoamyle	≥ 99	130,2	142,5	2	2,25	5,60
	123-66-0	Hexanoate d'éthyle	≥ 99	144,2	167	0,629	2,83	1,56

^(a)NIST web book et ^(b)SRC PhysProp database

1.3. Détermination des coefficients de partage gaz-liquide (k_i)

Les coefficients de partage gaz-liquide (k_i) des composés volatils ont été déterminés dans des solutions modèles et des moûts naturels en fermentation par la méthode PRV, dont le principe a été présenté en partie 2.1.5.3 de la synthèse bibliographique et comme décrit précédemment par Athès et al. (2004).

1.3.1. Préparation de l'échantillon

Des volumes croissants de 50 μ L à 2 mL du milieu étudié ont été introduits dans quatre flacons headspace (22 mL, Chromacol, France) différents. Les vials ont été sertis avec un septum en Teflon/silicone qui permet d'assurer l'étanchéité du système. Les rapports de volume (β) obtenus sont compris entre 9,8 et 437. Les flacons ont ensuite été maintenus à la température choisie (15, 20, 25 et 30 °C) pendant au moins 1 h de manière à atteindre l'équilibre. La détermination du temps nécessaire pour atteindre l'équilibre en conditions statiques a été auparavant réalisée par une mesure de la cinétique d'atteinte de l'équilibre à partir du moment de la préparation. Le gaz contenu dans l'espace de tête a ensuite été analysé par chromatographie en phase gazeuse.

1.3.2. Chromatographie en phase gazeuse

Après mise à l'équilibre, 1 mL de gaz de l'espace de tête est automatiquement prélevé à l'aide d'une seringue gaz étanche, préchauffée à une température de 15°C supérieure à la température étudiée. L'échantillon gazeux est alors injecté dans un chromatographe en phase gazeuse HP couplé à un spectromètre de masse HP 5973. La température de l'injecteur est réglée à 245°C et le débit d'injection est de 100 μ L/s. Chaque échantillon n'est prélevé qu'une seule fois mais trois flacons répliquats par solution sont effectués. La colonne utilisée est une colonne Optima-Wax capillaire (30 m * 0,25 mm * 0,25 μ m) fournie par Macherey-Nagel. L'hélium est utilisé comme gaz vecteur à un débit constant de 1 mL/min. Le programme de température du four est le suivant : rampe à 4 °C/min de 40 à 80°C et rampe à 8°C/min de 80 à 200°C. L'acquisition des aires de pics est réalisée grâce au logiciel Hewlett-Packard Chemstation.

1.3.3. Calcul des coefficients de partage

Les coefficients de partage ont été calculés à partir de l'équation établie par Ettre et al. (1993) :

$$\frac{1}{A} = \frac{1}{fC_{ini}^{liq}} \beta + \frac{1}{fC_{ini}^{liq}} \frac{1}{k_i}$$

Equation 16

où A représente l'aire du pic, β correspond au rapport de volume entre les phases gaz et liquide, C_{ini}^{liq} est la concentration du composé d'arôme dans le produit à l'instant initial et k_i est le coefficient de partage.

Expérimentalement, une variation du rapport β conduit à une variation de la surface de pic A . On retrouve donc une équation linéaire du type $y=ax+b$, avec $x = \beta$, $y = \frac{1}{A}$, $a = \frac{1}{fC_{ini}^{liq}}$ et $b = \frac{1}{fC_{ini}^{liq}} \frac{1}{k_i}$. Le coefficient de partage est alors égal au rapport entre pente et ordonnée à l'origine : $k_i = \frac{a}{b}$.

1.3.4. Effet du dioxyde de carbone

L'effet du remplacement de l'air par le dioxyde de carbone a été étudié en utilisant le milieu modèle contenant 220 g/L de glucose. Nous avons fait buller du CO_2 dans la solution à un débit de 100 mL/min avant d'ajouter les composés volatils et d'ajuster le volume final. La solution liquide ainsi obtenue a été placée dans des flacons dont l'espace de tête avait été saturé avec du CO_2 . Le coefficient de partage a été déterminé par la méthode PRV, après avoir atteint l'équilibre dans les flacons.

1.3.5. Mesure du coefficient de partage sur des prélèvements de moût en cours de fermentation

Le coefficient de partage en condition statique a également été déterminé pour des échantillons provenant d'une fermentation sur moût réel. Les caractéristiques initiales du moût réel utilisé sont : teneur en sucre égale à 180 g/L, concentration en azote assimilable égale à 40 mg/L, et pH 3,52. Des échantillons correspondant à 0, 20, 40, 60, et 100% de progression de la fermentation ont été prélevés, centrifugés à 8000g pendant 10 min puis stockés à $-18^\circ C$. Pour le moût initial et les échantillons à 20 et 40% d'avancement de réaction, un ajout de composés volatils a été réalisé car pour ces échantillons, les concentrations en composés d'arôme sont encore trop faibles pour être correctement quantifiées en CPG. Ensuite, le coefficient de partage a été déterminé par la méthode PRV.

2. Suivi de la production des composés volatils en fermentation œnologique

2.1. Conditions opératoires

2.1.1. Souches de levure

Les souches de levure *Saccharomyces cerevisiae* WAM, EC1118 et K1 ont été utilisées pour l'ensemble des expériences. Elles sont produites sous forme de LSA (Levure Sèche Active) par la société Lallemand SA.

Chaque cuve de fermentation a été inoculée avec 0,2 g/L de LSA préalablement réhydratée dans une solution à 50 g/L de glucose pendant 30 minutes à 37°C.

2.1.2. Milieux de fermentation

2.1.2.1. Moût synthétique

Le milieu synthétique choisi (Tableau 7) présente les caractéristiques moyennes d'un moût de raisin (Bely et al. 1990b). Ce milieu est caractérisé par une forte concentration en sucre : 180 g/L (glucose et fructose, 50/50 w/w), une teneur limitante en azote (250 mg/L d'azote assimilable), et un pH acide (pH = 3,3). On considère comme azote assimilable l'azote ammoniacal et l'azote des acides aminés, excepté la proline. Les Tableaux 8 à 11 présentent le détail des différentes solutions mères entrant dans la composition du moût synthétique.

Tableau 7. Composition d'un litre de moût synthétique.

Glucose	90 g
Fructose	90 g
Acide malique (DL)	6 g
Acide citrique	6 g
KH ₂ PO ₄	0,750 g
K ₂ SO ₄	0,5 g
MgSO ₂ , 7 H ₂ O	0,250 g
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	0,155 g
NaCl	0,200 g
NH ₄ Cl	0,27 g
Solution mère d'acides aminés (139.9 g/L)	7,70 mL
Solution mère d'oligo-éléments	1 mL
Solution mère de vitamines	10 mL
Solution mère de facteurs anaérobies	1 mL
H ₂ O distillée	qsp 1 L

Le pH est ajusté à 3,3 avec une solution de NaOH 10 M. Les moûts synthétiques sont stockés à -20°C.

Tableau 8. Solution mère d'acides aminés (pour 1 L).

Tyrosine	1,4 g
Tryptophane	13,7 g
Isoleucine	2,5 g
Acide aspartique	3,4 g
Acide glutamique	9,4 g
Arginine	28,6 g
Leucine	3,7 g
Thréonine	5,8 g
Glycine	1,4 g
Glutamine	38,6 g
Alanine	11,1 g
Valine	3,4 g
Méthionine	2,4 g
Phénylalanine	2,9 g
Sérine	6,0 g
Histidine	2,5 g
Lysine	1,3 g
Cystéine	1,0 g
Proline	46,8 g
H ₂ O distillée	qsp 1 L

Cette solution est aliquotée et stockée à -20 °C.

Tableau 9. Solution mère d'oligo-éléments (pour 1 L).

MnSO ₄ , H ₂ O	4 g
ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	4 g
CuSO ₄ , 5 H ₂ O	1 g
KI	1 g
CoCl ₂ , 6 H ₂ O	0,4 g
H ₃ BO ₃	1 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	1 g
H ₂ O distillée	qsp 1 L

Cette solution est stérilisée par filtration et stockée à 4°C.

Tableau 10. Solution mère de vitamines (pour 1 L).

Myo-inositol	2 g
Pantothénate de calcium	0,15g
Thiamine	0,025 g
Acide Nicotinique	0,2 g
Pyridoxine	0,025 g
Biotine (100 mg/L préparée extemporanément)	3 mL
H ₂ O distillée	qsp 1 L

Cette solution est aliquotée et stockée à -20°C.

Tableau 11. Solution mère de facteurs anaérobies (pour 100 mL).

Ergostérol	1,5 g
Acide oléique	0,5 mL
Tween 80	50 mL
Ethanol pur	qsp 100 mL

Cette solution est aliquotée et conservée à 4°C.

2.1.2.2. Moûts naturels

Différents moûts naturels, du sud de la France, ont été utilisés. Ces moûts sont obtenus à partir de baies de raisin pressées puis ils sont clarifiés, flash pasteurisés à 82°C pendant 30 secondes et stockés à 2°C dans une cuve sous atmosphère de gaz inerte (mélange CO₂-N₂). Leurs concentrations en sucre sont comprises entre 180 et 200 g/L et leurs concentrations en azote assimilable sont de 40, 120, 140 et 243 mg/L.

2.1.3. Cuves de fermentation

Les fermentations sur moûts naturels sont réalisées à l'échelle pilote dans des cuves de 100 L (**Figure 11**). Les fermentations sur moût synthétique ont été faites dans des cuves de 10 L.

Les cuves de 100 L sont en acier inoxydable ; leur diamètre est de 0,4 m et leur hauteur utile de 0,8 m. La platine amovible possède plusieurs piquages dont un pour le prélèvement et un pour la sortie du CO₂, ainsi que deux épingle de régulation de température et un doigt de gant permettant la mesure de la température au cœur de la cuve (Aguera et al. 2005). Il y a aussi un piquage central, utilisé pour le prélèvement de gaz pour le suivi en ligne des composés volatils (détaillé dans le paragraphe 2.2.1). Lors de la fermentation, les cuves contiennent 90 L de moût.

Les cuves de 10 L sont également en acier inoxydable et ont une platine comparable à celles des cuves de 100 L. De plus, ces cuves ont le même ratio hauteur/diamètre que les cuves de 100 L. En fermentation œnologique, elles contiennent 9 L de moût.

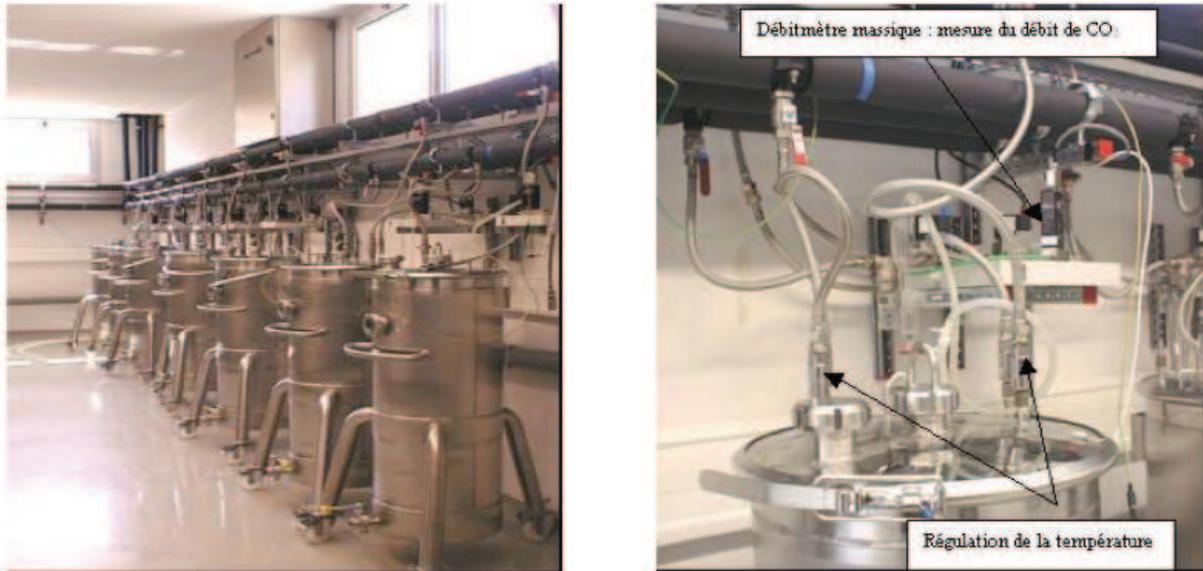


Figure 11. Photos des cuves de 100 L (gauche), avec un détail de la platine (droite).

Les deux types de cuves sont équipés d'un système de régulation de température précis à $0,1^{\circ}\text{C}$. Cette régulation est réalisée par circulation d'eau dans deux épingles (longueur de chaque épingle = 95cm, diamètre = 12 mm). Elle est effectuée par ouverture ou fermeture d'électrovannes placées respectivement sur un circuit d'eau chaude (température : 40°C) alimenté par une chaudière et un circuit relié à un groupe froid (température de l'eau entre 10 et 15°C suivant les régimes de température souhaités) (photo de droite de la **Figure 11**).

Le suivi de la fermentation est réalisé grâce à une mesure automatique du dégagement de CO_2 en continu à l'aide d'un débitmètre massique (Brooks TR). Ce suivi en ligne permet de calculer avec une grande précision la vitesse de production de CO_2 ($d\text{CO}_2/dt$). La production de CO_2 est directement corrélée à la consommation de sucre et à la production d'éthanol (El Haloui et al. 1988). L'intégration de la vitesse de production de CO_2 permet de calculer la quantité de CO_2 dégagé et, par conséquent, d'estimer la teneur résiduelle en sucre et la concentration en alcool.

Le système de contrôle des fermentations a été développé par l'INRA. Il est piloté par un logiciel écrit en langage Labview. Ce logiciel permet : (i) le suivi des fermentations : le débit de dégagement de CO_2 est mesuré chaque 20 secondes (fréquence réglable). Sa valeur est moyennée pendant la durée comprise entre deux stockages (généralement 20 minutes). La température est mesurée par une sonde PT100 avec une fréquence d'acquisition de 5 secondes, (ii) le stockage des paramètres : temps, vitesse instantanée de dégagement de CO_2 (g/L.h), CO_2 dégagé cumulé (g/L), température consigne

(°C), température mesurée (°C) et durée d'ouverture des électrovannes chaud et froid, (iii) la mise en œuvre de modes de contrôles spécifiques tels que ceux décrits en 2.1.4.2 et 2.1.4.3.

2.1.4. Conditions de fermentation

2.1.4.1. Fermentation isotherme

Durant toute la durée de la fermentation, la température est maintenue à une valeur constante (18, 20, 24 et 30°C).

2.1.4.2. Fermentation anisotherme

Au cours des fermentations anisothermes, la température est régulée en fonction de la production de CO₂ (qui est proportionnelle à la consommation de sucre) avec une pente de 0,2°C/(g/L) de CO₂ dégagé. Ce type d'évolution de la température simule des conditions anisothermes observées pour des cuves industrielles où la température augmente librement jusqu'à ce qu'elle atteigne la consigne finale (Sablayrolles & Barre 1993).

Deux fermentations anisothermes ont été effectuées. La première fermentation, entre 15 et 30°C, couvre la gamme maximale de température utilisée en œnologie. La seconde, entre 20 et 30°C, simule un profil de température communément utilisé lors de la fermentation des vins rouges.

2.1.4.3. Fermentation à vitesse constante

La vitesse de fermentation est maintenue constante par un ajout piloté d'une solution de phosphate diammonique (DAP) contenant 18 g/L d'azote assimilable. Cette addition, réalisée à l'aide d'une pompe péristaltique, a lieu lorsque la vitesse est inférieure à la valeur de consigne. La vitesse peut ainsi être régulée pendant la quasi-totalité de la fermentation : à partir de l'obtention de la vitesse maximale de production de CO₂, jusqu'à 90 % d'avancement de la fermentation (Manginot et al. 1997).

2.2. Suivi des composés volatils

2.2.1. Dosage des composés volatils dans la phase gazeuse

Le suivi des composés volatils au cours de la fermentation se fait par un système de CPG (chromatographie en phase gazeuse) en ligne. L'ensemble du dispositif expérimental permettant ce suivi en ligne est présenté en **Figure 12**.

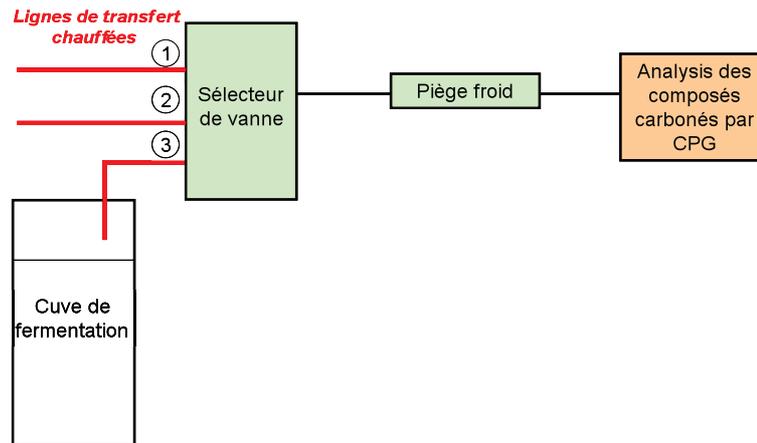


Figure 12. Système de CPG en ligne utilisé pour la mesure des composés volatils dans les gaz de sortie de fermentation (Mouret et al. 2010).

Le gaz présent dans l'espace de tête de la cuve de fermentation est pompé à un débit de 14 mL/min à travers une ligne chauffée pour éviter la condensation, et concentré sur un piège froid (Tenax TM) pendant 6 minutes, suivi d'une désorption à 160°C pendant 1 minute. Le gaz est ensuite injecté dans une colonne ZBWax (60 m * 0.32 * mm 0.5 µm, Phenomenex Inc.). La température de l'injecteur est fixée à 200°C. L'hélium est utilisé comme gaz vecteur à une pression constante de 120 kPa. Le programme de température du four est le suivant : palier à 38°C pendant 3 minutes, rampe à 3°C/min jusqu'à 65°C, rampe à 6°C/min jusqu'à 160°C, palier à 160°C pendant 5 minutes, rampe à 8°C/min jusqu'à 230°C et palier à 230°C pendant 5 minutes. Le détecteur utilisé est un détecteur à ionisation de flamme (FID) dont la température est fixée à 260°C.

L'étalonnage du système de CPG en ligne a été réalisé à l'aide du système Sonimix 6000C1 (LNI Schmidlin SA). Cet équipement permet de générer des gaz standard d'étalonnage soit en diluant des bouteilles de gaz étalon, soit en utilisant des tubes à perméation. Les bouteilles de gaz étalon (Air Product) utilisées contiennent respectivement 4004, 85,1 et 100 mmol/Kmol d'acétate d'éthyle, d'acétate d'isoamyle et d'isobutanol. L'étalonnage de l'hexanoate d'éthyle a été fait en utilisant un tube à perméation ayant un taux de perméation de 4831 ng/min à 45°C (LNI Schmidlin SA). Le tube à perméation a été placé dans un four à 45°C, balayé par un débit d'air de dilution égal à 51 mL/min.

2.2.2. Dosage des composés volatils dans la phase liquide (hors ligne)

Le dosage des composés volatils en phase liquide se fait par CPG hors ligne, par une méthode d'« headspace » statique. Avant l'analyse en CPG, une préparation de l'échantillon est effectuée. 1 g de NaCl est ajouté à 3 mL de l'échantillon liquide prélevé au cours de la fermentation dans un vial de 20 mL. Pour standardiser les conditions d'équilibre entre la phase liquide et l'espace de tête lors de l'analyse en CPG, la concentration en éthanol dans le vial est ajustée à 11% v/v par l'ajout de 2 mL

d'un mélange de 2 solutions d'acide tartrique à 12 g/L diluées dans l'eau ou dans un mélange éthanol/eau (30% v/v). 50 µL de 4-Methylpentan-2-ol à une concentration de 3 g/L sont ajoutés dans le vial en tant qu'étalon interne.

L'échantillon contenu dans le vial est ensuite chauffé et agité pendant 5 minutes à 50°C dans le four du passeur d'échantillon « headspace autosampler HT200 – HTA ». 1 mL de gaz contenu dans l'espace de tête du vial est prélevé à l'aide d'une seringue gaz, préchauffée à 60°C et injecté dans un chromatographe en phase gazeuse HP6890 couplée à un détecteur FID. La température de l'injecteur est fixée à 240°C. La colonne utilisée est une colonne BP20 (30 m * 0.53 mm * 1.0 µm, SGE). L'hydrogène est utilisé comme gaz vecteur à un débit constant de 4,8 mL/min. Le programme de température du four est le suivant : palier à 40°C pendant 3 minutes, rampe à 3°C/min jusqu'à 80°C, rampe à 15°C/min jusqu'à 160°C, palier à 160°C pendant 1 minute, rampe à 30°C/min jusqu'à 220°C et palier à 220°C pendant 2 minutes. La température du détecteur FID est fixée à 250°C. Les aires de pics ont été déterminées à l'aide du logiciel Agilent Chemstation.

L'étalonnage a été fait à l'aide de milieux synthétiques contenant des concentrations connues et croissantes en composés volatils. Les détails de la procédure d'étalonnage sont présentés ci-dessous.

Tout d'abord, des solutions stocks contenant les différents composés volatils sont préparées comme suit, dans des fioles jaugées :

- Solution d'alcools supérieurs, (pour 50 mL)
 - 35 mg de propanol
 - 50 mg d'isobutanol
 - 320 mg d'alcool isoamylique
 - 60 mg de phényl éthanol

dans l'éthanol 12%

- Solution d'esters d'éthyle (pour 50 mL)
 - 40 mg de butyrate d'éthyle
 - 40 mg d'hexanoate d'éthyle
 - 40 mg d'octanoate d'éthyle
 - 40 mg de décanoate d'éthyle
 - 40 mg de dodécanoate d'éthyle

dans l'éthanol absolu

- Solution d'esters d'acétate (pour 50 mL)
 - 2500 mg d'acétate d'éthyle
 - 40 mg d'acétate d'isobutyle
 - 220 mg d'acétate d'isoamyle
 - 40 mg d'acétate d'hexyle
 - 100 mg d'acétate de phényle éthyle

dans l'éthanol absolu

- Solution d'acétaldéhyde (pour 50 mL)
 - 65 mg d'acétaldéhyde **dans l'eau milliQ**

Remarques :

- *La solution d'acétaldéhyde est systématiquement préparée le jour de l'analyse.*
- *Les autres solutions stocks sont aliquotées et stockées au congélateur.*
- *Les pesées ci-dessus sont indicatives. Les quantités réellement pesées doivent être notées avec précision.*

A partir des solutions stocks précédentes la préparation de la gamme étalon suit les étapes suivantes.

Etape 1 : Préparation de la solution « mix »

Pour un volume final de 5 mL, ajouter :

- 2 mL de la solution d'alcools supérieurs
- 50 µL de la solution d'esters d'acétate (la quantité réellement ajoutée est pesée)
- 50 µL de la solution d'esters d'éthyle (la quantité réellement ajoutée est pesée)
- 750 µL de la solution d'acétaldéhyde
- 2,15 mL de tartrate/H₂O

Etape 2 : Préparation de la gamme étalon

Dans des flacons de 20 mL :

- Peser 1g (± 0,05) de NaCl
- Puis effectuer les opérations suivantes

niveau	Tartrate/éthanol 30% (mL)	Tartrate/H ₂ O (mL)	Solution mixte (µL)	Eau miliQ (µL)
1	1.87	2.13	50	950
2	1.87	2.13	100	900
3	1.87	2.13	200	800
4	1.87	2.13	300	700
5	1.87	2.13	400	600
6	1.87	2.13	500	500

- Ajouter enfin 50 µL d'étalon interne (4-Methylpentan-2-ol)
- Boucher et serrer immédiatement les flacons puis, agiter au vortex jusqu'à dissolution complète du NaCl
- Les vials sont ensuite analysés par CPG comme décrit ci dessus.

2.2.3. Détermination du ratio de concentration entre les phases gaz et liquide

Pour chaque composé volatil, le ratio gaz/liquide au cours de la fermentation est calculé en divisant la concentration en composés volatils dans l'espace de tête du fermenteur par la concentration dans la phase liquide. Ce ratio gaz/liquide sera ensuite comparé, à divers avancements de la fermentation, aux valeurs de k_i mesurées en conditions statiques par la méthode PRV.

2.3. Exploitations des données

2.3.1. Bilan gaz – liquide sur les composés volatils

2.3.1.1 Evolution des concentrations dans la phase liquide

Pour chaque composé volatil, les concentrations dans la phase liquide ont été déterminées soit par mesure expérimentale hors ligne (cf 2.2.2), soit par calcul, en utilisant le modèle détaillé dans le chapitre 2 (résultats et discussion). Ce modèle décrit l'évolution du ratio de concentration entre les phases gaz et liquide en fonction de l'éthanol produit et de la température de fermentation :

$$\ln k_i = F1 + F2 \times E - \frac{F3 + F4 \times E}{R} \left(\frac{1000}{T} - \frac{1000}{T_{ref}} \right) \quad \text{Equation 23}$$

où E est la concentration en éthanol en g/L, T représente la température absolue de fermentation, T_{ref} correspond à la température absolue de référence (293°K) et F1, F2, F3 et F4 sont des constantes dont la valeur est spécifique à chaque composé volatil. F1 est le logarithme du coefficient de partage ($\ln k_i$) à la température de référence dans le moût initial (E = 0). F2 représente la sensibilité du coefficient de partage à la composition du milieu de fermentation à la température de référence. F3 correspond à la valeur de ΔH_{vap} dans le moût initial (E = 0) ; ΔH_{vap} , enthalpie de vaporisation reflète la sensibilité du k_i aux changements de température. F4 représente la sensibilité de ΔH_{vap} aux changements de composition du milieu, décrite dans notre cas par la concentration en éthanol.

A partir du modèle précédent, il est possible de calculer à tout instant de la fermentation la concentration en volatil dans le liquide en utilisant l'équation suivante :

$$C^{liq}(t) = \frac{C^{gas}(t)}{k_i} \quad \text{Equation 24}$$

Où $C^{liq}(t)$ correspond à la concentration en composé volatil dans le liquide en mg/L de moût, $C^{gas}(t)$ est la concentration en composé volatil dans la phase gaz, exprimé en mg/L de gaz.

2.3.1.2 Etablissement des bilans gaz – liquide

Il est alors possible de faire un bilan gaz/liquide complet sur les composés volatils étudiés. Tout d’abord, nous pouvons calculer la quantité de composé volatil perdue dans le gaz au temps t , $L(t)$, en mg/L de moût :

$$L(t) = \int_0^t C^{gas}(t) \times Q(t) \times dt \quad \text{Equation 25}$$

Où $Q(t)$ correspond au débit de CO_2 au temps t , exprimé en litres de CO_2 par litre de moût et par heure.

Nous pouvons alors calculer la production totale de composé volatil au temps t , $P(t)$, en mg/L de moût ; elle est égale à la somme de la concentration dans le liquide ($C^{liq}(t)$) et de la quantité perdue dans la phase gaz ($L(t)$), comme indiqué dans l’équation suivante :

$$P(t) = C^{liq}(t) + L(t) \quad \text{Equation 26}$$

Le pourcentage de perte (RL), exprimé en % de la production totale ($P(t)$), est calculé comme suit :

$$RL = \frac{L(t)}{P(t)} = \frac{\int_0^{t_{end}} C^{gas}(t) \times Q(t) \times dt}{C^{liq}(t_{end}) + \int_0^{t_{end}} C^{gas}(t) \times Q(t) \times dt} \times 100 \quad \text{Equation 27}$$

2.3.2. Calculs cinétiques : vitesses de production, d’accumulation et de perte

La fréquence élevée d’échantillonnage de la CPG en ligne (jusqu’à une mesure par heure) nous permet de calculer les vitesses de production des composés volatils. Le calcul des vitesses d’accumulation dans le liquide et de perte dans le gaz est également effectué en utilisant le modèle précédemment décrit. Ces calculs de vitesse sont faits par lissage glissant polynomial de degré 2 avec une application Labview développée par l’INRA (Perez M., communication personnelle).

Résultats et discussion

Chapitre 1

Etude de l'évolution des coefficients de partage gaz – liquide de composés d'arôme dans des milieux représentant le déroulement d'une fermentation alcoolique en conditions œnologiques

Le premier axe de travail de la thèse concerne la mesure des coefficients de partage des composés volatils en conditions statiques par la méthode PRV (Phase Ratio Variation), dans des milieux représentant le déroulement d'une fermentation alcoolique en conditions œnologiques. Dans l'article qui suit, nous avons quantifié l'impact de trois paramètres principaux - la concentration en sucre, la concentration en l'éthanol et la température - sur le coefficient de partage gaz - liquide de l'acétate d'éthyle, l'acétate d'isoamyle, l'hexanoate d'éthyle, l'isobutanol et l'alcool isoamylique. L'effet du dégagement de CO₂ sur les coefficients de partage a été également étudié.

Après cet article, nous présenterons le résultat d'une étude complémentaire concernant la validité de l'hypothèse selon laquelle les composés d'arôme se trouvent infiniment dilués dans les milieux étudiés.

Comprehensive Study of the Evolution of Gas–Liquid Partitioning of Aroma Compounds during Wine Alcoholic Fermentation

SUMALLIKA MORAKUL,[†] VIOLAINE ATHES,[§] JEAN-ROCH MOURET,[†] AND
 JEAN-MARIE SABLAYROLLES^{*,†}

[†]INRA, UMR 1083, F-34060 Montpellier, France, and [§]AgroParisTech, INRA, UMR 782,
 Genie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, F-78850 Thiverval Grignon, France

Calculating the gas–liquid partitioning of aromatic molecules during winemaking fermentation is essential to minimize the loss of aroma and to optimize the fermentation conditions. In this study, the effect of the main fermentation parameters on the partition coefficients (k_i) of higher alcohols (2-methylpropan-1-ol and 3-methyl butan-1-ol) and esters (ethyl acetate, 3-methyl-1-butyl acetate, and 2-ethyl hexanoate) was assessed. The values of k_i were first determined in synthetic media simulating must and wine. They varied considerably with both the hydrophobicity of the compound and the composition of the medium. Then, the effect of temperature on k_i was quantified. The absence of any effect of gas composition was also established by replacing air with CO₂. Finally, the impact of CO₂ stripping was assessed by running specific fermentations in which the rate of CO₂ production was kept constant by perfusion with assimilable nitrogen. These fermentations showed that in contrast to temperature and must composition, CO₂ stripping did not change the gas–liquid partitioning of higher alcohols and esters.

KEYWORDS: Aroma compounds; wine fermentation; volatility; PRV; partition coefficient; gas–liquid transfer

INTRODUCTION

The production of higher alcohols and esters during fermentation can have a major effect on wine quality. Higher alcohols are undesirable at high concentrations, although in smaller quantities they are thought to contribute positively to the overall quality of wine. Esters are the most abundant aromatic compounds produced by wine yeasts and are the main contributors to the bouquet of young wines. 3-Methyl-1-butyl acetate, hexyl acetate, and 2-ethyl hexanoate are considered to be the main components of a “fruity” flavor (1–3).

The volatile concentrations at the end of fermentation depend primarily on their synthesis by the yeasts but may also be significantly changed by losses in the exhaust CO₂. Estimating the transfer of aromatic compounds from the liquid to the gas phase is essential to calculate mass balances and to improve the management of fermentation, in particular through control of temperature.

The distribution of volatile compounds between the liquid and gas phases depends on the vapor–liquid equilibrium (VLE), which is defined by the gas–liquid partition coefficient, k_i . This coefficient is expressed as the ratio between the concentration of the compound in the gas phase [C_i^{gas} in (mol or g) m⁻³] and that in the liquid phase [C_i^{liq} in (mol or g) m⁻³] at equilibrium. The VLE may also be quantified by calculating the partition coefficient

expressed as (i) a molar fraction, also known as absolute volatility (K_i), or (ii) the activity coefficient (γ_i), representing the deviation from ideality. These two coefficients are related by the equation

$$K_i = \frac{y_i}{x_i} = \frac{\gamma_i P_{i(T)}^0}{P_T}$$

where x_i and y_i are molar fractions in the liquid and gas phases, respectively, $P_{i(T)}^0$ is the vapor pressure of pure component i at a given temperature T (Pa), and P_T is the total pressure (Pa) (4, 5).

Several authors have studied the vapor–liquid equilibrium in hydroalcoholic solutions (6–8) and in sugar solutions (9, 10), but their results cannot be extrapolated to winemaking fermentations. In these studies, the effects of sugar and ethanol on the gas–liquid repartition were studied independently, whereas during alcoholic fermentations, concentrations change simultaneously. In the must, the sugar concentration is close to 250 g L⁻¹. Then, it progressively decreases to 0. In parallel, ethanol concentration increases from 0 to 14%. Furthermore, during winemaking fermentations, CO₂ is produced and may have a stripping effect, in addition to effects on the VLE. Robinson et al. recently analyzed the composition of wines in detail, to improve our understanding of the perception of aroma by studying aroma compound partitioning in the headspace (11). They focused on potential interactions between aroma compounds and some wine components, such as ethanol and sugar (the content of which may differ between wines), but they did not calculate gas–liquid partition coefficients (k_i). Fermenting musts were also not considered.

*Corresponding author (phone +33 4 99 61 25 00; fax +33 4 99 61 28 57; e-mail sablayro@supagro.inra.fr).

Table 1. Physical Properties of the Aroma Compounds Studied in This Work: Molecular Weight (MW), Boiling Point (T_b), Water Solubility at 25 °C (S), Log of the Octanol/Water Partition Coefficient at 25 °C (Log K_{ow}), and Vapor Pressure at 25 °C ($P_{k(T)}$)

family	CAS Registry No.	name	purity (%)	MW	T_b (°C) ^a	S (g L ⁻¹) ^b	log K_{ow} ^b	$P_{k(T)}^0$ (mmHg)
alcohols	78-83-1	2-methylpropan-1-ol	99.5	74.12	107.8	85	0.76	10.5
	123-51-3	3-methyl butan-1-ol	≥99	88.15	131.1	26.7	1.16	2.37
esters	141-78-6	ethyl acetate	99.8	88.11	77.1	80	0.73	93.2
	123-92-2	3-methyl-1-butyl acetate	≥99	130.19	142.5	2	2.025	5.6
	123-66-0	2-ethyl hexanoate	≥99	144.21	167	0.629	2.83	1.56

^a NIST web book (14) and SRC PhysProp database. ^b SRC PhysProp database (15).

In this study, the effects of the main fermentation parameters on the partition coefficients (k_i) of several higher alcohols (2-methylpropan-1-ol and 3-methylbutan-1-ol) and esters (ethyl acetate, 3-methyl-1-butyl acetate, and 2-ethyl hexanoate) were assessed. The values of k_i were first determined in synthetic media that simulated must and wine. The effect of temperature on k_i was then quantified, and the hypothetical effect of the gas composition was determined by replacing air with CO₂ in the gas phase. Finally, the effect of CO₂ stripping was studied. The stripping effect is complex because together with other factors, the rate of CO₂ production usually varies throughout the fermentation process. It increases during the growth phase and then steadily decreases during the stationary phase, mostly due to the inhibition of yeasts by ethanol (12). Using a previously described method (13), we overcame the problems associated with this complexity and isolated the effects of stripping by keeping the rate of CO₂ production constant through a controlled perfusion of ammoniacal nitrogen.

MATERIALS AND METHODS

Volatile Compounds. Ethyl acetate, 3-methyl-1-butyl acetate, 2-methylpropan-1-ol, and 3-methyl butan-1-ol were purchased from Merck (Darmstadt, Germany); 2-ethyl hexanoate was purchased from Aldrich (Steinheim, Germany). The main physicochemical properties of these products are summarized in Table 1. Solutions of aroma compounds were prepared from concentrated stock solutions in absolute ethanol (BDH, France) of 20000 ppm (v/v) for esters and 100000 ppm (v/v) for higher alcohols. These stock solutions were stored at -80 °C and used to prepare model solutions and to enrich the natural must (if necessary, for the phase ratio variation (PRV) method), to concentrations of 20 ppm (v/v) for esters and 100 ppm (v/v) for higher alcohols.

Media. *Model Solutions Simulating Must and Wine.* For the model solution simulating the must, the volatile compounds listed above and 220 g L⁻¹ glucose were added to a buffer solution containing 6 g L⁻¹ citric acid and 6 g L⁻¹ malic acid adjusted to pH 3.3 with sodium hydroxide. For the model solution simulating the wine, the buffer solution was supplemented with 13% (v/v) ethanol and the volatile compounds, without the addition of glucose.

Model Solutions Simulating Musts at Different Stages of Fermentation. Changes in k_i during fermentation were compared with those observed for the natural must described below, by supplementing the buffer solution containing volatile compounds described above with (1) 180 g L⁻¹ glucose, (2) 144 g L⁻¹ glucose and 2.2% (v/v) ethanol, (3) 107.5 g L⁻¹ glucose and 4.4% (v/v) ethanol, (4) 72.5 g L⁻¹ glucose and 6.5% (v/v) ethanol, or (5) 10.8% (v/v) ethanol. The resulting media correspond to 0, 20, 40, 60, and 100% progression of the fermentation.

Natural Must. A grape must from southern France was used. It was flash pasteurized and stored under sterile conditions (16). The sugar content was 180 g L⁻¹, assimilable nitrogen concentration, 40 mg L⁻¹, and pH, 3.52.

The samples from the fermenting were centrifuged at 8000g for 10 min before storage at cold temperature (-18 °C) and analysis.

Determinations of Gas-Liquid Partition Coefficients (Static Conditions). The gas-liquid partition coefficients of volatile compounds in model solutions and natural fermenting musts were determined by the PRV method, as previously described by Athes et al. (5).

Sample Preparation. Aliquots of 50 μL–2 mL of solution were introduced into four different headspace vials (22 mL, Chromacol, France), which were closed with Teflon/silicone septa in metallic caps, to give volume ratios (β) from 9.8 to 437; the vials were then equilibrated at the temperatures studied (15, 20, 25, and 30 °C) for at least 1 h (the time required to reach equilibrium in static conditions). The gas in the headspaces was then analyzed by gas chromatography.

Gas Chromatography. After equilibration, 1 mL of headspace gas was automatically withdrawn using a gastight syringe, preheated to a temperature of 15 °C above the studied temperature, in an automatic headspace sampler CombiPal (Shimadzu AOC-5000) and analyzed on a Hewlett-Packard gas chromatograph coupled to a HP 5973 mass spectrometer. The injection was direct, and the injector temperature was settled at 245 °C and injection rate at 100 μL s⁻¹. Only one headspace injection was made per vial, and three vials were analyzed for each solution. An Optima-Wax capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) from Macherey-Nagel was used with a carrier gas (helium) flow rate of 1 mL min⁻¹. The oven temperature program was set from 40 to 80 °C at 4 °C/min and from 80 to 200 °C at 8 °C/min. Peak areas were acquired with Hewlett-Packard Chemstation software.

Calculation of Partition Coefficients by the PRV Method. Partition coefficients were calculated from mass balance, as described by Etre et al. (17)

$$\frac{1}{A} = \frac{1}{f_i C_i^{\text{liq}}} \times \frac{1}{k_i} + \frac{1}{f_i C_i^{\text{liq}}} \times \beta \quad (1)$$

where A is the peak area obtained at equilibrium, f_i is a proportional factor, and β is the volume ratio, V_g/V_l , where V_g is the headspace volume and V_l is the liquid volume of the sample. Using the linear equation $1/A = \alpha\beta + b$, where

$$a = \frac{1}{f_i C_i^{\text{liq}}}$$

and

$$b = \frac{1}{f_i \times C_i^{\text{liq}}} \times \frac{1}{k_i}$$

and a/b is the gas-liquid partition coefficient expressed as the concentration ratio (k_i):

$$k_i = \frac{C_i^{\text{gas}}}{C_i^{\text{liq}}}$$

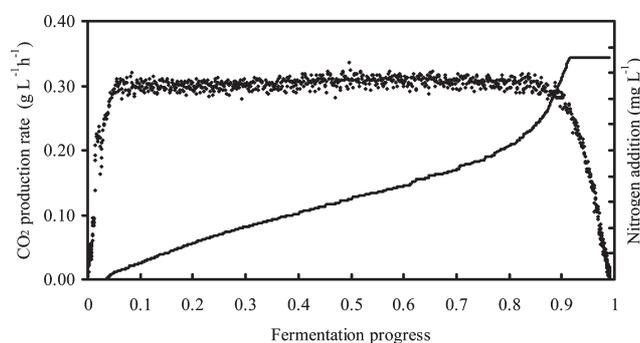
Effect of Carbon Dioxide. The effect of replacing air with carbon dioxide was investigated, using the model solution containing 220 g L⁻¹ glucose. CO₂ was bubbled through the solution at a rate of 100 mL min⁻¹ before adding the volatile compounds and adjusting the volume to reach the concentration indicated above. The model solution was dispensed into headspace vials that had previously been saturated with CO₂, and the partition coefficient was determined by the PRV method, as described above.

Changes in Gas-Liquid Concentration Ratio during Fermentation (Dynamic Conditions). *Fermentation Conditions and Control.* Yeast fermentations were carried out in stainless steel tanks, using the natural must. The tanks contained 90 L of must, and the headspace represented 30% of the total volume. The temperature was kept constant at 20 °C. The CO₂ released was automatically and continually measured

Table 2. Gas–Liquid Partition Coefficients ($\times 10^3$; Concentration Ratio) of Volatile Compounds in Acidic Aqueous Solution at pH 3.3 and 25 °C for Our Study and in Water for Literature and Estimated Data

compound	experimental values		estimated values ^a	
	this study	literature	bond contribution ^{b,c}	group contribution ^b
esters				
ethyl acetate	6.26 \pm 0.18	5.49 ^d 7.86 ^e 7.09 \pm 0.59 ^f	9.52	6.46
3-methyl-1-butyl acetate	21.8 \pm 1.06	24 ^b	22.3	21.9
2-ethyl hexanoate	34.2 \pm 4.03	29.2 ^e 43.0 \pm 2.8 ^f 34.0 \pm 2.4 ^g	29.6	25.7
alcohols				
2-methylpropan-1-ol	0.50 \pm 0.01	0.40 ^h	0.41	0.48
3-methylbutan-1-ol	0.56 \pm 0.03	0.58 ⁱ	0.54	0.68

^a Estimated partition coefficient values calculated from a bond contribution^b or a group contribution^c method (EPIWEB 4.0 software, developed by U.S. EPA Office of Pollution Prevention Toxics and Syracuse Research Corporation (SRC)). ^b Hine and Mookerjee (25). ^c Meylan and Howard (26). ^d Butler and Ramchandani (20). ^e Aprea, Biasioli, Märk, and Gasperi (19). ^f Landy, Druaux, and Voilley (23). ^g Landy, Courthaudon, Dubois, and Voilley (22). ^h Snider and Dawson (24). ⁱ Butler, Ramchandani, and Thompson (21).

**Figure 1.** Constant rate fermentation at 0.3 g L⁻¹ h⁻¹: evolution of the CO₂ production rate (◆) and added nitrogen (—).

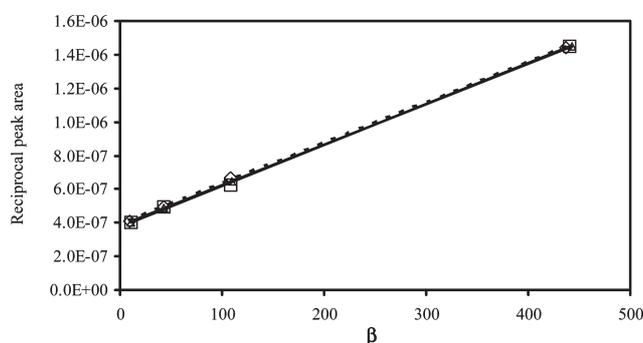
with a gas mass flow meter (16). The many acquisitions and the precision of the flow meter made it possible to calculate the rate of CO₂ production ($d\text{CO}_2 dt^{-1}$) with a high level of precision.

To control the stripping effect, constant rate fermentations were run. In these experiments, the rate of CO₂ production was kept constant by a feedback control mechanism involving the addition of ammoniacal nitrogen via a peristaltic pump (Ismatec Reglo) (13). By modifying the amount of assimilable nitrogen (no addition or addition of 80 mg/L of ammoniacal nitrogen) initially present in the must, that is, 40 mg/L, we set up two fermentations in which the rates of CO₂ production were kept constant at, respectively, 0.3 g L⁻¹ h⁻¹ (Figure 1) and 0.6 g L⁻¹ h⁻¹ (data not shown). The rates of CO₂ production were regulated between 10 and 85% progression of the fermentation reaction.

Gas Chromatography. The composition of the gas phase was analyzed with the online device described by Mouret et al. (18). The gas was pumped at a flow rate of 14 mL min⁻¹ from the tank headspace. Carbon volatile compounds were concentrated in a cold trap (Tenax) for 6 min (desorption at 160 °C for 1 min), injected into a column ZBWax (60 m \times 0.32 mm \times 0.5 μ m) from Phenomenex Inc. at a pressure of 120 kPa and with a temperature profile of 38 °C for 3 min, increasing by 3 °C min⁻¹ to 65 °C, and then by 6 °C min⁻¹ to 160 °C, with the temperature kept constant at 160 °C for 5 min and then increasing by 8 °C min⁻¹ to 230 °C, at which it was maintained for 5 min. Flame ionization detection (FID) was used.

The concentrations of the volatile compounds in the liquid phase were determined by the headspace method, using a GC with a temperature profile and a column similar to those used for online measurements. For standardization of the equilibrium conditions between the liquid and the headspace, the ethanol concentration in the sample was fixed at 11%.

Statistical Analysis. R version 2.8.1 (The R Foundation for Statistical Computing) was used for statistical analysis. A one-way analysis of variance was carried out. The Wilcoxon test was used to compare medians, to determine the differences between the gas–liquid partition coefficients of volatile compounds, to evaluate the effect of CO₂ in static conditions, in

**Figure 2.** Reciprocal of peak area versus volume ratio (β) for ethyl acetate in acidic (pH 3.3) aqueous solution at 25 °C: (□, △, ◇) triplicates.

particular, to compare the k_i measurements for model solutions and natural musts, and to assess the extent to which the model media were representative.

RESULTS AND DISCUSSION

Study of Gas–Liquid Partition Coefficients in Model Solutions.

Determination of Gas–Liquid Partition Coefficients. A representative plot of the reciprocal peak area of ethyl acetate versus volume is presented in Figure 2. The k_i value was obtained by using the PRV method (eq 1) and averaging the results of different series.

Partition coefficients and standard deviations are reported in Table 2. The results are consistent with published results (Table 2) (19–24) and estimates from the chemical structure of the compounds, based on bond contribution or group contribution methods (25, 26). It is notable that the presence of malic acid and citric acid and adjustment of the pH had no significant effect on the partitioning properties of the compounds, as shown by comparisons with published data obtained with pure water at 25 °C. Indeed, the volatile compounds used in this study were unlikely to be affected by the pH of the solution because they are not in a dissociated form, unlike volatile carboxylic acids. Small differences in reported values are nonetheless observed (Table 2), but may be attributed to differences in the measurement techniques used (5).

Within each chemical family, the gas–liquid partition coefficient increased with molecular weight. This finding is consistent with those of previous studies (23, 27–30). Indeed, within a group of chemicals, the molecules become more hydrophobic (the log K_{ow} increases) as molecular weight increases; this results in a

Table 3. Comparison of k_i Values in Model Solutions and Natural Musts at Different Fermentation Stages Using the Wilcoxon Range Sum Test^a

fermentation progress (%)	<i>p</i> values				
	ethyl acetate	3-methyl-1-butyl acetate	2-ethyl hexanoate	2-methylpropan-1-ol	3-methylbutan-1-ol
0	0.10	0.70	0.70	0.70	0.40
20	0.40	1.00	0.10	0.20	0.10
40	0.10	1.00	0.70	0.70	0.40
60	0.10	0.70	0.40	0.40	0.10
100	0.86	1.00	0.11	0.10	0.10

^a Differences are significant if the *p* value is <0.05.

Table 4. Gas–Liquid Partition Coefficient ($\times 10^3$; Concentration Ratio) Measured in Model Solution with either Glucose or Ethanol: Effect of Temperature

compound	model solution	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C
esters					
ethyl acetate	glucose 22%, ethanol 0%	5.66 ± 0.20	8.30 ± 0.58	10.13 ± 0.90	12.98 ± 0.90
	glucose 0%, ethanol 13%	3.85 ± 0.21	4.20 ± 0.55	5.79 ± 0.48	7.06 ± 0.89
3-methyl-1-butyl acetate	glucose 22%, ethanol 0%	18.44 ± 0.49	25.81 ± 2.31	29.11 ± 5.22	44.62 ± 7.91
	glucose 0%, ethanol 13%	8.88 ± 1.17	11.35 ± 1.02	13.17 ± 1.28	18.62 ± 4.25
2-ethyl hexanoate	glucose 22%, ethanol 0%	12.54 ± 1.85	43.92 ± 6.86	45.25 ± 13.4	85.79 ± 27.44
	glucose 0%, ethanol 13%	9.71 ± 1.26	14.14 ± 0.70	16.80 ± 2.05	26.18 ± 9.99
alcohols					
2-methylpropan-1-ol	glucose 22%, ethanol 0%	0.22 ± 0.03	0.45 ± 0.03	0.68 ± 0.11	0.99 ± 0.08
	glucose 0%, ethanol 13%	0.21 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.33 ± 0.06	0.43 ± 0.10
3-methylbutan-1-ol	glucose 22%, ethanol 0%	0.26 ± 0.05	0.60 ± 0.08	0.71 ± 0.11	1.17 ± 0.12
	glucose 0%, ethanol 13%	0.30 ± 0.05	0.33 ± 0.05	0.28 ± 0.06	0.38 ± 0.13

weakening of the interaction between the volatile molecule and water, leading to an increase in volatility from aqueous solution for the most hydrophobic molecules.

Difference in volatility may also be accounted for by differences in the vapor pressures of the pure compounds as illustrated by the comparison of ethyl acetate and 2-methylpropan-1-ol, which have very similar hydrophobicities.

Comparison of Partition Coefficients Measured in Natural Musts and Model Solutions. The representativeness of the gas–liquid partition coefficients measured in model solutions was assessed by preparing different solutions in which sugar and ethanol concentrations were changed simultaneously to mimic different stages of fermentation of the natural must used. Using the Wilcoxon range sum test to compare the k_i values, *p* values of >0.05 were obtained for all of the aroma compounds studied, indicating an absence of significant difference between the k_i values in model solutions and those in natural musts (**Table 3**). Thus, the model solution used in this experiment provided a satisfactory simulation of natural musts, at least for musts used in white winemaking, which contain only small amounts of polyphenolic compounds.

Effect of Glucose and Ethanol on Gas–Liquid Partition Coefficients. The effect of glucose and ethanol on the partition coefficients of the volatile compounds was measured in model solutions simulating the fermenting must at the beginning (22% (w/v) glucose and no ethanol) and end (no glucose and 13% (v/v) ethanol) of fermentation.

The partition coefficients of aroma compounds in both model solutions were different from those in aqueous solution (**Table 4**). The effects of the composition of the solution on the partitioning properties of volatile compounds were compared by calculating the release ratio, expressed as

$$\% k_{i\text{m/aq}} = \frac{k_i^{\text{m}} - k_i^{\text{aq}}}{k_i^{\text{aq}}} \times 100 \quad (2)$$

where k_i^{m} is the partition coefficient of the molecule in the model solution and k_i^{aq} is the partition coefficient of the molecule in aqueous solution. A positive value indicates that the solute

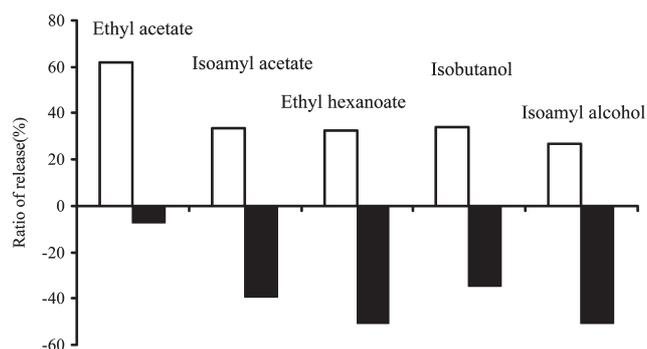


Figure 3. Ratio of release (% $k_{i\text{m/aq}} = (k_i^{\text{m}} - k_i^{\text{aq}})/k_i^{\text{aq}} \times 100$, where k_i^{m} is the partition coefficient of the molecule in model solution and k_i^{aq} is the partition coefficient of the molecule in aqueous solution) of aroma compounds in two model solutions with 22% (w/v) glucose, 0% (v/v) ethanol (open bars), and 0% (w/v) glucose, 13% (v/v) ethanol (solid bars).

enhances release, whereas a negative value is associated with retention.

The presence of glucose in the model solution raised the partition coefficient in all of the volatile compounds studied. In our conditions, simulating a grape must, the relative increase of k_i ranged between 26.6% for 3-methylbutan-1-ol and 61.8% for ethyl acetate (**Figure 3**). Thus, glucose decreases the solubility of volatile compounds in water (9, 31) and increases the partition coefficients of volatile compounds as observed with sucrose (32, 33). Lubbers and Guichard (32) determined the partition coefficients of 2-methylpropan-1-ol in a syrup consisting of a mixture of 54% w/w glucose and 21% w/w sucrose. This gave a partition coefficient that was 4.5 times higher than that in water.

The release of aroma compounds from glucose solution observed in this study resulted from a salting-out effect of glucose, which forms hydrogen bonds with water molecules, thereby decreasing the activity of the water, lowering the free water content and decreasing the solubility of aroma compounds (34).

Unlike glucose, the presence of ethanol in the solution tended to favor retention. The ratio of aroma compound release from

matrix/aqueous solutions of volatile compounds was negative (Figure 3). The presence of 13% ethanol (i.e., the average concentration in wines) decreased k_i values by up to 50% for 2-ethyl hexanoate and 3-methylbutan-1-ol. As previously described (6, 7, 35–38), ethanol increases the solubility of volatile compounds in the matrix, thereby decreasing their headspace concentration. Aznar et al. (35) also established a relationship between headspace volatile compound concentration and hydrophobicity ($\log K_{ow}$), by describing the decrease in headspace concentration with increases in the ethanol concentration of the solution from 4 to 42% (v/v). A correlation between the decrease in headspace volatile compound concentration and $\log K_{ow}$ values was observed for $\log P$ values below 3, as with the molecules we studied. Our results confirmed that, for the same chemical family, the k_i decrease was related to the hydrophobicity of the molecules as illustrated by the comparison between ethyl acetate (no effect of ethanol at the 95% confidence level) and 2-ethyl hexanoate.

On the other hand, ethanol had very different retention effects on 2-methylpropan-1-ol and ethyl acetate, despite the similarity of their $\log K_{ow}$ values, both around 0.7. This confirms that, in aqueous solution, the availability of OH groups on a volatile compound affects the release of that compound through hydrogen bonding with ethanol.

Effect of Temperature on Gas–Liquid Partition Coefficients. The effect of temperature on partition coefficients in the range of enological interest (i.e., between 15 and 30 °C) was studied in both model solutions containing either glucose or ethanol (Table 4). The Clausius–Clapeyron law was applied to partition coefficient (K_i) change with temperature (39)

$$-\frac{d \ln K_i}{d(1/T)} = \frac{\Delta H_{vap}}{R} \quad (3)$$

where ΔH_{vap} is the enthalpy of vaporization expressed in J mol^{-1} , R is the ideal gas constant ($8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T is the temperature in Kelvin, and K_i is the partition coefficient expressed as y_i/x_i . Values of $\ln K_i$ were plotted against the inverse of temperature (Figure 4; Van't Hoff representation). Relationships were linear (8, 30, 39–41), except for 3-methylbutan-1-ol in the model solution containing 13% ethanol, for which the r^2 was below 0.5 due to the slight variation of K_i as a function of ethanol content and temperature. Enthalpies of vaporization were calculated from these plots (Table 5). These values reflect the minimum energy required for a switch from the liquid to the vapor phase. The enthalpy of vaporization was between 30.1 for acetate esters and 71.4 kJ mol^{-1} for alcohols. The values obtained for ethyl acetate, 3-methyl-1-butyl acetate, 2-ethyl hexanoate, and 3-methylbutan-1-ol were consistent with published data (Table 5). The values obtained in water were intermediate between those measured in the presence of glucose and those measured in the presence of ethanol.

The enthalpies of vaporization of all of the volatile compounds in the model solution containing 22% (w/v) glucose were higher than in the presence of ethanol or in water. Presumably, the

physicochemical interactions between aroma compounds and glucose were stronger.

Effect of Carbon Dioxide on Gas–Liquid Partition Coefficients. To mimic the headspace composition during fermentation, the headspaces above model solutions containing 22% (w/v) glucose were saturated with carbon dioxide, and the partition coefficient of each volatile compound was measured at 30 °C. The Wilcoxon test was used to compare the results with control

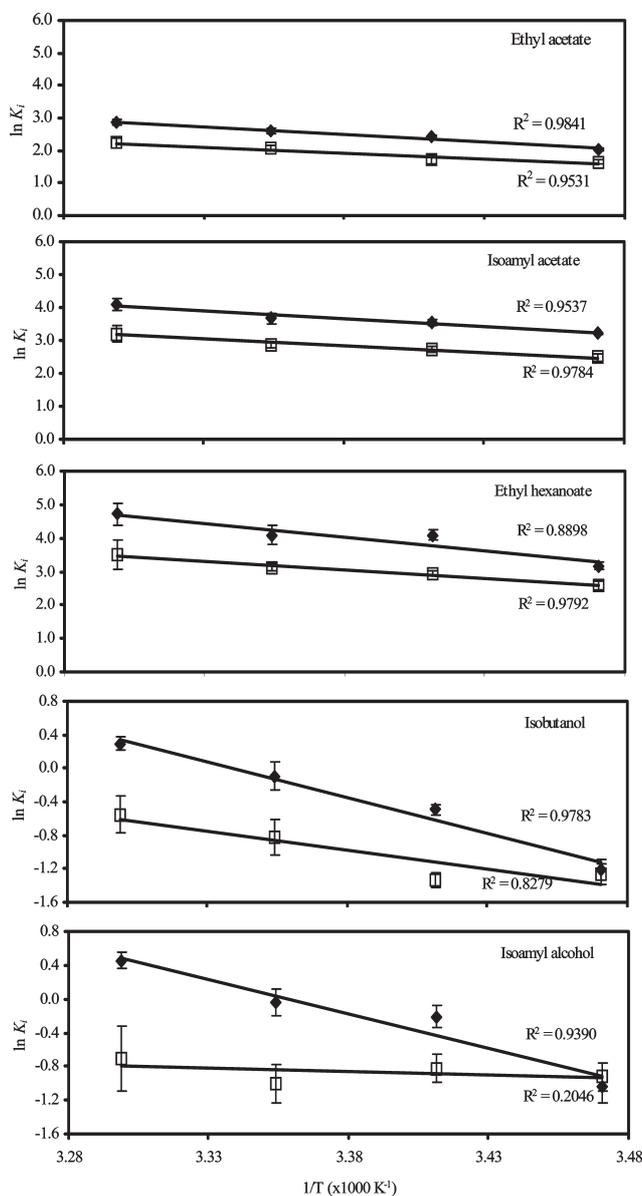


Figure 4. \ln of the partition coefficient (K_i ; expressed as y_i/x_i) as a function of $1000/T$ (K^{-1}), 22% (w/v) glucose, 0% (v/v) ethanol (\diamond), and 0% (w/v) glucose, 13% (v/v) ethanol (\square).

Table 5. Enthalpy of Vaporization of the Five Aroma Compounds in Model Solutions

ΔH_{vap} (kJ mol^{-1})	ethyl acetate	3-methyl-1-butyl acetate	2-ethyl hexanoate	2-methylpropan-1-ol	3-methylbutan-1-ol
glucose 22% (w/v) ethanol 0% (v/v)	39.0	39.4	67.5	71.4	67.6
glucose 0% (w/v) ethanol 13% (v/v), water	30.1	33.4	42.6	37.8	nd ^a
	35.7 ^b	35.7 ^c	45.5	50.8 ^b	
		46.3 ^b	51.7 ^b		

^a Not determined ($r^2 < 0.5$). ^b Plyasunov, Plyasunova, and Shock (42). ^c Meynier et al. (39).

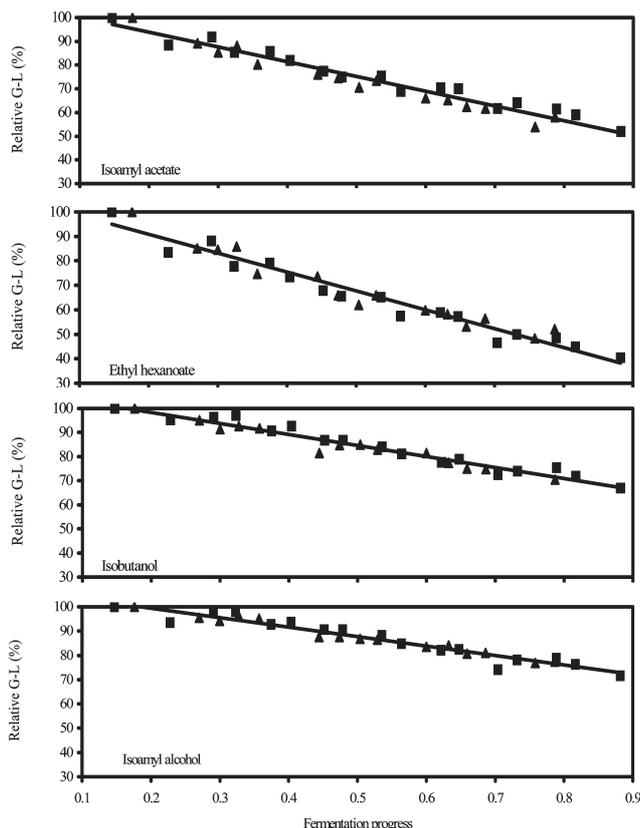


Figure 5. Evolution of the gas–liquid ratio during fermentations at constant CO_2 production rate $0.3 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (■) and $0.6 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (▲). At each stage of fermentation the gas–liquid ratio is normalized by the ratio at 20% of fermentation progress (considered as the 100% reference).

values. The p values obtained were > 0.05 (ethyl acetate, 0.31; 3-methyl-1-butyl acetate, 0.48; 2-ethyl hexanoate, 0.13; 3-methylbutan-1-ol, 0.24). Thus, there was no significant difference between the mean partition coefficients with and without CO_2 saturation, at a confidence level of 95%, for the volatile compounds studied.

Changes in the Gas–Liquid Ratio of Aroma Compound Concentration during Alcoholic Fermentation (Dynamic Conditions). After determining the effects of medium composition and temperature in model conditions, the impact of CO_2 stripping was assessed in real fermentations to avoid possible artifacts due to the use of spargers (size of the bubbles). Another interest was the possibility to run fermentations (i) at a constant rate by perfusing ammoniacal nitrogen and (ii) with different rates by changing the initial amounts of assimilable nitrogen, to study the effect of stripping independently.

Changes in the relative gas–liquid ratio of aromatic compound concentrations during the regulated-rate phase were plotted versus the fermentation progress (Figure 5). This relative ratio remained almost constant for ethyl acetate and decreased linearly, by 28% for 3-methylbutan-1-ol, by 35% for 2-methylpropan-1-ol, by 50% for 3-methyl-1-butyl acetate, and by 65% for 2-ethyl hexanoate. A very remarkable result is that identical decreases were observed for CO_2 production rates of 0.3 and $0.6 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ for all of the compounds studied. It can therefore be deduced that stripping did not change the gas–liquid partitioning of aroma compounds during fermentation and that the two phases remain in equilibrium throughout the process. The stripping of aromas from the fermenting must depend on both vapor–liquid equilibrium and mass transfer rates. Our results show that mass

transfer rates were very fast; hence, the stripping rate of aromas from the fermenting must depend only on the VLE. This result is remarkable and could be hardly anticipated. Indeed, with respect to other studies (43, 44), we expected that esters and higher alcohols would be “blown off” by CO_2 . However, Ferreira et al. (43) and Aguera et al. (44) used higher CO_2 flow rates, beyond the natural rates of production by yeasts, which certainly explained the observed differences with our work.

It was also observed that the decrease in this ratio during fermentation was (i) larger for esters than for the less volatile higher alcohols and (ii) for all the compounds considered, consistent with the decrease in partition coefficient (k_i) observed in static conditions. Therefore, at constant temperature, changes in the gas–liquid partitioning of aroma compounds in fermenting must result mostly from changes in the composition of the liquid phase (increase of ethanol concentration, decrease of sugar concentration).

The fact that the CO_2 production does not affect gas–liquid aroma partitioning requires confirmation, in different winemaking situations, with higher CO_2 production rates, but it is nonetheless of prime importance, particularly for developing models that describe the relationship between the liquid and gas phase concentrations of volatile compounds. Once measurements in the gas phase have been calibrated and such models have been developed, online measurement devices should make it possible to precisely describe changes in the concentrations of the main esters and higher alcohols in both the gas and liquid phases.

An online monitoring device for higher alcohols and esters in exhaust CO_2 has already been described by Mouret et al. (17), and its use for improving the understanding of yeast metabolism has already been demonstrated. Coupling such a device with online monitoring of the CO_2 production rate (reviewed in ref 45) will allow the dynamics of loss and production of aroma compounds to be estimated during fermentation. From a microbiological point of view, this will provide a useful means of calculating metabolic fluxes on the basis of the total production of volatile molecules (i.e., the concentration remaining in the fermenting must plus the losses in the exhaust CO_2). This technique will also be useful to help design innovative strategies to optimize aroma production and loss through controlling temperature and nutrient supplementation.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Magaly Angenieux, Evelyne Aquera, Pamela Nicolle, Marc Perez, Peggy Rigou, and Isabelle Sanchez for their help and technical assistance.

LITERATURE CITED

- (1) Francis, I. L.; Newton, J. L. Determining wine aroma from compositional data. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2005**, *11*, 114–126.
- (2) Sumbly, K. M.; Grbin, P. R.; Jiranek, V. Microbial modulation of aromatic esters in wine: current knowledge and future prospects. *Food Chem.* **2010**, *121*, 1–16.
- (3) Swiegers, J. H.; Bartowsky, E. J.; Henschke, P. A.; Pretorius, I. S. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2005**, *11*, 139–173.
- (4) Pozo-Bayon, M. A.; Reineccius, G. Interaction between wine matrix macro-components and aroma compounds. In *Wine Chemistry and Biochemistry*; Victoria Moreno-Arribas, M., Carman Polo, M., Eds.; Springer Science+Business Media: New York, 2009.
- (5) Athès, V.; Pena y Lillo, M.; Bernard, C.; Perez-Correa, R.; Souchon, I. Comparison of experimental methods for measuring infinite dilution volatilities of aroma compounds in water/ethanol mixtures. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 2021–2027.
- (6) Athès, V.; Paricaud, P.; Ellaite, M.; Souchon, I.; Fürst, W. Vapour–liquid equilibria of aroma compounds in hydroalcoholic solutions:

- Measurements with a recirculation method and modelling with the NRTL and COSMO-SAC approaches. *Fluid Phase Equilib.* **2008**, *265*, 139–154.
- (7) Conner, J. M.; Birkmyre, L.; Paterson, A.; Piggott, J. R. Headspace concentrations of ethyl esters at different alcoholic strengths. *J. Sci. Food Agric.* **1998**, *77*, 121–126.
- (8) Tsachaki, M.; Gady, A.-L.; Kalopesas, M.; Linforth, R. S. T.; Athès, V.; Marin, M.; Taylor, A. J. Effect of ethanol, temperature, and gas flow rate on volatile release from aqueous solutions under dynamic headspace dilution conditions. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 5308–5315.
- (9) Covarrubias-Cervantes, M.; Bongard, S.; Champion, D.; Voilley, A. Effects of the nature and concentration of substrates in aqueous solutions on the solubility of aroma compounds. *Flavour Fragrance J.* **2005**, *20*, 265–273.
- (10) Nahon, D. F.; Koren, P. A. N. Y.; Roozen, J. P.; Posthumus, M. A. Flavor release from mixtures of sodium cyclamate, sucrose, and an orange aroma. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 4963–4968.
- (11) Robinson, A. L.; Ebeler, S. E.; Heymann, H.; Boss, P. K.; Solomon, P. S.; Trengove, R. D. Interactions between wine volatile compounds and grape and wine matrix components influence aroma compound headspace partitioning. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 10313–10322.
- (12) Ansanay-Galeote, V.; Blondin, B.; Dequin, S.; Sablayrolles, J.-M. Stress effect of ethanol on fermentation kinetics by stationary-phase cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **2001**, *23*, 677–681.
- (13) Manginot, C.; Sablayrolles, J. M.; Roustan, J. L.; Barre, P. Use of constant rate alcoholic fermentations to compare the effectiveness of different nitrogen sources added during the stationary phase. *Enzyme Microb. Technol.* **1997**, *20*, 373–380.
- (14) NIST, Chemistry web book. <http://webbook.nist.gov/chemistry/>, 2005.
- (15) SRC. Interactive PhysProp Database Demo, Syracuse Research Corp., Environmental Science Center Syracuse, NY, www.syrres.com/esc/physdemo.htm.
- (16) Aguera, E.; Perez, P.; Picou, C.; Sablayrolles, J. M. Pilot-scale vinifications (100 L). The controlled fermentations facility at the INRA in Pech Rouge. *Wine Internet J.* **2005**, No. 4 (www.vinidea.net).
- (17) Ettre, L.; Welter, C.; Kolb, B. Determination of gas–liquid partition coefficients by automatic equilibrium headspace–gas chromatography utilizing the phase ratio variation method. *Chromatographia* **1993**, *35*, 73–84.
- (18) Mouret, J. R.; Nicolle, P.; Angenieux, M.; Aguera, E.; Perez, M.; Sablayrolles, J. M. On-line measurement of ‘quality markers’ during winemaking fermentations. International Intervitis Interfructa Congress, March 24–26, 2010, Stuttgart, Germany.
- (19) Aprea, E.; Biasioli, F.; Märk, T. D.; Gasperi, F. PTR-MS study of esters in water and water/ethanol solutions: fragmentation patterns and partition coefficients. *Int. J. Mass Spectrom.* **2007**, *262*, 114–121.
- (20) Butler, J. A. V.; Ramchandani, C. N. The solubility of non-electrolytes. Part II. The influence of the polar group on the free energy of hydration of aliphatic compounds. *J. Chem. Soc.* **1935**, 952–955.
- (21) Butler, J. A. V.; Ramchandani, C. N.; Thompson, D. W. The solubility of non-electrolytes. Part I. The free energy of hydration of some aliphatic alcohols. *J. Chem. Soc.* **1935**, 280–285.
- (22) Landy, P.; Courthaudon, J.-L.; Dubois, C.; Voilley, A. Effect of interface in model food emulsions on the volatility of aroma compounds. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 526–530.
- (23) Landy, P.; Druaux, C.; Voilley, A. Retention of aroma compounds by proteins in aqueous solution. *Food Chem.* **1995**, *54*, 387–392.
- (24) Snider, J. R.; Dawson, G. A. Tropospheric light alcohols, carbonyls, and acetonitrile: concentrations in the southwestern United States and Henry’s law data. *J. Geophys. Res.* **1985**, *90*, 3797–3805.
- (25) Hine, J.; Mookerjee, P. K. Structural effects on rates and equilibria. XIX. Intrinsic hydrophilic character of organic compounds. Correlations in terms of structural contributions. *J. Org. Chem.* **1975**, *40* (3), 292–298.
- (26) Meylan, W. M.; Howard, P. H. Bond contribution method for estimating Henry’s law constants. *Environ. Toxicol. Chem.* **1991**, *10*, 1283–1293.
- (27) Philippe, E.; Seuvre, A.-M.; Colas, B.; Langendorff, V.; Schippa, C.; Voilley, A. Behavior of flavor compounds in model food systems: a thermodynamic study. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 1393–1398.
- (28) Savary, G.; Doublier, J.-L.; Cayot, N. Phase ratio variation method as an efficient way to determine the partition coefficients of various aroma compounds in mixture. *Dev. Food Sci.* **2006**, *43*, 461–464.
- (29) Seuvre, A.-M.; Philippe, E.; Rochard, S.; Voilley, A. Kinetic study of the release of aroma compounds in different model food systems. *Food Res. Int.* **2007**, *40*, 480–492.
- (30) Seuvre, A. M.; Turci, C.; Voilley, A. Effect of the temperature on the release of aroma compounds and on the rheological behaviour of model dairy custard. *Food Chem.* **2008**, *108*, 1176–1182.
- (31) Nawar, W. W. Variables affecting composition of headspace aroma. *J. Agric. Food Chem.* **1971**, *19*, 1057–1059.
- (32) Lubbers, S.; Guichard, E. The effects of sugars and pectin on flavour release from a fruit pastille model system. *Food Chem.* **2003**, *81*, 269–273.
- (33) Nahon, D. F.; Harrison, M.; Roozen, J. P. Modeling flavor release from aqueous sucrose solutions, using mass transfer and partition coefficients. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1278–1284.
- (34) Nahon, D. F.; Koren, P. A. N. Y.; Roozen, J. P.; Posthumus, M. A. Flavor release from mixtures of sodium cyclamate, sucrose, and an orange aroma. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 4963–4968.
- (35) Aznar, M.; Tsachaki, M.; Linforth, R. S. T.; Ferreira, V.; Taylor, A. J. Headspace analysis of volatile organic compounds from ethanolic systems by direct APCI-MS. *Int. J. Mass Spectrom.* **2004**, *239*, 17–25.
- (36) Conner, J. M.; Paterson, A.; Piggott, J. R. Interactions between ethyl esters and aroma compounds in model spirit solutions. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 2231–2234.
- (37) Escalona, H.; Piggott, J. R.; Conner, J. M.; Paterson, A. Effect of ethanol strength on the volatility of higher alcohols and aldehydes. *Ital. J. Food Sci.* **1999**, *11*, 241–248.
- (38) Tsachaki, M.; Linforth, R. S. T.; Taylor, A. J. Dynamic headspace analysis of the release of volatile organic compounds from ethanolic systems by direct APCI-MS. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 8328–8333.
- (39) Meynier, A.; Garillon, A.; Lethuaut, L.; Genot, C. Partition of five aroma compounds between air and skim milk, anhydrous milk fat or full-fat cream. *Lait* **2003**, *83*, 223–235.
- (40) Savary, G.; Guichard, E.; Doublier, J.-L.; Cayot, N. Mixture of aroma compounds: Determination of partition coefficients in complex semi-solid matrices. *Food Res. Int.* **2006**, *39*, 372–379.
- (41) Jouquand, C.; Ducruet, V.; Giampaoli, P. Partition coefficients of aroma compounds in polysaccharide solutions by the phase ratio variation method. *Food Chem.* **2004**, *85*, 467–474.
- (42) Plyasunov, A. V.; Plyasunova, N. V.; Shock, E. L. Group contribution values for the thermodynamic functions of hydration of aliphatic esters at 298.15 K, 0.1 MPa. *J. Chem. Eng. Data* **2004**, *49*, 1152–1167.
- (43) Ferreira, V.; Pena, C.; Escudero, A.; Cacho, J. Losses of volatile compounds during fermentation. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* **1996**, *202*, 318–323.
- (44) Aguera, E.; Bes, M.; Roy, A.; Camarasa, C.; Sablayrolles, J.-M. Partial removal of ethanol during fermentation to obtain reduced-alcohol wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **2010**, *61*, 53–60.
- (45) Sablayrolles, J. M. Control of alcoholic fermentation in winemaking: current situation and prospect. *Food Res. Int.* **2009**, *42*, 418–424.

Vérification de la validité de l'hypothèse « solutions infiniment diluées » en composés d'arôme

Nous souhaitons vérifier que, dans nos conditions, la concentration choisie pour les études en statique pouvait être représentative d'une gamme plus large de variation de concentration et que nous étions bien à dilution infinie. L'étude concernant la validité de cette hypothèse est détaillée ci-après pour l'acétate d'éthyle.

Pour vérifier que la valeur de k_i de l'acétate d'éthyle est bien indépendante de la concentration dans l'intervalle de 10 à 50 ppm, nous avons mesuré les k_i dans la solution tampon (décrite dans la partie 1.2.1. du matériels et méthodes) par la méthode PRV, à 25°C. Nous observons sur la **Figure 13** que, quelle que soit la concentration en acétate d'éthyle, les valeurs de k_i mesurées sont très proches ; les différences sont comprises dans l'erreur de mesure et ne sont donc pas significatives.

Ces résultats montrent que, dans la gamme de concentrations étudiées, l'acétate d'éthyle peut bien être considéré comme infiniment dilué dans les conditions étudiées.

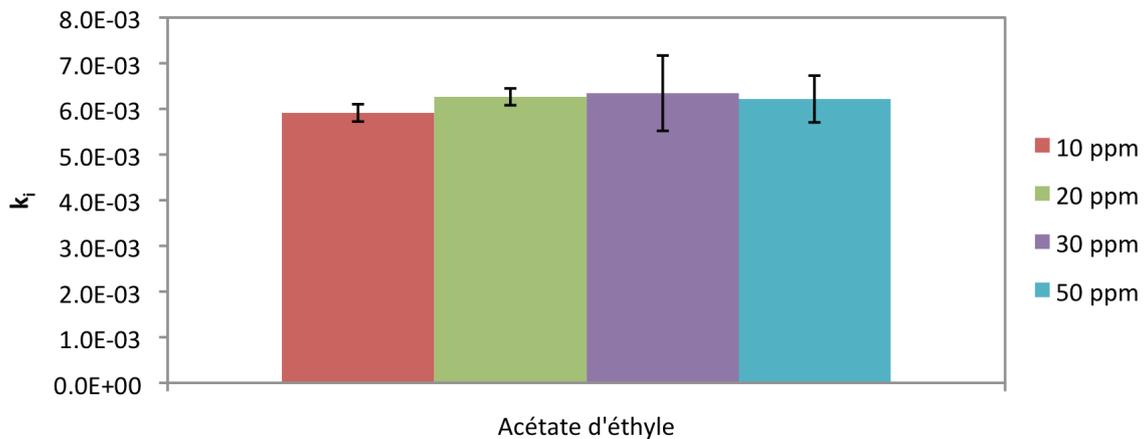


Figure 13. Coefficients de partage de l'acétate d'éthyle pour des concentrations comprises entre 10 et 50 ppm dans la solution tampon à 25°C.

Une étude similaire a été conduite pour les autres composés volatils. Les résultats obtenus montrent que les valeurs de k_i mesurées sont indépendantes de la concentration en composé d'arôme entre 10 et 50 ppm pour l'acétate d'isoamyle et l'hexanoate d'éthyle, et entre 50 et 250 ppm pour l'isobutanol et l'alcool isoamylique.

L'hypothèse selon laquelle les composés peuvent être considérés en 'solutions infiniment diluées' est donc vérifiée.

Chapitre 2

Modélisation de la répartition des composés d'arôme entre les phases gaz et liquide en cours de fermentation alcoolique. Prédiction des pertes aromatiques

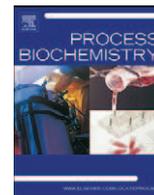
Après avoir évalué les effets du sucre, de l'éthanol et de la température sur la volatilité des molécules d'arôme en condition statique, nous allons nous intéresser dans cette partie au comportement de ces mêmes molécules d'arôme pendant la fermentation alcoolique, donc en conditions dynamiques.

Dans l'article suivant, nous avons tout d'abord confirmé que le dégagement de CO_2 n'avait pas d'influence sur le rapport de concentrations entre phase gaz et liquide relativement à la valeur d'équilibre k_i . Nous avons ensuite élaboré un modèle, basé sur l'effet de la température et des concentrations en sucre et en éthanol, permettant de calculer k_i quel que soit le stade de la fermentation et le profil de température. Enfin, nous avons utilisé ce modèle pour réaliser des bilans de production (production totale, accumulation, pertes) des composés volatils et estimer ainsi l'importance des pertes en conditions habituelles de fermentation.



Contents lists available at ScienceDirect

Process Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/procbio

Modelling of the gas–liquid partitioning of aroma compounds during wine alcoholic fermentation and prediction of aroma losses

Sumallika Morakul^a, Jean-Roch Mouret^a, Pamela Nicolle^b, Ioan Cristian Trelea^c,
Jean-Marie Sablayrolles^a, Violaine Athes^{c,*}

^a INRA, UMR 1083, 2 Place Viala, F-34060 Montpellier Cedex 1, France

^b INRA, UE 999, F-11430 Gruissan, France

^c AgroParisTech, INRA, UMR 782, F-78850 Thiverval-Grignon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 December 2010

Received in revised form 14 January 2011

Accepted 26 January 2011

Keywords:

Gas–liquid transfer

Online GC measurement

Wine

Aroma

Dynamic modelling

ABSTRACT

A model was elaborated to quantify the gas–liquid partitioning of four of the most important volatile compounds produced during winemaking fermentations, namely isobutanol, ethyl acetate, isoamyl acetate and ethyl hexanoate. Analyses of constant rate fermentations demonstrated that the partitioning was not influenced by the CO₂ production rate and was a function of only the must composition and the temperature. The parameters of the model were identified in fermentations run at different temperatures, including anisothermal conditions. The prediction of the partition coefficient (k_i) by the model was very accurate for isobutanol, isoamyl acetate and ethyl hexanoate. The technological potential of the model was confirmed by using it to calculate the losses of volatiles in the gas phase during fermentation and comparing them with experimental data. Up to 70% of the produced volatile compounds were lost. The difference between observed losses and losses estimated from predicted k_i values never exceeded 3%.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The synthesis of higher alcohols and esters during fermentation makes an important contribution to wine quality and the control of the production of these volatile compounds is one of the major ways to control the organoleptic characteristics of wine. The higher alcohols are undesirable at high concentrations, but in smaller quantities they are thought to contribute positively to overall wine quality. Esters have a significant effect on the fruity flavour in wine. The esters making the largest olfactory impact are ethyl acetate, isoamyl acetate, isobutyl acetate, ethyl hexanoate and 2-phenylethyl acetate [1]. Varietal aromas – volatile compounds derived from non-volatile precursors in the grape which are released by the yeast during fermentation, such as thiols – also play an essential role in wine aroma but they are usually present at very low concentrations and are therefore more difficult to quantify.

The concentrations of volatiles at the end of fermentation depend primarily on their synthesis by the yeasts but may also be significantly modified by losses into the exhausted CO₂. Therefore, understanding and modelling the transfer of aroma compounds between the gas and liquid phases would be extremely useful, and the calculation of balances differentiating the microbiological pro-

cess of production and the physicochemical process of transfer into the exhausted CO₂ is central to this issue. The online monitoring of volatile compounds in the tank headspace, as recently proposed by Mouret et al. [2], allows online estimation of volatile concentrations in fermenting musts, provided that reliable models for gas–liquid partitioning are available for all phases of the fermentation process. Finally, such models could subsequently be coupled to predictive models of volatile compound synthesis, based on knowledge of the biochemical pathways involved. Indeed, some authors have already proposed such models in beer making conditions [3–5].

Several models have been developed to quantify the transfer of volatile molecules between aqueous solutions and gas phases [6–8]. However, none of them is directly applicable to winemaking conditions. Indeed, unlike the conditions considered in these established models, the concentrations of volatile molecules, as well as the overall composition of the fermenting must, are continuously changing during alcoholic fermentations. Another difference is the production and release of CO₂, bubbles of which increase the transfer from the liquid to the gas, by stripping. Finally, only 3 molecules (isobutyl acetate, acetaldehyde and ethyl acetate) out of 21 were of interest in wine fermentations.

Several authors have studied flavour release in the context of oenology but mostly focused on the partitioning properties of volatiles in final wines [9–11] and did not consider their behaviour during fermentation. Recently, Morakul et al. [12] evaluated the effect of the matrix changes (mainly corresponding to the con-

* Corresponding author. Tel.: +33 1 30 81 53 83; fax: +33 1 30 81 55 97.

E-mail addresses: vathes@grignon.inra.fr, morakul@supagro.inra.fr (V. Athes).

sumption of sugar and the production of ethanol) and of the temperature on gas–liquid partitioning in model conditions simulating fermenting musts. Ferreira et al. [13] assessed volatile compound losses due to the CO₂ production and showed that up to 80% of some molecules could be blown off; however, the experimental conditions used in [13] were not completely representative of the fermentation conditions, because changes in the matrix composition were not considered and the stripping rate was much higher than usually observed in winemaking.

In this paper, the objective was to develop a model of the evolution of the partition coefficient between the gas and liquid phases of four major volatile molecules (ethyl acetate, isoamyl acetate, ethyl hexanoate and isobutanol) in winemaking fermentations. The partition coefficient k_i is expressed as the ratio between the mass concentration of the compound in the gas phase [C_i^{gas} in mg/L] and that in the liquid phase [C_i^{liq} in mg/L] at equilibrium.

The work was focused on these four molecules because they are representative of higher alcohol and ester families. Isobutanol is one of the major fusel alcohols whose concentrations in wines are several tens of mg/L. It is synthesized by the yeasts from amino acids, in particular valine, and from keto-acids. As most higher alcohols are weakly volatile, its partition coefficient (k_i), expressed as a mass concentration ratio, at 25 °C in grape musts is around 6.8×10^{-4} [12]. Despite its high concentration in the liquid phase, it is often below its perception threshold in gas [1]. Ethyl acetate, isoamyl acetate, and ethyl hexanoate are well known for their contribution to the fruity aroma of wines [14]. Their concentrations in wines are usually low (20–60 mg/L for ethyl acetate and less than 10 mg/L for isoamyl acetate and ethyl hexanoate) but nevertheless always above their perception thresholds [1]. The k_i values at 25 °C in grape musts are around 1.0×10^{-2} for ethyl acetate, 2.9×10^{-2} for isoamyl acetate and 4.5×10^{-2} for ethyl hexanoate [12].

After assessing the effects of the main factors involved, and in particular the impact of stripping by CO₂, the model for the prediction of the partition coefficient (k_i) was developed and then validated in different winemaking situations. The model was then used to estimate the losses of volatile compounds in several wine-making situations.

2. Materials and methods

2.1. Fermentations

2.1.1. Yeast strains

The *Saccharomyces cerevisiae* strains EC1118 and K1 were used. These commercial wine yeasts are produced as active dry yeast by Lallemand SA. Each fermentation tank was inoculated with 0.2 g/L of active dry yeast previously rehydrated for 30 min at 35 °C.

2.1.2. Musts

Various grape musts from the South of France were used. They were flash-pasteurised and stored under sterile conditions. Their sugar concentrations were between 180 and 200 g/L and their assimilable nitrogen concentrations were 40, 120, 140 and 240 mg/L.

2.1.3. Tanks

Fermentations were run at pilot scale in stainless steel tanks. The tanks contained 90 L of must and the headspace represented 30% of the total volume.

2.1.4. Control of fermentation

The CO₂ released was automatically and continually measured with a gas mass flow meter and the rate of CO₂ production (dCO_2/dt) was calculated with a high level of precision. The fermentations were controlled in different ways:

- (i) Constant rate fermentations (CRF): to control the stripping effect, constant rate fermentations were run at 20 °C. In these experiments, the rate of CO₂ production was kept constant by a feedback control system involving the addition of ammoniacal nitrogen via a peristaltic pump (Ismatec Reglo) [15].
- (ii) Isothermal fermentations (IF): the temperature was maintained at a constant value (20 and 30 °C), with a precision of 0.1 °C.

- (iii) Anisothermal fermentations (AF): the temperature was regulated according to the CO₂ production, which is proportional to the sugar degradation, with a slope of 0.2 °C/(g/L) of evolved CO₂. This evolution of temperature simulated anisothermal conditions observed in industrial-size tanks when the temperature rises freely until the final setpoint is reached [16]. Two anisothermal fermentations were run between 15 and 30 °C, thus covering the maximum range of temperatures used in winemaking. Another fermentation was conducted between 20 and 30 °C, simulating a common temperature profile for red winemaking. All parameters and control conditions for the fermentation experiments in this study are summarized in Table 1.

2.2. Analysis of volatile compounds

2.2.1. Online measurements in the gas

The gas was pumped at a flow rate of 14 mL/min from the tank headspace through a heated transfer line and concentrated in a cold trap (Tenax TM) for 6 min (desorption at 160 °C for 1 min), and injected into a ZBWax (60 m × 0.32 mm × 0.5 μm, Phenomenex Inc.). The injector was kept at 200 °C. Helium was used as the carrier gas at a constant pressure of 120 kPa. The oven temperature program was 38 °C for 3 min, 3 °C/min up to 65 °C, then 6 °C/min to 160 °C, held for 5 min, then 8 °C/min up to 230 °C and held for 5 min. A flame ionisation detector (FID) was used at 260 °C.

The on-line GC system was calibrated by using a Sonimix 6000C1 (LNI Schmidlin SA). This equipment generates standard gases by dilution from standard gas bottles or permeation tubes. Standard gas bottles (Air Product) containing 4004, 85.1 and 100 mmol/Kmol of ethyl acetate (CAS number 141-78-6), isoamyl acetate (CAS number 123-92-2) and isobutanol (CAS number 78-83-1), respectively, were used. A permeation tube with a permeation rate of 4831 ng/min at 45 °C (LNI Schmidlin SA) was used to calibrate ethyl hexanoate (CAS number 123-66-0) concentration. The permeation tube was placed in an oven at 45 °C, and diluted with air at 51 mL/min.

2.2.2. Measurements in the liquid

NaCl (1 g) was added to 3 mL of the fermentation sample in a 20 mL vial. To standardise the equilibrium conditions between the liquid and the headspace, the ethanol concentration in the vial was adjusted to 11% by adding 2 mL of a mixture of 12 g/L tartaric acid solution diluted either in water or a ethanol/water mix (30%, v/v). Fifty microlitre of 4-methylpentan-2-ol at a concentration 3 g/L was added to the vial as an internal standard. The sample vial was heated and agitated for 5 min at 50 °C in a headspace autosampler HT200 equipped with a gastight syringe, preheated to 60 °C. One millilitre of headspace gas was analysed by using a HP6890 GC coupled with a FID detector. The injector temperature was 240 °C. The GC oven was equipped with a BP20 column (30 m × 0.53 mm × 1.0 μm, SGE). H₂ was used as the carrier gas at a constant flow rate of 4.8 mL/min. The oven temperature programme was 40 °C for 3 min, 3 °C/min to 80 °C, 15 °C/min to 160 °C held for 1 min, then 30 °C/min to 220 °C and then held at 220 °C for 2 min. The detector was set at 250 °C. Peak areas were acquired with Agilent Chemstation software.

2.3. Determinations of gas–liquid partition coefficients (k_i)

The gas–liquid partition coefficients (k_i) during fermentation were followed by dividing the volatile concentrations in the tank headspace by the concentrations in the liquid at various times. Several k_i were also determined in samples taken at different stages of fermentation by using the Phase Ratio Variation (PRV) method in static conditions as previously described [12,17].

2.4. Modelling

The equations of the mathematical model (listed in Section 3) were implemented in a program written under Matlab 7 (The Mathworks Inc., Natick, MA). The parameters were identified by nonlinear regression under Matlab, using the Statistic Toolbox.

3. Results and discussion

3.1. Model development

3.1.1. Effects of CO₂ stripping and of must composition

Morakul et al. [12] used synthetic solutions with increasing ethanol concentrations and decreasing sugar concentrations to simulate the evolution of the composition of must during fermentation. They showed that the gas–liquid partition coefficients (k_i) of higher alcohols and esters continuously decreased as the composition of a model wine fermentation medium changed because the sugar induces 'salting out' of volatile compounds (at the beginning of a fermentation) whereas the ethanol increases their solubility, and thereby decreases their volatility. The authors also observed

Table 1

Experimental conditions of the fermentation trials, used for model identification and for model validation.

Fermentations	Initial assimilable nitrogen (mg/L)	Regulated temperature (°C)	Identification/validation
Constant rate fermentations (CRF) ^a			
(1) CRF-0.3	40	20	
(2) CRF-0.6	120	20	
Isothermal fermentations (IF) ^b			
(3) IF-20-A	140	20	Model identification
(4) IF-20-B	240	20	Model validation
(5) IF-30	240	30	Model identification
Anisothermal fermentations (AF) ^c			
(6) AF-15-30	140	15–30	Model identification
(7) AF-20-30	140	20–30	Model validation

^a The rate of CO₂ production was kept constant at 0.3 and 0.6 g/L h by addition of ammoniacal nitrogen.^b The temperature during fermentation was regulated at the indicated constant values.^c The fermentation temperature was increased by 0.2 °C per g/L of CO₂ produced.

a decrease of the relative gas–liquid ratio of these molecules during fermentation. However, the ratios were expressed in arbitrary units and could not be directly compared to the values of k_i obtained in synthetic solutions, without any release of CO₂.

To complete this previous preliminary study, the first aim of the present work was to clarify the effect of stripping on gas–liquid partitioning of aroma compounds. The stripping effect is complex because, in usual fermentations, both the rate of CO₂ production and other factors vary throughout the fermentation process. The problems associated with this complexity were overcome by controlling the rate of CO₂ release. The effect of stripping was indeed isolated by running fermentations in which the rate of CO₂ production was kept constant by controlled perfusion of ammoniacal nitrogen. By modifying the amount of assimilable nitrogen initially present in the must i.e. 40 mg/L or 120 mg/L (no addition or addition of 80 mg/L of ammoniacal nitrogen), it was possible to set up two fermentations (CRF-0.3 and CRF-0.6) in which the rates of CO₂ production were kept constant at 0.3 g/L h and 0.6 g/L h, respectively. The rate of CO₂ production was regulated between 10 and 85% of the fermentation progress. Fig. 1 compares the evolution of the CO₂ production rate (i) in these two fermentations and in (ii) an isothermal fermentation at 20 °C, without any control of the CO₂ production rate (IF-20-B).

Changes in gas–liquid concentration ratios of ethyl acetate, isoamyl acetate, ethyl hexanoate and isobutanol were compared in these three different fermentation conditions. They were also compared to the values of k_i calculated by the static headspace

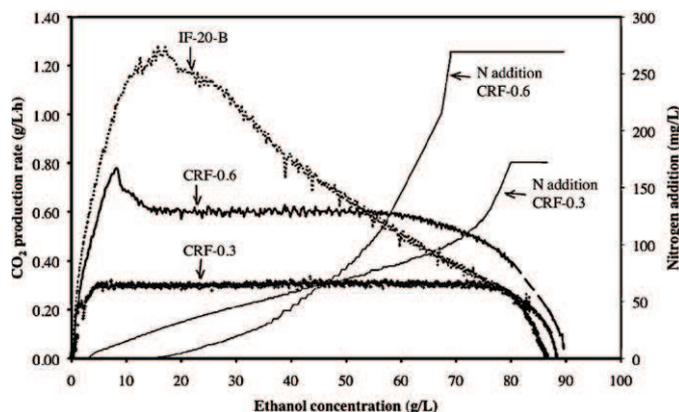


Fig. 1. Evolution of the CO₂ production rate as a function of ethanol concentration, for a standard fermentation IF-20-B (⋯), and for constant rate fermentations at CO₂ production rates of 0.3 g/L h CRF-0.3 (+) and 0.6 g/L h CRF-0.6 (---) and assimilable nitrogen concentration added to control the CO₂ production rate (—). Initial assimilable nitrogen concentrations in the musts: 240, 40 and 120 mg/L. Temperature: 20 °C.

PRV method in samples taken during fermentation. In these samples, k_i was measured at equilibrium, in the absence of CO₂ release. Fig. 2 shows the results obtained for isoamyl acetate and isobutanol, the following observations being also valid for the other volatile molecules (data not shown). A very remarkable result was that (i) almost identical decreases in k_i with increasing ethanol concentration were observed whatever the CO₂ production rate and (ii) values of the partition coefficients were close to those obtained at equilibrium without any CO₂ release. It can therefore be concluded that stripping did not significantly change the gas–liquid partitioning of aroma compounds during fermentation and that the two phases always remained at equilibrium throughout the process in spite of the CO₂ flux.

Therefore, at constant temperature, the values of k_i which reflect changes in the gas–liquid partitioning of aroma compounds in fermenting musts only result from changes in the composition of

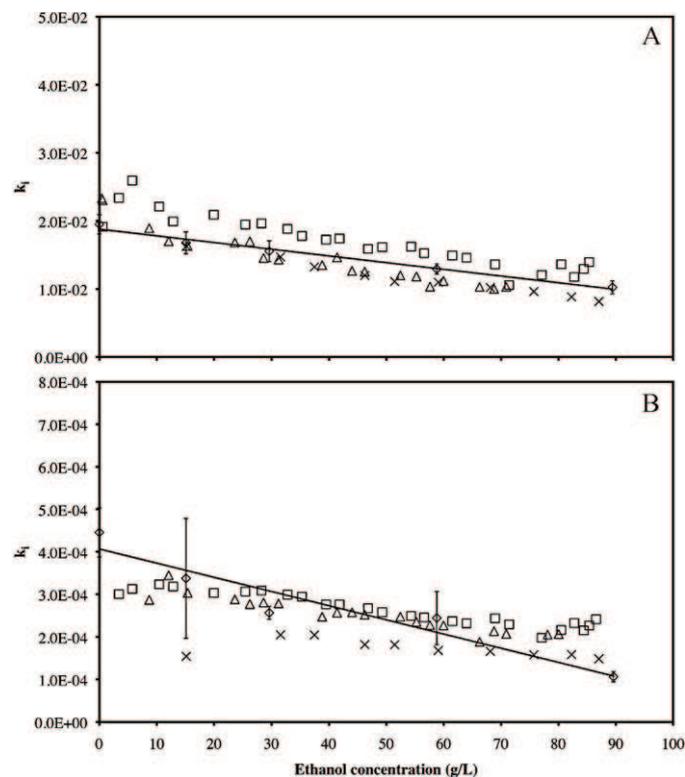


Fig. 2. Changes in gas–liquid ratio (k_i) as a function of ethanol concentration for isoamyl acetate (A) and isobutanol (B); standard fermentation IF-20-A (×), constant rate fermentation at 0.3 g/L h CRF-0.3 (□) and constant rate fermentation at 0.6 g/L h CRF-0.6 (△). Comparison with k_i measured in static conditions by the PRV method (◇). Temperature: 20 °C.

Table 2
Numerical values for the model parameters identified from Eq. (4) and given with their standard error.

Parameter	Ethyl acetate	Isoamyl acetate	Ethyl hexanoate	Isobutanol
$F1$ (–)	-6.11 ± 0.07	-3.98 ± 0.03	-3.09 ± 0.31	-8.45 ± 0.03
$F2$ (L/g)	$-2.9 \times 10^{-3} \pm 1.2 \times 10^{-3}$	$-9.6 \times 10^{-3} \pm 0.5 \times 10^{-3}$	$-1.39 \times 10^{-2} \pm 0.06 \times 10^{-2}$	$-4.1 \times 10^{-3} \pm 0.5 \times 10^{-3}$
$F3$ (kJ/mol)	71 ± 9	49 ± 4	55 ± 4	53 ± 4
$F4$ (kJ/L/mol g)	$-4.4 \times 10^{-1} \pm 1.5 \times 10^{-1}$	$-1.7 \times 10^{-3} \pm 59 \times 10^{-3a}$	$8.6 \times 10^{-2} \pm 6.1 \times 10^{-2a}$	$6.4 \times 10^{-3} \pm 60 \times 10^{-3a}$

^a A standard error leading to the value zero being included in the 95% confidence interval means that the parameter is not significantly different from zero.

the liquid phase, that is the decreasing sugar concentration and increasing ethanol concentration.

Consequently, at constant temperature, the evolution of k_i can be written as follows:

$$k_i = A \times E + B \quad (1)$$

where A and B are constants depending on the considered compound i , and E is the ethanol concentration (g/L) in the liquid phase, which is proportional to the sugar consumption and CO_2 production. E is therefore representative of the whole matrix effect corresponding to the modification of the ethanol and sugar concentrations.

3.1.2. Effect of temperature

Gas–liquid partitioning not only depends on the composition of the liquid phase; it is also strongly affected by the temperature. For a constant medium composition, the Clausius–Clapeyron law is usually applied to the changes in partition coefficient (k_i) with temperature [19]:

$$-\frac{d(\ln k_i)}{d(1/T)} = \frac{\Delta H_{vap}}{R} \text{ or } \ln k_i = C - \frac{\Delta H_{vap}}{R \times T} \quad (2)$$

where ΔH_{vap} is the phase change enthalpy of the volatile compound expressed in J/mol, T is the absolute temperature (K), R is the perfect gas constant (8.413 J/mol K) and C is a constant.

Nevertheless, Morakul et al. [12] showed that, in synthetic media, the value of the parameter ΔH_{vap} is not constant. For example, the ΔH_{vap} of isobutanol was 71.4 kJ/mol in a synthetic medium simulating a grape juice and 37.8 kJ/mol in a synthetic medium simulating a wine. As a consequence, the effect of the temperature on the gas–liquid partitioning not only depends on the temperature but is also a function of the composition of the liquid phase. So, the classical Clausius–Clapeyron expression was modified to introduce the dependence of the values C and ΔH_{vap} on the medium composition:

$$\ln k_i = D1 + D2 \times E - \frac{D3 + D4 \times E}{R \times T} \quad (3)$$

where T is the absolute temperature and $D1$, $D2$, $D3$ and $D4$ are constants. To give a clearer physical meaning to the parameters of the model, we modified the previous equation by including a reference temperature (T_{ref}), so the model expression became:

$$\ln k_i = F1 + F2 \times E - \frac{F3 + F4 \times E}{R} \left(\frac{1000}{T} - \frac{1000}{T_{ref}} \right) \quad (4)$$

where T is the current absolute temperature, T_{ref} corresponds to the absolute reference temperature, i.e. 293 K (20 °C) in this study and $F1$, $F2$, $F3$ and $F4$ are constants. $F1$ is the logarithm of the partition coefficient ($\ln k_i$) at the reference temperature in the initial must ($E=0$). $F2$ represents the sensitivity of the partition coefficient to medium composition at the reference temperature. $F3$ corresponds to the value of ΔH_{vap} in the initial must ($E=0$), ΔH_{vap} giving the sensitivity of k_i to changes in temperature. $F4$ represents the sensitivity of ΔH_{vap} to changes in medium composition, described here as the ethanol concentration. The arbitrary factor 1000 was introduced for numerical convenience, to have numeric parameter values ($F1$ – $F4$)

of order of one. This generally favours reliable identification with nonlinear regression software. This factor can be of course absorbed into the values of $F3$ and $F4$.

The mathematical expression detailed in Eq. (4) was then used in the subsequent steps to model the evolution of the k_i values for ethyl acetate, isoamyl acetate, ethyl hexanoate and isobutanol throughout the wine fermentation as a function both of the ethanol production and of the temperature.

3.2. Model identification

Model parameters in Eq. (4) were determined simultaneously by nonlinear regression based on the values of the k_i (in concentration ratio) obtained from three experiments: (i) isothermal fermentation at 20 °C (IF-20-A), (ii) isothermal fermentation at 30 °C (IF-30) and (iii) anisothermal fermentations between 15 and 30 °C (AF-15-30). All k_i measurements (41 values, including 14 from IF-20-A, 11 from IF-30 and 16 from AF-15-30) were used to determine the parameters $F1$ – $F4$ together with their standard errors (Table 2).

The estimated values of $F1$ were consistent with the values of $\ln k_i$ measured by the PRV method [12] in static conditions in the must at the beginning of fermentation (-5.11 , -3.94 , -3.68 and -7.72 for ethyl acetate, isoamyl acetate, ethyl hexanoate and isobutanol, respectively). Among the volatile compounds studied, ethyl hexanoate had the highest $\ln k_i$ consistent with the higher volatility of this compound whereas isobutanol, which had a lower value of $\ln k_i$, is always less volatile than esters.

$F2$ values were negative, indicating that k_i decreased as the ethanol concentration increased. The most negative value indicates the greatest sensitivity of k_i to the changes in liquid composition. Ethyl hexanoate was the molecule most affected by the liquid composition ($F2 = -1.39 \times 10^{-2}$) and ethyl acetate and isobutanol were less sensitive with $F2$ values of -2.90×10^{-3} and -4.10×10^{-3} , respectively. This sensitivity is seemingly related to the hydrophobicity of the molecule. Indeed, the hydrophobicity constant values ($\log K_{ow}$ at 25 °C), i.e. 0.76, 0.73, 2.25 and 2.83, for isobutanol, ethyl acetate, isoamyl acetate and ethyl hexanoate, respectively (SRC Interactive PhysProp database, Syracuse), are in the same order as $F2$.

The values of $F3$ representing the sensitivity of k_i to the temperature, were compared to previously reported ΔH_{vap} values [12]. The ΔH_{vap} was 39, 39.4, 67.5 and 71.4 kJ/mol for ethyl acetate, isoamyl acetate, ethyl hexanoate and isobutanol, respectively. Although the values are in the same order of magnitude as our $F3$ values, there are differences of about 20% for isoamyl acetate, ethyl hexanoate and isobutanol. These differences between $F3$ and ΔH_{vap} may be a consequence of the differences in the matrix used, as the $F3$ values were identified using the natural must whereas ΔH_{vap} were calculated using a synthetic medium which contained only sugar and weak acids to simulate the must at the start of the fermentation. The difference between $F3$ and ΔH_{vap} for ethyl acetate is higher than 40%, and this might be due to an atypical behaviour of this compound. Indeed, temperature had little influence on the value of k_i of ethyl acetate and therefore, it is difficult to determine precisely the values of $F3$ and $F4$.

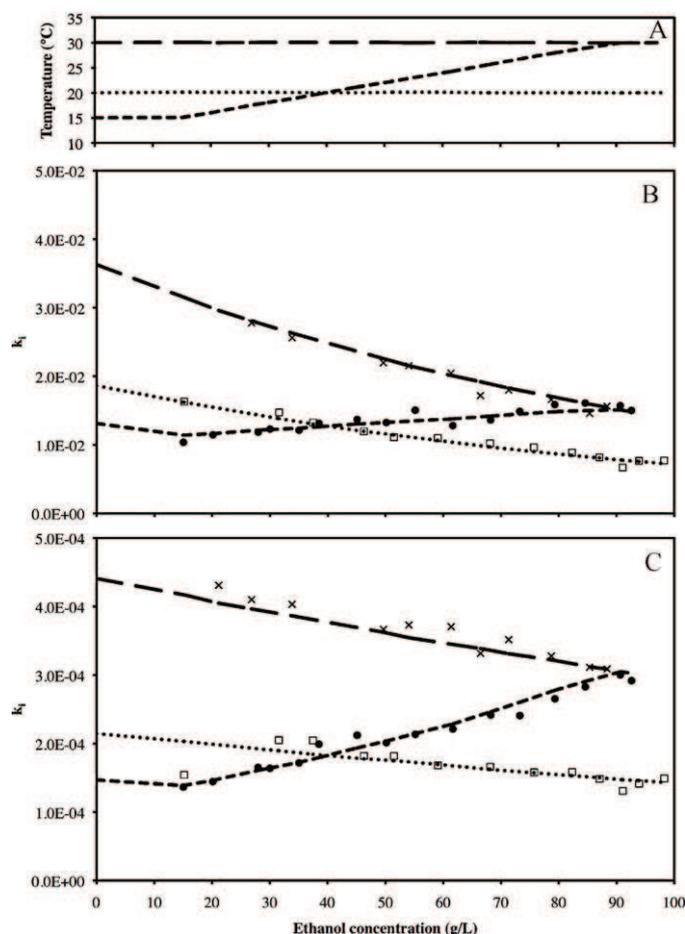


Fig. 3. Comparison of predicted and measured k_i for isoamyl acetate (B) and isobutanol (C) in fermentations run at different fermentation temperatures (A) for model identification. (B) and (C) show predicted (···) and measured (□) k_i during an isothermal fermentation at 20 °C (IF-20-A); predicted (---), measured (●) k_i during an isothermal fermentation at 30 °C (IF-30); predicted (—), measured (×) k_i during an isothermal fermentation at 30 °C (IF-30). The (A) graph shows temperature profiles for the three fermentation runs IF-20-A, IF-30 and AF-15-30.

A sensitivity analysis of the model was conducted to assess the effect and the relative importance of the model parameters. Average conditions ($T = 25$ °C and ethanol concentration $E = 45$ g/L) were selected and each parameter ($F1$ – $F4$) was arbitrarily increased by 30%. As expected, parameter $F1$ (directly related to the partition value) had the higher sensitivity, comprised between 64% for ethyl hexanoate and 92% for isobutanol. Its knowledge is thus the most important for accurately predicting k_i . The second most important parameter (between 10 and 16% sensitivity) was $F3$, confirming the usually reported fact that temperature has a significant effect on volatility. The effect of the medium composition expressed via $F2$ was similar (between 4% for ethyl acetate and 17% for ethyl hexanoate). Finally, parameter $F4$ was found to have some effect only for ethyl acetate (4%), and less than 1% for the other compounds studied; this is consistent with the model identification results indicating that a significantly different from zero value of $F4$ could only be determined for ethyl acetate.

3.3. Model validation

After parameter identification, the variation of k_i as a function of ethanol concentration and temperature, according to Eq. (4), was plotted. Fig. 3 shows the plot for fermentations used for parameter identification and Fig. 4 that for independent fermentations:

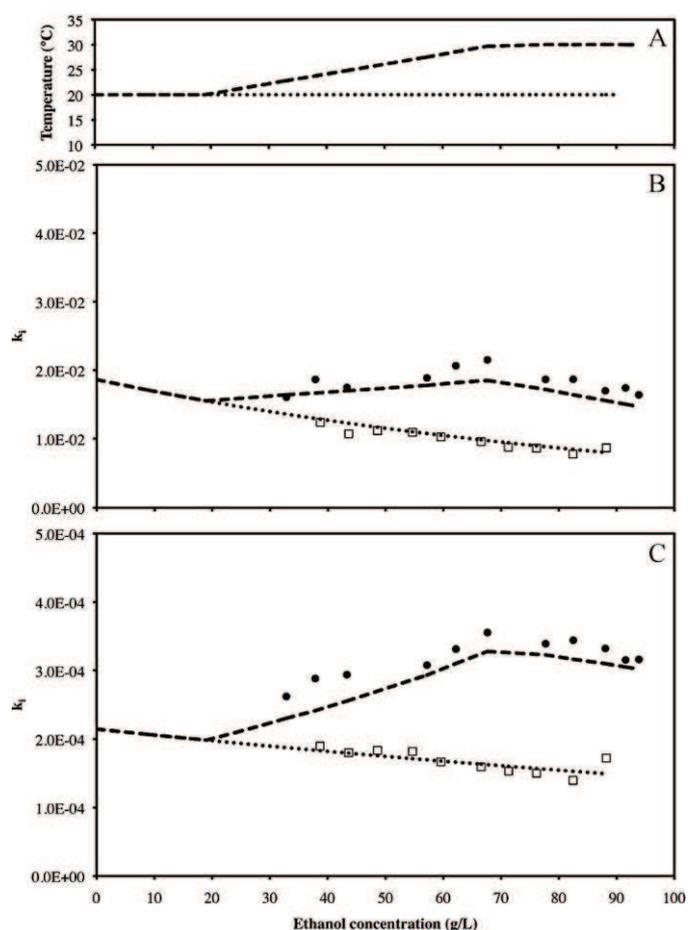


Fig. 4. Comparison of predicted and measured values for k_i for isoamyl acetate (B) and isobutanol (C) in fermentations run at different fermentation temperatures (A) for model validation. (B) and (C) show predicted (···) and measured (□) k_i during an isothermal fermentation at 20 °C (IF-20-B); predicted (---), measured (●) k_i during an isothermal fermentation at 30 °C (IF-30); predicted (—), measured (×) k_i during an isothermal fermentation at 30 °C (IF-30). The (A) graph shows temperature profiles for the two fermentation runs IF-20-B and AF-20-30.

(i) isothermal fermentation at 20 °C (IF-20-B) and (ii) anisothermal fermentation between 20 and 30 °C (AF-20-30).

The mean relative error between model prediction values and the measured values was calculated as follows:

$$\varepsilon = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \left| \frac{k_{ij}^{\text{measured}} - k_{ij}^{\text{predicted}}}{k_{ij}^{\text{measured}}} \right| \times 100\% \quad (5)$$

where n is the number of k_i measurements used for model validation. Table 3 indicates that (i) the average differences between the experimental and the calculated values were less than 10% for isoamyl acetate, ethyl hexanoate and isobutanol and (ii) the precision of the k_i estimations was comparable for data from experiments not used for parameter identification. These results demonstrate the value of the model to predict k_i with a good accuracy for these 3 compounds. The prediction was much less satisfactory for ethyl acetate with differences up to 33%, due to an atypical behaviour of this compound.

One of the main reasons why predicting k_i is valuable is that it allows calculation of the concentrations of volatiles in the gas phase from measurements in the liquid, and the reverse. It is therefore possible to calculate the global production by adding the volatile concentration in the liquid to the amount lost in the gas phase (Eq.

Table 3
Mean relative errors (%) between predicted and measured k_i calculated according to Eq. (5), with n : number of k_i measurements per fermentation.

Fermentations	Ethyl acetate		Isoamyl acetate		Ethyl hexanoate		Isobutanol	
	%	n	%	n	%	n	%	n
Fermentations used for model identification								
Anisothermal 15–30 °C	12.8	16	4.13	16	4.1	16	3.28	16
Isothermal at 20 °C	13.5	14	5.15	14	6.5	14	6.23	14
Isothermal at 30 °C	14.5	11	3.47	10	7.0	12	4.63	12
Mean	13.5		4.25		5.7		4.65	
Independent fermentations used for model validation only								
Anisothermal 20–30 °C	17.2	11	9.07	11	6.6	11	7.94	11
Isothermal at 20 °C	32.8	10	5.77	10	4.2	10	4.92	10
Mean	24.7		7.42		5.4		6.50	

Table 4
Volatile compound losses (%). Comparison of predicted^a (pred.) and measured^b (meas.) values for losses, in %.

Experiments	Ethyl acetate		Isoamyl acetate		Ethyl hexanoate		Isobutanol	
	Pred.	Meas.	Pred.	Meas.	Pred.	Meas.	Pred.	Meas.
Anisothermal 15–30 °C	7.48	6.87	33.3	33.7	54.2	54.3	0.66	0.65
Isothermal at 20 °C	5.86	6.02	25.2	25.6	44.6	44.4	0.55	0.54
Isothermal at 30 °C	13.6	13.0	44.1	42.2	70.9	71.0	1.33	1.33
Anisothermal 20–30 °C	10.5	12.5	45.0	46.7	66.3	64.7	0.93	1.01
Isothermal at 20 °C	5.59	8.73	27.1	26.2	46.2	45.3	0.63	0.63

^a Predicted losses were calculated from k_i values and concentrations of the volatiles in the liquid.

^b Measured losses were calculated from concentrations of the volatiles in the gas.

(6)):

$$\text{Losses} = \frac{\int_0^{t_{\text{end}}} C^{\text{gas}}(t) \times Q(t) \times dt}{C^{\text{liq}}(t_{\text{end}}) + \int_0^{t_{\text{end}}} C^{\text{gas}}(t) \times Q(t) \times dt} \times 100\% \quad (6)$$

where t is the current time (h), t_{end} is the final time (h), $C^{\text{gas}}(t)$ is the concentration of volatile compound in the gas phase at time t expressed in mg/L of CO₂, $Q(t)$ is the CO₂ specific flow rate at time t expressed in (L of CO₂/L of must)/h and C^{liq} is the total concentration of the volatile compound in the must at the end of the fermentation (mg/L of must).

The relative amount of volatiles lost, i.e. the ratio of losses to total production, is of particular technological interest. Table 4 compares measured (using concentrations in the gas) and predicted (using k_i values and concentrations in the liquid) loss values. The predicted losses were very close to the values measured, illustrating the accuracy of the model. The amounts of lost volatile in the gas phase varied with the volatility of the compounds: it was negligible in the case of isobutanol but was 70% for ethyl hexanoate at 30 °C.

4. Conclusion

The gas–liquid partitioning of the main aroma compounds produced during winemaking fermentations, namely isobutanol, isoamyl acetate, ethyl hexanoate and to a lesser extent ethyl acetate, was accurately predicted by the model. The model, based on the effects of changes to the matrix and temperature during fermentation, allowed estimation of the partition coefficient (k_i) with less than 10% error, except for ethyl acetate. The benefits of predicting k_i include allowing the calculation of the total production of the volatile compounds from a single measure (concentration in the gas or in the liquid phase). This is particularly advantageous in the case of on-line monitoring of the main aroma compounds in the gas, as described by Mouret et al. [2]. The ability to calculate the total production and to differentiate between the amounts remaining in the liquid and those lost in the CO₂ are major issues for improving our

understanding of yeast metabolism and optimising fermentation control. From a microbiological point of view, the total amount produced needs to be considered whereas, from a technological point of view, the concentration remaining in the wine is more important. For some molecules, such as isobutanol, the losses in the gas are negligible but for more volatile compounds, in particular esters, such losses can represent a very significant proportion of the total production. Minimising these losses, by optimising the fermentation control, particularly the temperature profile, is a significant challenge. The objective is to find the best compromise between fermentation kinetics and aroma production. The development of metabolic models predicting the synthesis of aroma compounds [20], in combination with the model of gas–liquid partitioning and with a kinetic model [21] represents a complex but very promising prospect.

Acknowledgement

This research was funded by the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007–2013), under grant no. KBBE-212754.

References

- [1] Swiegers JH, Bartowsky EJ, Henschke PA, Pretorius IS. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust J Grape Wine Res* 2005;11:139–73.
- [2] Mouret J-R, Nicolle P, Angenieux M, Aguera E, Perez M, Sablayrolles J-M. On-line measurement of 'quality markers' during winemaking fermentations. In: International Intervitis Interfructa Congress. 2010.
- [3] Gee DA, Ramirez WF. A flavour model for beer fermentation. *J Inst Brew* 1994;100:321–9.
- [4] Trelea IC, Latrille E, Landaud S, Corrieu G. Reliable estimation of the key variables and of their rates of change in alcoholic fermentation. *Bioprocess Biosyst Eng* 2001;24:227–37.
- [5] Trelea IC, Titica M, Corrieu G. Dynamic optimisation of the aroma production in brewing fermentation. *J Process Control* 2004;14:1–16.
- [6] Banavara DS, Rabe S, Krings U, Berger RG. Modeling dynamic flavor release from water. *J Agric Food Chem* 2002;50:6448–52.
- [7] Marin M, Baek I, Taylor AJ. Volatile release from aqueous solutions under dynamic headspace dilution conditions. *J Agric Food Chem* 1999;47:4750–5.
- [8] Nahon DF, Harrison M, Roozen JP. Modeling flavor release from aqueous sucrose solutions, using mass transfer and partition coefficients. *J Agric Food Chem* 2000;48:1278–84.

- [9] Robinson AL, Ebeler SE, Heymann H, Boss PK, Solomon PS, Trengove RD. Interactions between wine volatile compounds and grape and wine matrix components influence aroma compound headspace partitioning. *J Agric Food Chem* 2009;57:10313–22.
- [10] Tsachaki M, Gady A-L, Kalopesas M, Linforth RST, Athes V, Marin M, et al. Effect of ethanol, temperature, and gas flow rate on volatile release from aqueous solutions under dynamic headspace dilution conditions. *J Agric Food Chem* 2008;56:5308–15.
- [11] Tsachaki M, Linforth RST, Taylor AJ. Aroma release from wines under dynamic conditions. *J Agric Food Chem* 2009;57:6976–81.
- [12] Morakul S, Athes V, Mouret J-R, Sablayrolles J-M. Comprehensive study of the evolution of gas–liquid partitioning of aroma compounds during wine alcoholic fermentation. *J Agric Food Chem* 2010;58:10219–25.
- [13] Ferreira V, Pena C, Escudero A, Cacho J. Losses of volatile compounds during fermentation. *Z Lebensm-Unters Forsch* 1996;202:318–23.
- [14] Francis IL, Newton JL. Determining wine aroma from compositional data. *Aust J Grape Wine Res* 2005;11:114–26.
- [15] Manginot C, Sablayrolles JM, Roustan JL, Barre P. Use of constant rate alcoholic fermentations to compare the effectiveness of different nitrogen sources added during the stationary phase. *Enzyme Microb Technol* 1997;20:373–80.
- [16] Sablayrolles JM, Barre P. Kinetics of alcoholic fermentation under anisothermal conditions. 2. Prediction from the kinetics under isothermal conditions. *Am J Enol Vitic* 1993;44:134–8.
- [17] Athes V, Pena y Lillo M, Bernard C, Perez-Correa R, Souchon I. Comparison of experimental methods for measuring infinite dilution volatilities of aroma compounds in water/ethanol mixtures. *J Agric Food Chem* 2004;52:2021–7.
- [19] Meynier A, Garillon A, Lethuaut L, Genot C. Partition of five aroma compounds between air and skim milk, anhydrous milk fat or full-fat cream. *Lait* 2003;83:223–35.
- [20] Charnomordic B, David R, Dochain D, Hilgert N, Mouret J-R, Sablayrolles J-M, et al. Two modelling approaches of winemaking: first principle and metabolic engineering. *Math Comp Model Dyn* 2010;16:535–53.
- [21] Malherbe S, Fromion V, Hilgert N, Sablayrolles J-M. Modeling the effects of assimilable nitrogen and temperature on fermentation kinetics in enological conditions. *Biotechnol Bioeng* 2004;86:261–72.

Vérification théorique de l'équilibre entre les phases gazeuse et liquide

Le début de l'article montre de façon expérimentale que les phases gazeuse et liquide peuvent être considérées à l'équilibre tout au long de la fermentation. Nous avons réalisé, en parallèle, une étude théorique pour confirmer cette hypothèse.

Sur le schéma présenté sur la **Figure 14** et dans les **équations 28 à 32**, la concentration en composé d'arôme dans la phase gaz est notée C^{gaz} , la concentration en composé d'arôme dans la phase liquide est notée C^{liq} , k_i le coefficient de partage, H la hauteur de liquide, V_g le volume de la bulle de CO_2 et A_b l'aire interfaciale offerte par une bulle de CO_2 .

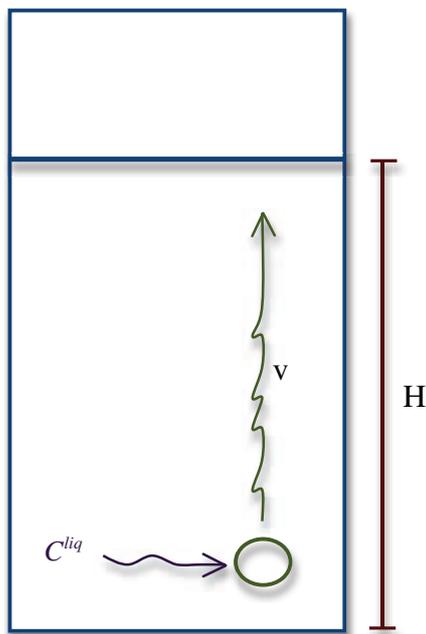


Figure 14. Schéma présentant le transfert de composés d'arôme vers la phase gazeuse (bulle de CO_2 produit pendant la fermentation).

Si on pose $x = \frac{C^{gas}}{C^{liq}k_i}$ alors si $x = 1$, les phases gaz et liquide sont à équilibre.

Tout d'abord, nous avons écrit le bilan matière dans l'air (agité) à l'échelle de la bulle :

$$V_g \frac{dC^{gas}}{dt} = JA_b - Q_g C^{gas} \quad \text{Equation 28}$$

où J est le flux de composé volatil transférant de la phase liquide vers la phase gaz et Q_g est le débit de gaz effluent.

Dans le cas de la fermentation, la concentration des composés volatils dans le liquide augmente au cours de la fermentation, du fait de la production par la levure. Dans une première approximation, nous ferons l'hypothèse selon laquelle la quantité de composés volatils perdue dans le gaz effluent est

négligeable par rapport à la quantité de composé transféré de la phase liquide vers la phase gaz. En appliquant cette hypothèse, l'équation 28 devient :

$$V_g \frac{dC^{gas}}{dt} = JA_b \quad \text{Equation 29}$$

Le flux de composé volatil entre les phases gaz (bulle) et liquide est calculé comme suit:

$$J = k_0(k_i C^{liq} - C^{gas}) \quad \text{Equation 30}$$

où k_0 est le coefficient global de transfert de matière. Il peut être exprimé selon $\frac{1}{k_0} = \frac{1}{k_G} + \frac{k_i}{k_L}$ avec k_G et k_L les coefficients de transfert locaux côté gaz et côté liquide.

A partir des Equations 29 et 30 on obtient :

$$\frac{dC^{gas}}{dt} = \frac{k_0 A_b k_i C^{liq}}{V_g} - \frac{k_0 A_b C^{gas}}{V_g} \quad \text{Equation 31}$$

En intégrant l'Equation 31, on obtient :

$$C^{gas}(t) = C_\infty^{gas} + (C_0^{gas} - C_\infty^{gas}) \exp\left(\frac{-k_0 A_b t}{V_g}\right) \quad \text{Equation 32}$$

où $C_\infty^{gas} = k_i C^{liq}$ = Concentration à l'équilibre et $C_0^{gas} = 0$

Donc

$$C^{gas}(t) = k_i C^{liq} \left(1 - \exp\left(\frac{-k_0 A_b t}{V_g}\right)\right)$$

On peut alors calculer le ratio entre les concentrations en composé volatil dans les phases gaz et liquide :

$$\frac{C^{gas}(t)}{k_i C^{liq}} = \left(1 - \exp\left(\frac{-k_0 A_b t}{V_g}\right)\right) = x$$

Sachant que

$$V_g = \frac{4}{3} \pi R^3 \quad \text{et} \quad A_b = 4 \pi R^2, \quad \text{on a : } A_b / V_g = 3/R \quad \text{où } R \text{ correspond au rayon de la bulle de } CO_2.$$

Le calcul du paramètre x est donc le suivant :

$$x = 1 - \exp\left(\frac{-k_0 3t}{R}\right) \text{ avec } k_0 = \frac{1}{\frac{1}{k_G} + \frac{k_i}{k_L}}$$

donc
$$x = 1 - \exp\left(\frac{1}{\frac{1}{k_G} + \frac{k_i}{k_L}} \frac{3t}{R}\right) = 1 - \exp\left(\frac{3t}{R\left(\frac{1}{k_G} + \frac{k_i}{k_L}\right)}\right)$$

Pour savoir si le ratio des concentrations en phase gaz et liquide (paramètre x) est proche de 1 dans nos conditions de fermentation, et donc si les phases gaz et liquide sont potentiellement à l'équilibre, nous avons calculé la valeur de x pour différentes valeurs des paramètres suivants, selon des ordres de grandeurs connus :

- Coefficient de transfert du composé volatil dans le gaz (k_G) = $10^{-2} - 10^{-3}$ m/s
- Coefficient de transfert du composé volatil dans le liquide (k_L) : $10^{-6} - 10^{-7}$ m/s
- Coefficient de partage du composé volatil (k_i) : $10^{-2} - 10^{-4}$
- Rayon de la bulle de CO_2 (R) = $10^{-3} - 10^{-4}$ m
- Temps de « montée » de la bulle dans la phase liquide (t) = 10 sec. Ce temps est calculé en faisant le rapport H/v où H est la hauteur du fermenteur (1 m) et v est la vitesse de « montée » de la bulle (estimée à 0,1 m/sec).

Les valeurs du paramètre x pour les différents essais sont présentées dans le **Tableau 12**. Nous observons que dans la majorité des cas, le paramètre x est égal ou très proche de 1 ; cela signifie que les phases gaz et liquide devraient selon ces hypothèses être proches de l'équilibre. Le seul cas où l'équilibre ne serait pas atteint correspondrait à une situation où le composé étudié serait très volatil, où les bulles de CO_2 seraient de grande taille ($R \geq 0,001$ m) et où la résistance au transfert serait importante.

Tableau 12. Estimation du paramètre x, représentant l'écart éventuel du ratio de concentration entre les phases gaz et liquide par rapport à l'équilibre (x=1), pour différentes configurations de transfert.

descriptif des conditions de transfert	forte résistance au transfert, volatilité faible, bulle de petite taille	forte résistance au transfert, volatilité forte, bulle de petite taille	faible résistance au transfert, volatilité forte, bulle de petite taille	faible résistance au transfert, volatilité faible, bulle de petite taille	forte résistance au transfert, volatilité forte, bulle de grande taille	faible résistance au transfert, volatilité forte, bulle de grande taille	forte résistance au transfert, volatilité faible, bulle de grande taille	faible résistance au transfert, volatilité forte, bulle de grande taille
KL	1.0E-07	1.0E-07	1.0E-06	1.0E-06	1.0E-07	1.0E-06	1.0E-07	1.0E-06
KG	1.0E-03	1.0E-02	1.0E-02	1.0E-02	1.0E-03	1.0E-02	1.0E-03	1.0E-02
ki	1.0E-04	1.0E-02	1.0E-02	1.0E-04	1.0E-02	1.0E-02	1.0E-04	1.0E-02
t	10	10	10	10	10	10	10	10
R	1.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	1.0E-03	1.0E-03	1.0E-03	1.0E-03
k0	5.00E-04	9.90E-06	9.90E-05	5.00E-03	9.90E-06	9.90E-05	5.00E-04	5.00E-03
paramètre x	1.00	0.95	1.00	1.00	0.26	0.95	1.00	1.00

Chapitre 3

Bilan de production des composés d'arômes lors de la fermentation œnologique

Le suivi en ligne des composés volatils couplé au modèle d'estimation de k_i permet de décrire de façon très fine la dynamique de production des composés volatils à la fois dans la phase gazeuse et dans le moût en fermentation. Il permet aussi la réalisation de bilans tout au long de la fermentation.

Dans l'article qui suit (soumis à publication dans la revue Food and Bioprocess Technology), nous avons décrit l'évolution des vitesses et des vitesses spécifiques de production, accumulation et pertes de ces composés, en discutant l'intérêt de ces informations d'un point de vue microbiologique et technologique. Grâce à la réalisation de ces bilans, nous avons ensuite étudié plus particulièrement l'effet de la température, avec pour l'objectif de répondre à la question suivante : l'effet de la température sur les concentrations finales en composés volatils est-il du avant tout à des phénomènes microbiologiques (modification du métabolisme) ou physiques (pertes dans le gaz effluent)?

1 **Aroma compounds balance in winemaking**

2 **Sumallika Morakul¹, Jean-Roch Mouret¹, Paméla Nicolle², Evelyne Aguera²,**

3 **Jean-Marie Sablayrolles^{1*}, Violaine Athès³**

4 ¹INRA, UMR 1083, F-34060 Montpellier, France

5 ²INRA, UE 999, F-11430 Gruissan, France

6 ³AgroParisTech, INRA, UMR 782, F-78850 Thiverval Grignon, France

11 *Corresponding author

12 INRA-UMR-SPO

13 2 place Pierre Viala

14 34060 Montpellier France

15 Tel: + 33 4 99 61 25 00

16 Fax: +33 4 99 61 28 57

17 E-mail: sablayro@supagro.inra.fr

20 Abstract

21 The kinetics of isobutanol, isoamyl acetate and ethyl hexanoate production during winemaking
22 fermentations were precisely described. Volatile compound concentrations and their rates of change
23 and losses in the exhausted gas were determined throughout the fermentation. Negligible amounts of
24 isobutanol were lost, whatever the fermentation temperature. By contrast, 56 % of the ethyl hexanoate
25 and 34 % of the isoamyl acetate were stripped by the CO₂ when the temperature profile simulated red
26 winemaking conditions. Even at a moderate temperature of 20°C, typical of white wine fermentations,
27 40 % of the ethyl hexanoate and 21% of the isoamyl acetate were lost. Effect of temperature on the
28 production of the volatile compounds studied, was assessed by running fermentations at different
29 temperatures, with the same medium and strain. By taking into account the volatile compound losses
30 in the exhausted gas, changes in volatile compound production were found to be smaller than those
31 usually calculated from the concentrations in the wine. These findings highlight the potential
32 importance of knowledge concerning aroma gas-liquid balances, for both an understanding of yeast
33 metabolism and the identification of innovative control strategies minimizing aroma losses.

34
35 Keywords: gas-liquid balance, online GC measurement, wine, aroma

36 1. Introduction

1
2 37 The aroma compounds synthesized during alcoholic fermentation are highly diluted but make a
3
4 38 significant contribution to wine quality. Among them, higher alcohols and esters are the most
5
6 39 abundant. Higher alcohols are undesirable at high concentrations, but they are thought to contribute
7
8 40 positively to overall wine quality when present in smaller quantities, Esters are the main contributors
9
10 41 to the bouquet of young wines. Ethyl acetate, isoamyl acetate, isobutyl acetate, ethyl hexanoate and 2-
11
12 42 phenylethyl acetate are considered as the major components of a “fruity” flavour (Francis & Newton,
13
14 43 2005; Sumby et al., 2010; Swiegers et al., 2005). Varietal aromas — volatile compounds linked to non
15
16 44 volatile precursors in the grape that are released by the yeast — also play an essential role in
17
18 45 determining wine aroma, but are generally present at very low concentrations.
19
20
21
22

23 46 The concentrations of volatile aroma compounds at the end of fermentation depend principally on the
24
25 47 amounts of these compounds synthesized by the yeasts, but there may also be significant losses in the
26
27 48 CO₂ released. Quantification of the transfer of aroma compounds between the gas and liquid phases is
28
29 49 therefore essential and determination of the balance differentiating the microbiological process of
30
31 50 production from the physicochemical process of transfer in CO₂ therefore constitute major issues for
32
33 51 the improvement of our understanding of fermentations and the development of optimized strategies
34
35 52 for fermentation control. From a microbiological point of view, the total amounts produced must be
36
37 53 considered, whereas, from a technological point of view, the concentration remaining in the wine is
38
39 54 the key issue.
40
41
42
43

44 55 Ferreira et al. (1996) assessed volatile compound losses due to CO₂ production and showed that up to
45
46 56 80% of some molecules could be blown off. However, the CO₂ flow rates used in the study were up to
47
48 57 36 L/L.h, greatly exceeding the rate of CO₂ production achieved during fermentations, which are
49
50 58 generally below 1 L/L.h (Bely et al., 1990). Several studies have investigated flavor release in wine-
51
52 59 making, but have focused on the partitioning properties of volatile compounds in the final wines
53
54 60 (Robinson et al., 2009; Tsachaki et al., 2008; Tsachaki et al., 2009) without considering possible
55
56 61 losses during fermentation. Morakul et al. (2010) recently evaluated the effect of matrix changes
57
58 62 during alcoholic fermentation (principally sugar consumption and ethanol production over time) and
59
60
61
62
63
64
65

63 of temperature on gas-liquid partitioning, as determined by partition coefficient determinations at
64 equilibrium (k_i) in model mixtures simulating fermenting musts at various stages. They found that the
65 k_i values obtained for each aroma compound studied were strongly influenced by the composition of
66 the fermenting must and by the temperature. They also demonstrated that the gas-liquid partitioning of
67 aroma compounds was not significantly modified by CO₂ stripping during fermentation and that the
68 liquid and gas phases remained in equilibrium throughout the process. Nevertheless, aroma
69 compounds are known to be stripped from fermenting musts and can lead to significant losses. In a
70 subsequent study, Morakul et al. (2011) proposed a model describing changes in k_i during
71 fermentation.

72 In the present work, the evolution of the aroma compound balance (including accumulation and
73 losses) was calculated during fermentations run with temperature profiles characteristic of white and
74 red wine fermentation conditions. Gas composition was monitored online, as described by Mouret et
75 al. (2010). Three molecules of organoleptic interest from different chemical families: one higher
76 alcohol (isobutanol), one ethyl ester (ethyl hexanoate) and one acetate ester (isoamyl acetate) were
77 studied. The effect of temperature was then assessed to evaluate the relative contributions of losses in
78 the CO₂ released and changes in yeast metabolism, with a view to determining why temperature has
79 such a major effect on the concentrations of higher alcohols and esters in wines, as highlighted in a
80 number of previous studies (Beltran et al., 2008; Cottrell & Mc Lellan, 1986; Killian & Ough, 1979;
81 Torija et al., 2003).

82 **2. Materials and methods**

83 *2.1. Fermentation*

84 *2.1.1. Yeast strains*

85 Commercial *Saccharomyces cerevisiae* strains were used. These wine yeasts are produced as active
86 dry yeast by Lallemand SA. Each fermentation tank was inoculated with 0.2 g/L active dry yeast that
87 had previously been rehydrated for 30 minutes at 35 °C.

88 *2.1.2. Musts*

89 Three natural musts based on different grape varieties from the South of France were used (**Table 1**).
90 They were flash-pasteurized and stored under sterile conditions. Their sugar concentrations were
91 between 174 and 195 g/L and their assimilable nitrogen concentrations were in the range 140 – 243
92 mg/L. A synthetic must (SM) was also used. It contained 180 g/L of sugar (glucose and fructose,
93 50/50 w/w) and its amino acid composition simulated the nitrogen content of a standard grape must, as
94 previously described by Bely et al. (1990). The total assimilable nitrogen concentration was 250 mg/L.

95 *2.1.3. Tanks*

96 Natural grape musts were fermented at pilot scale, in 100 L stainless steel tanks. One fermentation was
97 run in triplicate, to assess the reproducibility of the data. The synthetic must was fermented in 10 L
98 stainless steel tanks. In both conditions, the headspace accounted for 30% of the total volume.

99 *2.1.4. Control of fermentation*

100 The CO₂ released was automatically and precisely measured with a gas mass flow meter, and the rate
101 of CO₂ production (dCO₂/dt) was calculated. The fermentations were controlled in several different
102 ways:

103 (i) Isothermal fermentations (IF): the temperature was maintained at a constant value (20 and
104 30°C), with a precision of 0.1°C.

105 (ii) Anisothermal fermentations (AF): the temperature was regulated as a function of CO₂
106 production, which is proportional to sugar degradation, with a slope of 0.2°C/(g/L) of evolved CO₂.
107 This pattern of temperature change simulates the anisothermal conditions observed in industrial-size
108 tanks, in which the temperature increases freely until the final setpoint is reached (Sablayrolles &
109 Barre, 1993). Anisothermal fermentations were run between 15 and 30°C, thus covering the maximum
110 range of temperatures used in winemaking and simulating a common temperature profile for red wine
111 production. All the parameters and control conditions are summarized in **Table 1**.

112 *2.2. Analysis of volatile compounds*

113 *2.2.1. Online measurements in the gas*

1
2
3 114 The gas was pumped at a flow rate of 14 mL/min from the tank headspace, through a heated transfer
4
5 115 line. It was then concentrated in a cold trap (Tenax TM) for 6 min (desorption at 160°C for 1 min) and
6
7 116 injected into a ZBWax (60 m × 0.32 mm × 0.5 μm, Phenomenex Inc.) column. The injector was
8
9 117 maintained at 200°C. Helium was used as the carrier gas, at a constant pressure of 120 kPa. The oven
10
11 118 temperature program was 38°C for 3 min, followed by an increase at 3°C/min up to 65°C, then at
12
13 119 6°C/min to 160°C, at which it was maintained for 5 min, followed by an increase of 8°C/min up to
14
15 120 230°C, a temperature at which it was maintained for 5 min. A flame ionization detector (FID) was
16
17 121 used at 260°C.
18
19
20
21

22 122 The online GC system was calibrated with a Sonimix 6000C1 (LNI Schmidlin SA). This equipment
23
24 123 generates standard gases by dilution from standard gas bottles or permeation tubes. Standard gas
25
26 124 bottles (Air Product) containing 85.1 and 100 mmol/kmol of isoamyl acetate (CAS number 123-92-2)
27
28 125 and isobutanol (CAS number 78-83-1), respectively, were used. A permeation tube with a permeation
29
30 126 rate of 4831 ng/min at 45°C (LNI Schmidlin SA) was used to calibrate ethyl hexanoate (CAS number
31
32 127 123-66-0) concentration. The permeation tube was placed in an oven at 45°C, and diluted with air at
33
34 128 51 mL/min.
35
36
37
38

39 129 *2.2.2. Measurements in the liquid*

40
41
42
43 130 NaCl (1 g) was added to 3 mL of the fermentation sample in a 20 mL vial. For standardization of the
44
45 131 conditions of equilibrium between the liquid and the headspace, the ethanol concentration in the vial
46
47 132 was adjusted to 11% v/v by adding 2 mL of a mixture of 12 g/L tartaric acid solution diluted either in
48
49 133 water or an ethanol/ water mix (30% v/v). 50 μL of 4-Methylpentan-2-ol at a concentration 3 g/L was
50
51 134 added to the vial as an internal standard. The sample vial was heated and shaken for 5 min at 50°C in
52
53 135 an HT200 headspace autosampler equipped with a gastight syringe, heated to 60°C. One mL of
54
55 136 headspace gas was analysed by using the HP6890 GC coupled to a flame ionization detector. The
56
57 137 injector temperature was 240°C. The GC oven was equipped with a BP20 column (30 m × 0.53 mm ×
58
59
60
61
62
63
64
65

138 1.0 μm , SGE). H_2 was used as the carrier gas at a constant flow rate of 4.8 mL/min. The oven
 139 temperature program was 40°C for 3 min, followed by a 3°C/min increase to 80°C and a 15°C/min
 140 increase to 160°C, at which the temperature was held for 1 min, followed by a 30°C/min increase to
 141 220°C and maintenance at 220°C for 2 min. The detector was set at 250°C. Peak areas were acquired
 142 with Agilent Chemstation software.

143 2.3. Calculation of volatile compound balances during fermentation

144 2.3.1. Total production

145 The production of volatile compound at time t , expressed as $P(t)$ in mg/L of must, was calculated by
 146 adding the volatile concentration in the liquid phase, expressed as $C^{liq}(t)$ in mg/L of must, to the
 147 amount of volatile compound lost in the gas phase, expressed as $L(t)$ in mg/L of must (equation 1).

$$148 \quad P(t) = C^{liq}(t) + L(t) \quad \text{Equation 1}$$

149 2.3.2. Concentration in the liquid

150 The concentration in the liquid ($C^{liq}(t)$) was determined in two ways: experimentally ($C^{liq}(t)_{exp}$) or by
 151 estimation ($C^{liq}(t)_{est}$) from the concentration measured online in the gas phase, expressed as $C^{gas}(t)$ in
 152 mg/L of CO_2 , using the partition coefficient (k_i) value (equation 2).

$$153 \quad C^{liq}(t)_{est} = \frac{C^{gas}(t)}{k_i} \quad \text{Equation 2}$$

154 The value of k_i (equation 3) was calculated with the model developed by Morakul et al. (2011). It is a
 155 function of the fermenting must composition, characterized by ethanol concentration, and temperature:

$$156 \quad \ln k_i = F1 + F2 \times E - \frac{F3 + F4 \times E}{R} \left(\frac{1000}{T} - \frac{1000}{T_{ref}} \right) \quad \text{Equation 3}$$

157 E is the ethanol concentration (g/L) in the liquid phase calculated from the measurement of the
 158 released CO₂, which is proportional to sugar consumption. T is the current absolute temperature, T_{ref}
 159 corresponds to the absolute reference temperature (i.e. 293 K (20°C) in this study) and F1, F2, F3 and
 160 F4 are constants.

161 2.3.3. Losses in the exhaust gas

162 The losses in the gas were calculated according to equation 4.

$$163 \quad L(t) = \int_0^t C^{gas}(t) \times Q(t) \times dt \quad \text{Equation 4}$$

164 $Q(t)$ is the CO₂ flow rate at time t, expressed in liters of CO₂ per liter of must and per hour. The
 165 relative losses (RL), expressed as a percentage of production ($P(t)$), were determined as follows
 166 (equation 5) :

$$167 \quad RL = \frac{L(t)}{P(t)} = \frac{\int_0^{t_{end}} C^{gas}(t) \times Q(t) \times dt}{C^{liq}(t_{end}) + \int_0^{t_{end}} C^{gas}(t) \times Q(t) \times dt} \quad \text{Equation 5}$$

168 t_{end} is the fermentation final time (h),

169 2.3.4. Calculation of the rates of volatile compound production, accumulation and loss

170 The high frequency of online GC analysis (up to one analysis per hour) made it possible to calculate
 171 the rates of volatile compound production, accumulation and loss, using sliding window second-order
 172 polynomial smoothing in a custom-developed Labview application.

173 3. Results and discussion

174 3.1. Kinetic study of the aroma gas/liquid balance

175 The productions of isobutanol, isoamyl acetate and ethyl hexanoate were followed during
176 fermentation. Changes in the gas/liquid balance were determined by distinguishing between the
177 amounts of volatile compounds accumulating in the liquid and gas phases. The corresponding rates of
178 accumulation and loss were also determined. Two very different situations were tested: an isothermal
179 fermentation at 20°C (in triplicate: IF-20-A, IF-20-B and IF-20-C) and a fermentation with a
180 temperature increase from 15°C to 30°C (AF-15-30). The isothermal fermentation is typical of
181 conditions in white or rose wine production, whereas the anisothermal fermentation is typical of red
182 wine production.

183 *3.1.1 Isothermal fermentation simulating white wine production conditions*

184 3.1.1.1. Changes in the production and loss of volatile compounds

185 **Figure 1** shows the changes in amounts of volatile compounds (expressed in mg per liter of must) (i)
186 accumulating in the liquid phase and (ii) lost in the gaseous phase during fermentation. Net
187 production, corresponding to the sum of accumulation and losses, and CO₂ production rate, which
188 describes the fermentation kinetics, are also represented. For isoamyl acetate, the concentrations in the
189 liquid calculated from the measurements in the gas and from the k_i values ($C^{\text{liq}}(t)_{\text{est}}$) were accurately
190 confirmed by measurements ($C^{\text{liq}}(t)_{\text{exp}}$). For isobutanol and ethyl hexanoate, the estimates obtained
191 were also considered appropriate, despite a 10 to 15% difference at the end of fermentation.

192 Volatile compounds were synthesized throughout the fermentation, with higher levels of production
193 during the growth phase, which ended at 50 h, shortly after the maximum rate of CO₂ production was
194 achieved (Bely et al., 1990). Isobutanol was the most abundant molecule produced (27 mg/L).
195 Moreover, less than 0.5% of the isobutanol was lost in the exhaust gas, and this loss could therefore be
196 considered negligible (**Figure 1**). These low losses may be accounted for by the low volatility of
197 isobutanol, with a k_i of 0.19×10^{-3} at 20°C (Morakul et al., 2010). The concentrations of isoamyl
198 acetate and ethyl hexanoate at the end of fermentation were much lower, at 5.86 and 0.86 mg/L
199 respectively. In addition to being produced in smaller amounts, these compounds were more likely to

200 be transferred into the exhaust gas, with 21% of the isoamyl acetate and 40% of the ethyl hexanoate
201 being lost in the CO₂ (**Figure 1**). Thus, losses are clearly very large for esters with k_i values (at 20°C)
202 of 1.13×10^{-2} (isoamyl acetate) and 1.44×10^{-2} (ethyl hexanoate), and should be considered from both
203 a microbiological and a technological point of view.

204 3.1.1.2. Kinetic analysis

205 We calculated rates of isoamyl acetate loss for three independent fermentations at 20°C (**Figure 2**).
206 The results obtained were highly reproducible and the rate of loss was maximal mid-way through the
207 fermentation. Reproducibility was good and similar results were also obtained, for accumulation and
208 total production rates, for the three volatile compounds considered. Thus, when online GC monitoring
209 is used, changes in the total production, loss and accumulation rates of volatile compounds can be
210 determined precisely, to provide greater insight into the behavior of aroma compounds. These rates are
211 presented in **Figure 3**, together with the changes in CO₂ production rate. The various rates did not
212 peak at the same time. The maximum rate of CO₂ production was reached first, followed by the
213 maximum rate of volatile compound accumulation in the medium and then the maximum rate of
214 production and, finally, the maximum loss rate.

215 These peak rates are not simultaneous because the rate of volatile compound loss depends on three
216 main factors: the rate of CO₂ production, which enhances the stripping effect, the concentration of
217 volatile compounds in the liquid phase and the coefficient of partition between the gas and liquid
218 phases (k_i), which changes continually during fermentation (Morakul et al., 2010). Consequently, the
219 fermentation process can be subdivided into three phases: (i) From the start of the fermentation to
220 peak CO₂ production rate, during which time the loss rate remained low. Indeed, even if the k_i value
221 was high and the rate of CO₂ production increased continually, the near-zero concentration of the
222 volatile compound in the liquid ensured that loss rates remained low, due to the weak driving force.
223 (ii) The second phase continued until the maximum rate of volatile compound loss was reached. This
224 phase includes peak total volatile production rate. During this phase, the rate of volatile compound
225 loss depended principally on concentration in the liquid phase, which increased rapidly, whereas CO₂

226 production rate decreased slightly and k_i value decreased steadily (as shown by Morakul et al., 2010
1 and 2011). (iii) The third phase lasted until the end of fermentation. The rate of loss decreased
2 227 continuously to zero, because the increase in concentration in the liquid eventually became very slow
3
4 228 and could not offset the continuous decreases in both CO₂ production rate and k_i .
5
6 229

7
8
9
10 230 As a consequence, the ratio of loss rate/production rate increased throughout the fermentation (**Figure**
11
12 231 **4**). This increase was linear for both esters until the end of the accumulation phase. At this time point,
13
14 232 it reached 30 % for isoamyl acetate and 63% for ethyl hexanoate. It was even higher for the last part of
15
16 233 the curve, because of the very low rates of production at that time.
17
18

19 20 234 *3.1.2. Anisothermal fermentation simulating the conditions for red wine production* 21 22

23 235 To mimic red wine making conditions, an anisothermal fermentation was run from 15°C to 30°C with
24
25 236 a slope of 0.2°C/(g/L) of evolved CO₂ (Sablayrolles & Barre, 1993).
26
27

28 29 237 *3.1.2.1 Changes in the production and loss of volatile compounds* 30 31

32 238 The concentrations in the liquid calculated from the gas measurements and k_i values ($C^{\text{liq}}(t)_{\text{est}}$) were
33
34 239 very similar to the experimental results obtained for the fermenting must ($C^{\text{liq}}(t)_{\text{exp}}$), for all three
35
36 240 compounds considered (**Figure 5**). This result confirms the accuracy of the model developed by
37
38 241 (Morakul et al., 2011) and shows that concentrations in the fermenting must can be estimated from the
39
40 242 online gas measurements, whatever the temperature profile.
41
42
43

44
45 243 About 34% of the isoamyl acetate and 56% of the ethyl hexanoate produced was lost in the exhaust
46
47 244 gas by the end of fermentation (**Table 2**). These losses are about 66% and 41% higher, respectively,
48
49 245 than those obtained at 20°C (IF-20-D in **Table 2**). Isobutanol losses were only 30% higher for the
50
51 246 anisothermal fermentation, and they remained negligible.
52
53

54
55 247 For the two esters, the total production curve was constant during the last part of the fermentation, but
56
57 248 the concentration in the liquid phase decreased slightly after the peak value was reached. This
58
59 249 decrease was related to the increase in fermentation temperature, which favored the loss of volatile
60
61
62
63
64
65

250 compounds from the liquid to the gas phase, by increasing k_i and maintaining the rate of CO_2
251 production at a high level. Once the fermentation was completed and no further CO_2 was produced,
252 the concentration in the liquid remained constant.

253 3.1.2.2. Kinetic analysis

254 The CO_2 production rate profile differed considerably between anisothermal and isothermal
255 fermentations. This rate remained almost constant over a long period of time, because yeast activation
256 by the increase in temperature compensated for ethanol inhibition (**Figure 6**) (Sablayrolles et al.,
257 1993).

258 Despite this difference in the fermentation rate profile, the kinetics of volatile compound production,
259 accumulation and loss were not greatly modified and their chronology was unchanged. Remarkably,
260 between 100 and 180 h, the rates of volatile compound production, accumulation and loss changed
261 considerably, whereas the rate of CO_2 production remained almost constant. This observation confirms
262 that the stripping effect by CO_2 is not necessarily the main mechanism responsible for the losses of
263 volatile compounds.

264 Due to the temperature profile, the ratio of loss/production increased strongly throughout the
265 fermentation (**Figure 7**). Indeed, during the process, the continuous increase in temperature led to an
266 increase in k_i value, resulting in higher levels of volatile compound transfer from the liquid phase to
267 the gas phase.

268 3.2 *Effect of temperature*

269 The effect of temperature on the production of the volatile compounds studied was assessed by
270 running isothermal fermentations at different temperatures, using the same medium and yeast strain. In
271 these experiments, the differences in volatile compound concentrations between the final wines can
272 only be due to changes (i) in yeast metabolism (biological phenomenon) and/or (ii) the losses of
273 volatile compounds due to the increase in k_i with temperature (physical phenomenon). The

274 contribution of each mechanism was evaluated by determining the balance of production accumulation
1
2 275 and losses at the end of fermentation.
3
4

5 276 First, three fermentations in a synthetic medium at 18, 24 and 30°C (IF-18, IF-24 and IF-30-A) were
6
7 277 compared. Fermentations in a natural must were then run at 20 and 30°C (IF-20-D and IF-30-B). The
8
9 278 results are summarized in **Table 2**. Synthetic and natural media gave rise to contrasting situations, as
10
11 279 the final concentrations of isoamyl acetate, at 30°C, were very different, at 1.14 and 5.98 mg/L,
12
13 280 respectively. Nevertheless, both values are in the range of concentrations for this aroma compound in
14
15 281 wines.
16
17
18
19

20 282 In both media, isobutanol production increased with temperature, with a negligible proportion lost in
21
22 283 the gas (maximum loss = 1.06%). This increase in the final concentration of isobutanol as a function
23
24 284 of temperature is consistent with published data (Beltran et al., 2008; Llauro et al., 2002).
25
26
27

28 285 The behavior of esters as a function of temperature was completely different. The losses of the two
29
30 286 esters in the exhaust gas were never negligible, even at low temperature. Indeed, these losses reached
31
32 287 10% and 29% at 18°C in the synthetic medium for isoamyl acetate and ethyl hexanoate, respectively.
33
34

35 288 At 30°C, they accounted for up to 70% of the overall production of ethyl hexanoate in the natural
36
37 289 must. At the same temperature, losses were slightly lower (57%) in the synthetic medium. Similarly,
38
39 290 the losses of isoamyl acetate at 30°C accounted for 42% and 20% of the total amounts of this
40
41 291 compound produced in the must and the synthetic medium, respectively. The concentrations of the
42
43 292 two esters in the final wine were lower at 30°C, as previously reported by Molina et al. (2007) and
44
45 293 Beltran et al. (2008), due to both greater losses and lower levels of production at high temperature.
46
47
48

49 294 The magnitude of losses may have major consequences for interpretation of the results and our
50
51 295 understanding of the mechanisms involved. For example, for the natural must, (i) the final
52
53 296 concentration of ethyl hexanoate in the wine — which is usually the only information available — was
54
55 297 2.49 times higher at 20°C than at 30°C, whereas (ii) total production (concentration in the liquid +
56
57 298 amount lost in the gas) — which is more relevant in term of yeast physiology — increased by only
58
59
60
61
62
63
64
65

299 30% between 20 and 30°C. The same calculations for the synthetic must gave ratios of 2.15 and 1.35
1
2 300 between 18 and 30°C. It can be concluded that part of the effect of temperature is actually due to
3
4 301 changes in metabolism but that this effect may be highly overestimated when only the concentration in
5
6 302 the wine is taken into account.
7
8

10 303 **4. Conclusion**

11
12
13 304 The kinetics of isobutanol, isoamyl acetate and ethyl hexanoate synthesis were investigated during
14
15 305 winemaking fermentations, distinguishing between the amounts accumulating in the fermenting must
16
17 306 and losses in CO₂ exhaust gas. With the model developed by Morakul et al. (2011), it was possible to
18
19 307 determine gas – liquid balances for the three marker molecules of the higher alcohol and ester families
20
21 308 considered, by measuring the concentrations of these compounds in the gas phase, online.
22
23
24

25 309 No significant loss of isobutanol was observed at any temperature. By contrast, 56 % of ethyl
26
27 310 hexanoate and 34 % of isoamyl acetate produced were lost in the gas with a temperature profile
28
29 311 simulating red wine fermentation conditions. Even at a moderate temperature of 20°C, typical of white
30
31 312 wine fermentation conditions, the losses accounted for 40 % of the ethyl hexanoate and 21% of the
32
33 313 isoamyl acetate produced.
34
35
36

37
38 314 A comparison of fermentation runs with the same must and yeast strain at 20°C and 30°C clearly
39
40 315 demonstrated that (i) temperature influenced aroma synthesis by the yeast, as reported in previous
41
42 316 studies, but that (ii) this effect of temperature was highly overestimated for esters if only the
43
44 317 concentration in the liquid was taken into account. It is therefore essential to consider the gas/liquid
45
46 318 balance for aromas and changes in this balance during fermentation, to improve our understanding of
47
48 319 yeast metabolism and alcoholic fermentation. It would also be of interest to optimize temperature
49
50 320 control during fermentation. For example, the maximum rates of aroma losses occurred during the
51
52 321 second half of the fermentation, long after the maximum CO₂ production rate had been reached. This
53
54 322 phenomenon was amplified when the temperature increased during fermentation. Temperature
55
56 323 increases are very common in red wine production, to improve the extraction of polyphenolic
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 324 compounds. They are also used in white wine production, to speed up the end of fermentation. In the
2 325 future, optimal strategies could be developed, corresponding to compromises between the
3
4 326 minimization of aroma losses and the optimization of other parameters of technological value, such as
5
6 327 fermentation kinetics and maceration efficiency. Such strategies are very complex and further
7
8 328 advances are required in our understanding of the gas/liquid balances of many aroma compounds,
9
10 329 including (i) molecules present in very small concentrations but essential from an organoleptic point
11
12 330 of view (reviewed by Cheynier et al., 2010), such as specific thiols or dimethyl sulfide and (ii)
13
14 331 molecules with a negative impact, including certain sulfur compounds responsible for reductive
15
16 332 flavors. New advances will also be required for modeling and prediction of the effects of temperature
17
18 333 on metabolism, including, in particular, the aptitude of yeasts for the synthesis of aroma molecules.
19
20 334 Undoubtedly, optimization strategies including all these aspects constitute a long-term but very
21
22 335 promising perspective.
23
24
25
26

27 336 **Acknowledgments**

28
29
30
31 337 The research generating these results was funded by the European Community Seventh Framework
32
33 338 Program (FP7/2007-2013) under grant agreement CAFE n° KBBE-212754 ([http://www.cafe-](http://www.cafe-project.org)
34
35 339 [project.org](http://www.cafe-project.org)).
36
37
38
39 340
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

341 **References**

- 1
2 342 Beltran G, Novo M, Guillamon JM, Mas A & Rozes N (2008) Effect of fermentation temperature and
3
4 343 culture media on the yeast lipid composition and wine volatile compounds. *International*
5
6 344 *Journal of Food Microbiology*, 121(2), 169-177.
- 7
8 345 Bely M, Sablayrolles J-M & Barre P (1990) Description of alcoholic fermentation kinetics - its
9
10 346 variability and significance. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41(4), 319-324.
- 11
12 347 Cheynier V, Schneider R, Salmon J-M & Fulcrand H (2010) Chemistry of wine. In: Mander L & Lui
13
14 348 H-W (eds) *Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology* vol. 3, pp 1119-1172.
15
16 349 Elsevier, Oxford.
- 17
18 350 Cottrell THE, & Mc Lellan MR (1986) The effect of fermentation temperature on chemical and
19
20 351 sensory characteristics of wines from seven white grape cultivars grown in New York state.
21
22 352 *American Journal of Enology and Viticulture*, 37(3), 190-194.
- 23
24 353 Ferreira V, Pena C, Escudero A & Cacho J (1996) Losses of volatile compounds during fermentation.
25
26 354 *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung*, 202(4), 318-323.
- 27
28 355 Francis IL & Newton JL (2005) Determining wine aroma from compositional data. *Australian Journal*
29
30 356 *of Grape and Wine Research*, 11(2), 114-126.
- 31
32 357 Killian E & Ough CS (1979) Fermentation esters - formation and retention as affected by fermentation
33
34 358 temperature. *American Journal of Enology and Viticulture*, 30, 301-305.
- 35
36 359 Llauro J, Rozes N, Bobet R, Mas A & Constanti M (2002) Low temperature alcoholic fermentations
37
38 360 in high sugar concentration grape musts. *Journal of Food Science*, 67(1), 268-273.
- 39
40 361 Molina AM, Swiegers JH, Varela C, Pretorius IS & Agosin E (2007) Influence of wine fermentation
41
42 362 temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds. *Applied*
43
44 363 *Microbiology and Biotechnology*, 77(3), 675-687.
- 45
46 364 Morakul S, Athes V, Mouret J-R & Sablayrolles J-M (2010) Comprehensive study of the evolution of
47
48 365 gas-liquid partitioning of aroma compounds during wine alcoholic fermentation. *Journal of*
49
50 366 *Agricultural and Food Chemistry*, 58(18), 10219-10225.
- 51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 367 Morakul S, Mouret J-R, Nicolle P, Trelea IC, Sablayrolles J-M & Athes V (2011) Modelling of the
1 gas-liquid partitioning of aroma compounds during wine alcoholic fermentation and
2 368
3 prediction of aroma losses. *Process Biochemistry*, 46, 1125-1131.
4 369
5
- 6 370 Mouret J-R, Nicolle P, Angenieux M, Aguera E, Perez M & Sablayrolles J-M (2010) On-line
7
8 371 measurement of 'quality markers' during winemaking fermentation. In: *International Intervitis*
9
10 *Interfructa Congress*, Stuttgart, Germany.
11 372
12
- 13 373 Robinson AL, Ebeler SE, Heymann H, Boss PK, Solomon PS & Trengove RD (2009) Interactions
14
15 374 between wine volatile compounds and grape and wine matrix components influence aroma
16
17 375 compound headspace partitioning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(21),
18
19 376 10313-10322.
20
21
- 22 377 Sablayrolles J-M & Barre P (1993) Kinetics of alcoholic fermentation under anisothermal enological
23
24 378 conditions. 1. Influence of temperature evolution on the instantaneous rate of fermentation.
25
26 379 *American Journal of Enology and Viticulture*, 44(2), 127-133.
27
28
- 29 380 Sumby KM, Grbin PR & Jiranek V (2010) Microbial modulation of aromatic esters in wine: current
30
31 381 knowledge and future prospects. *Food Chemistry*, 121(1), 1-16.
32
- 33 382 Swiegers JH, Bartowsky EJ, Henschke PA & Pretorius IS (2005) Yeast and bacterial modulation of
34
35 383 wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 139-173.
36
37
- 38 384 Torija MJ, Beltran G, Novo M, Poblet M, Guillamon JM, Mas A & Rozes N (2003) Effects of
39
40 385 fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and
41
42 386 presence of volatile compounds in wine. *International Journal of Food Microbiology*, 85(1-2),
43
44 387 127-136.
45
- 46 388 Tsachaki M, Gady A-L, Kalopesas M, Linforth RST, Athès V, Marin M & Taylor AJ (2008) Effect of
47
48 389 ethanol, temperature, and gas flow rate on volatile release from aqueous solutions under
49
50 390 dynamic headspace dilution conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(13),
51
52 391 5308-5315.
53
54
- 55 392 Tsachaki M, Linforth RST & Taylor AJ (2009) Aroma release from wines under dynamic conditions.
56
57 393 *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(15), 6976-6981.
58
59
60 394
61
62
63
64
65

395 **Figure captions**

1
2 396 **Figure 1.** Changes in the rate of CO₂ production (...), total production (×), loss of the compound in
3
4 397 the gas phase (+), final concentration in the liquid phase estimated (—) and measured (○) during
5
6 398 fermentation at 20°C.
7
8
9

10 399 **Figure 2.** Reproducibility of the rate of volatile compound (isoamyl acetate) loss in stripping gas
11
12 400 (mg/L of must.h) from 3 isothermal fermentations at 20°C.
13
14
15

16 401 **Figure 3.** Changes in the rates of CO₂ production (...), volatile compound production (×) and volatile
17
18 402 compound accumulation in the liquid phase (○) and of volatile compound loss (+) during fermentation
19
20 403 at 20°C.
21
22
23

24 404 **Figure 4.** Changes in the ratio of loss rate/production rate during fermentation. Isothermal
25
26 405 fermentation at 20°C. (×), isoamyl acetate and (Δ), ethyl hexanoate. ↑: End of the accumulation phase.
27
28
29

30 406 **Figure 5.** CO₂ production rate (...), total production (×), loss of compound in the gas phase (+), final
31
32 407 concentration in the liquid phase estimated (—) and measured (○) as a function of fermentation time,
33
34 408 during an anisothermal fermentation under controlled temperature, from 15-30°C.
35
36
37

38 409 **Figure 6.** Changes in the rates of CO₂ production (...), volatile compound production, volatile
39
40 410 compound accumulation in the liquid phase (○) (×) and volatile compound loss (+) during an
41
42 411 anisothermal fermentation at controlled temperature, from 15-30°C.
43
44
45

46 412 **Figure 7.** Changes in the ratio of loss rate/production in an anisothermal fermentation at controlled
47
48 413 temperature, from 15-30°C. (×), isoamyl acetate and (Δ), ethyl hexanoate. ↑: End of the accumulation
49
50 414 phase.
51
52
53

54 415
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

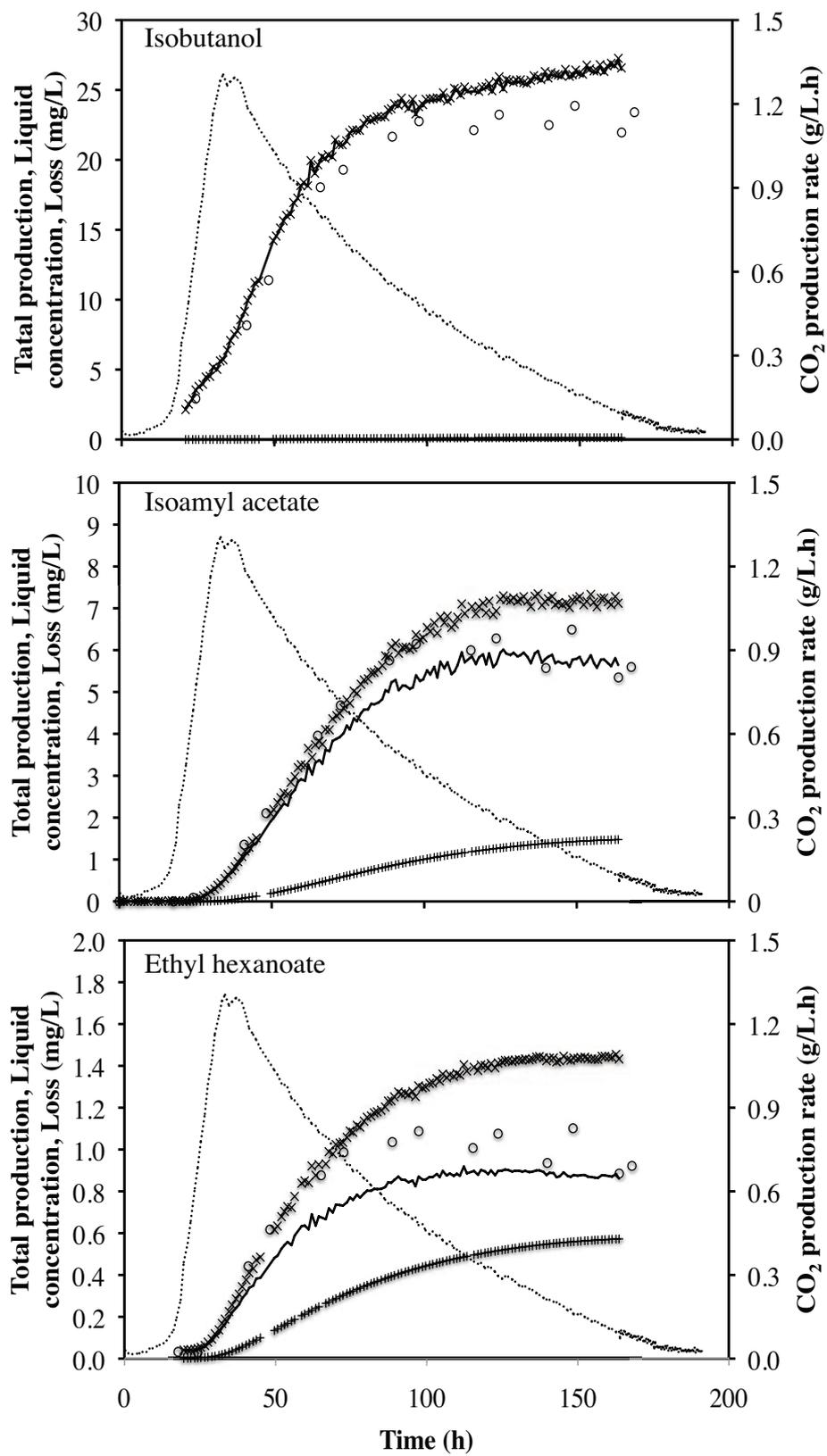


Figure 1

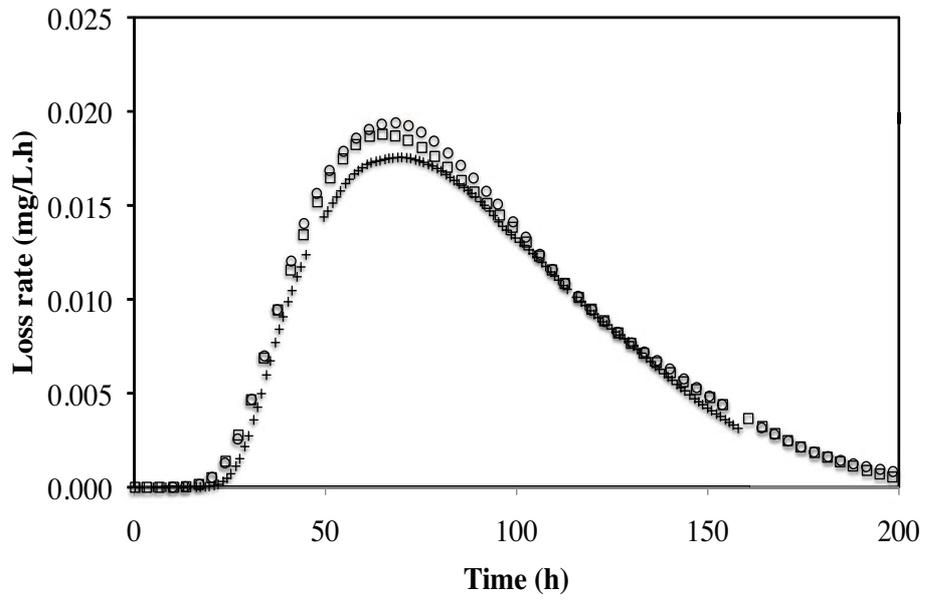


Figure 2

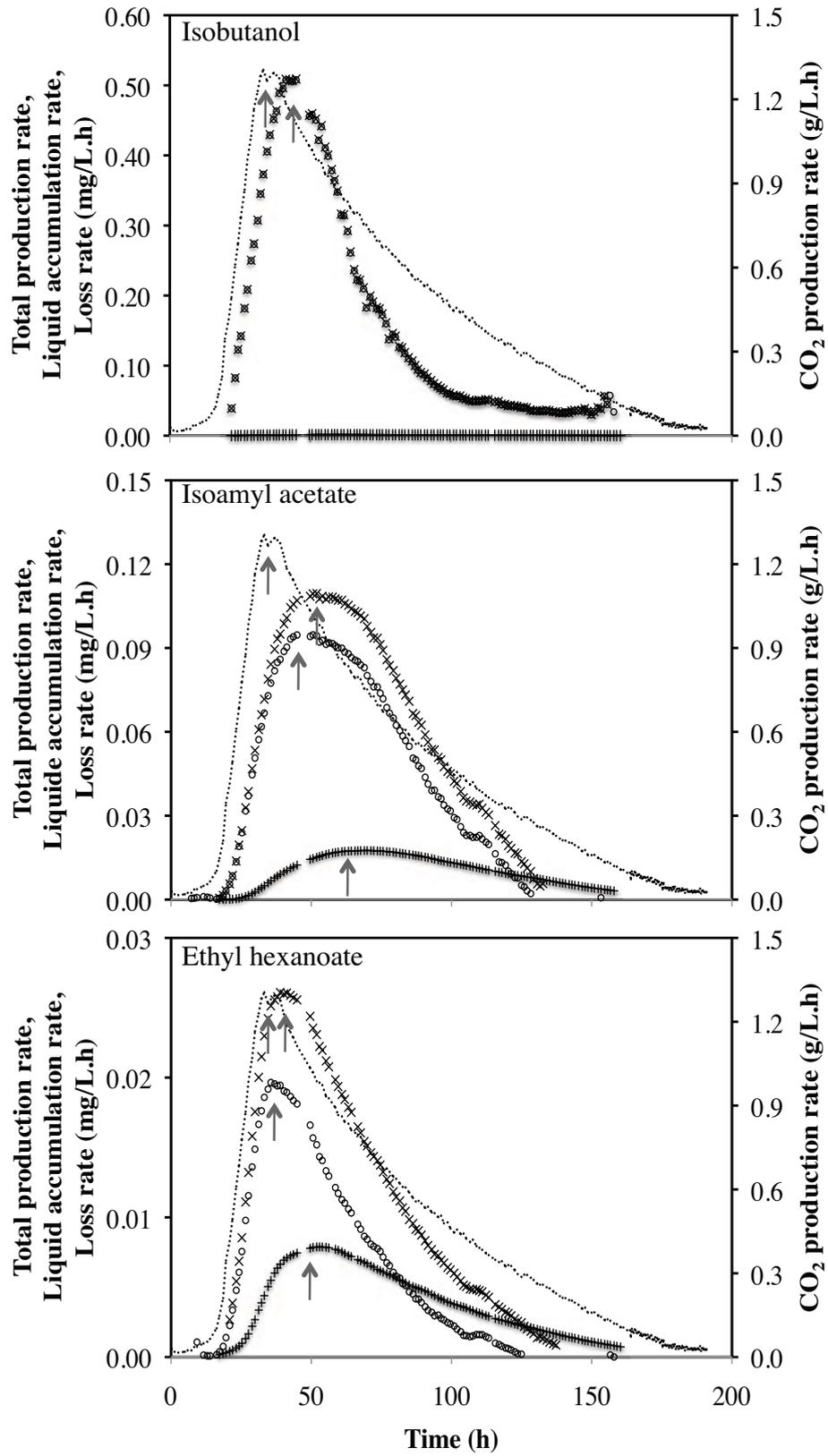


Figure 3

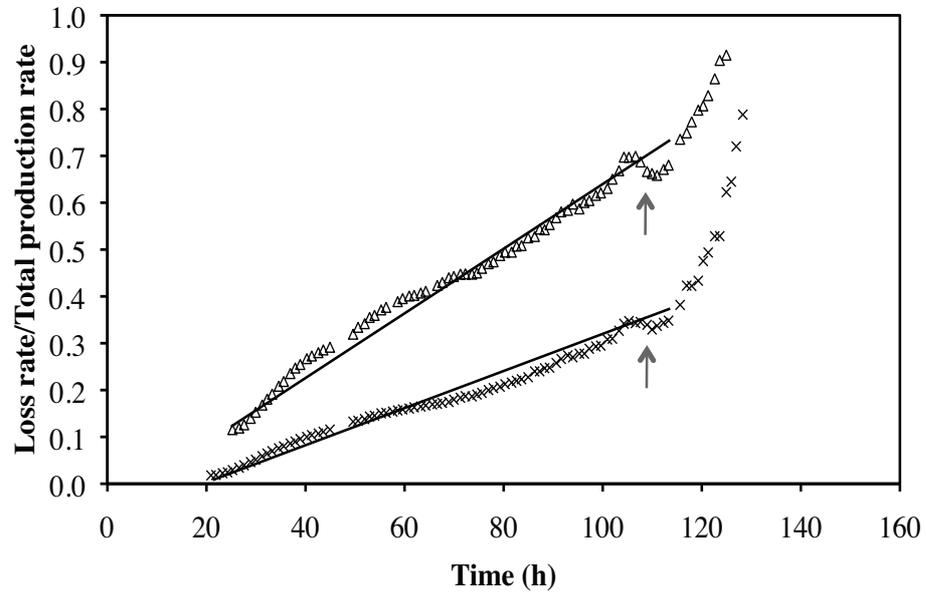


Figure 4

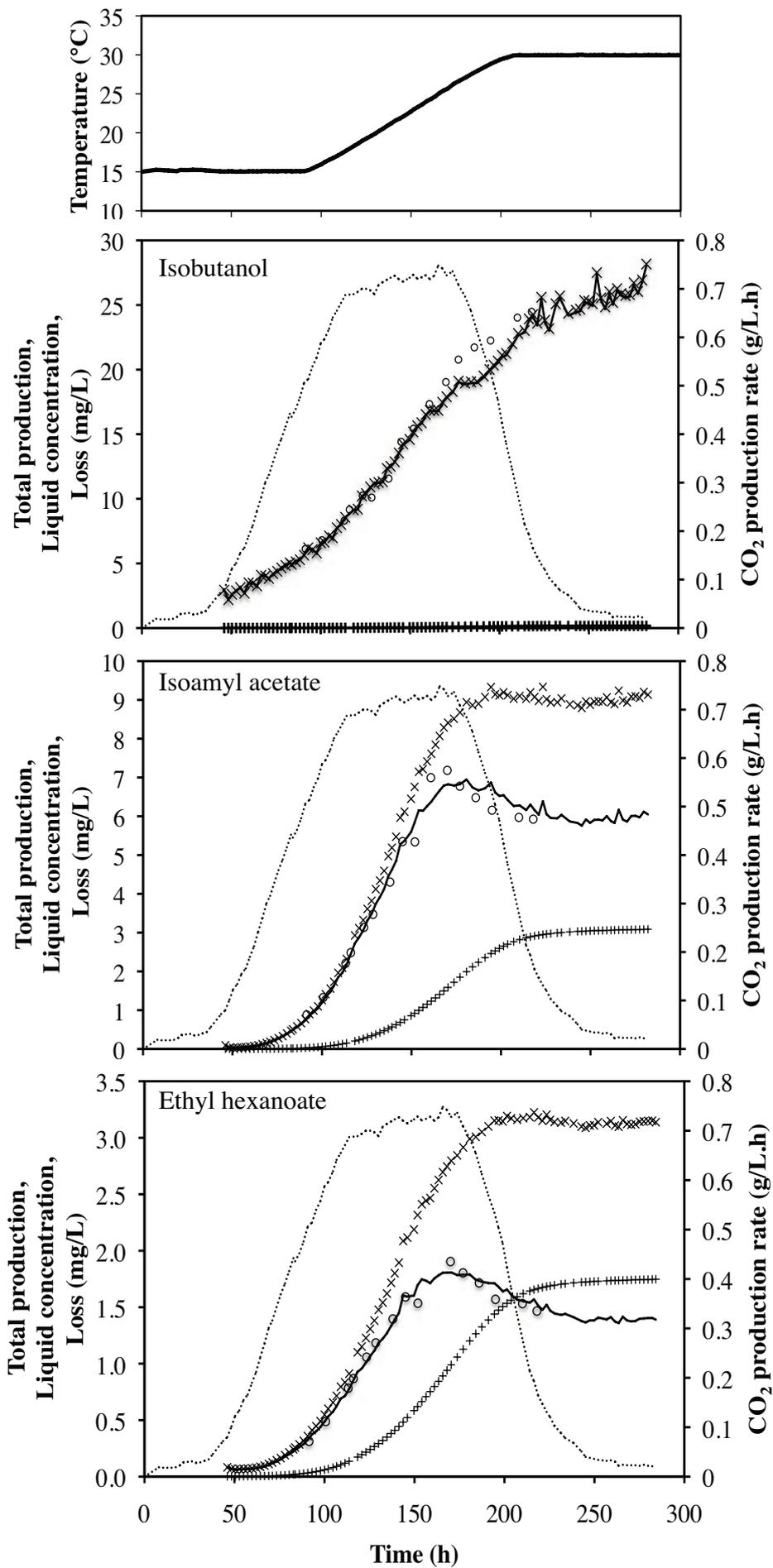


Figure 5

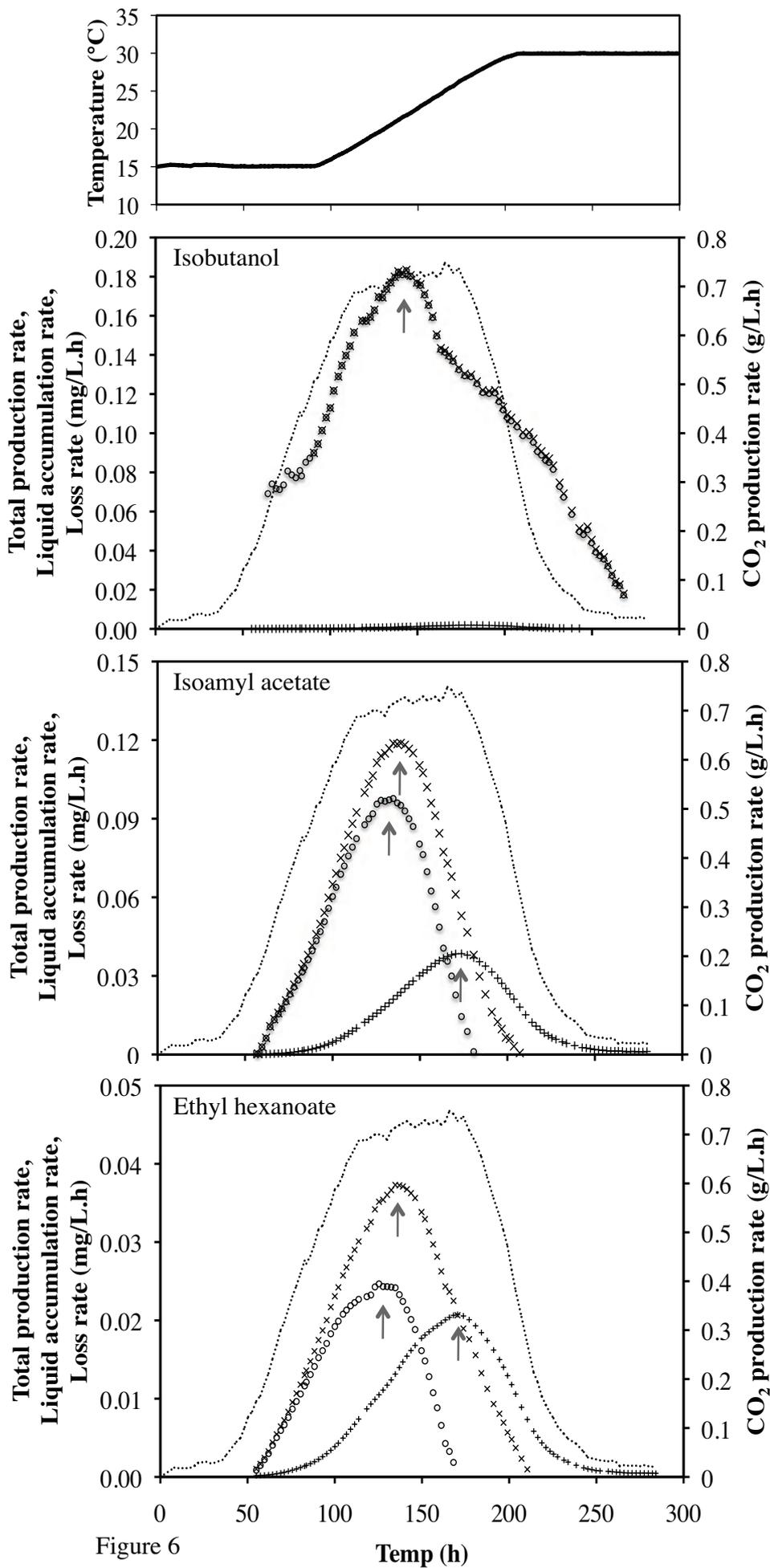


Figure 6

Temp (h)

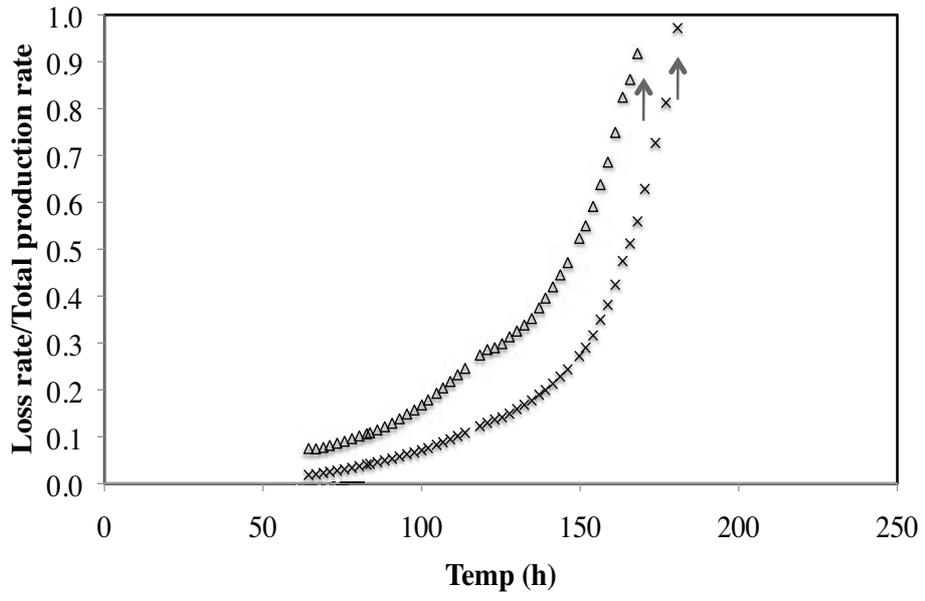


Figure 7

Table1[Click here to download Table: Sablayrolles_Table1.doc](#)**Table 1.** Experimental conditions for the fermentation trials

Experiment	Must	Initial assimilable nitrogen (mg/L)	Initial sugar concentration (g/L)	Regulated temperature (°C)	Fermentor size (L)
Isothermal fermentations (IF)					
IF-20-A	Maccabeu	243	174	20	100
IF-20-B	Maccabeu	243	174	20	100
IF-20-C	Maccabeu	243	174	20	100
IF-18	Synthetic must	250	180	18	10
IF-24	Synthetic must	250	180	24	10
IF-30-A	Synthetic must	250	180	30	10
IF-20-D	Chardonnay	240	195	20	100
IF-30-B	Chardonnay	240	195	30	100
Anisothermal fermentations (AF) ^a					
AF-15-30	Mixed grape juices	140	180	15 to 30	100

^aThe fermentation temperature was increased by 0.2°C per g/L of CO₂ produced to simulate the changes in temperature in unregulated industrial tanks (Sablayrolles & Barre, 1993)

Table 2. Total volatile compound production, final concentration in wine and total volatile compound loss into the headspace gas for various fermentation musts and temperatures. SM refers to synthetic medium, NM is natural medium (grape juice).

Compounds /Fermentation trials	Total production (mg/L)	Final concentration in wine (mg/L)	Relative losses (%)
Isobutanol			
IF-18 (SM)	35.0	34.9	0.25
IF-24 (SM)	58.3	58.0	0.46
IF-30-A (SM)	80.4	80.0	0.59
IF-20-D (NM)	26.3	26.2	0.55
IF-30-B (NM)	28.2	27.9	1.33
Isoamylacetate			
IF-18 (SM)	1.08	0.97	10.3
IF-24 (SM)	1.39	1.11	20.4
IF-30-A (SM)	1.44	1.14	20.4
IF-20-D (NM)	15.1	11.3	24.7
IF-30-B (NM)	10.3	5.98	41.9
Ethylhexanoate			
IF-18 (SM)	0.72	0.51	29.2
IF-24 (SM)	0.61	0.32	47.8
IF-30-A (SM)	0.54	0.24	56.0
IF-20-D (NM)	1.59	0.92	42.5
IF-30-B (NM)	1.22	0.37	69.4

Conclusion générale

Ce travail avait pour objectif d'étudier et modéliser la relation entre la composition de la phase gaz (CO₂ dégagé par la fermentation) et celle de la phase liquide au cours des fermentations œnologiques et ainsi de réaliser des bilans complets de production des composés aromatiques, en différenciant la production totale, qui est le reflet du métabolisme levurien, de la quantité restant dans la phase liquide, qui est l'information la plus pertinente d'un point de vue technologique. Ce questionnement a été abordé en focalisant notre attention sur 5 composés aromatiques parmi les plus abondants dans le vin et pouvant être considérés comme des marqueurs de différentes familles chimiques : alcools supérieurs (isobutanol, alcool isoamylique), esters d'acétate (acétate d'éthyle, acétate d'isoamyle) et esters d'éthyle (hexanoate d'éthyle).

Chapitre 1

Nous avons tout d'abord étudié le coefficient de partage (k_i) de ces 5 molécules, en utilisant la méthode PRV (Phase Ratio Variation), en conditions modèles, c'est à dire dans des milieux synthétiques dont la composition mimait des moûts en cours de fermentation alcoolique. Il est à noter que si ces molécules avaient déjà fait l'objet de travaux de ce type, il n'existait pas de résultats utilisables dans ces conditions. Après avoir vérifié que les résultats étaient effectivement représentatifs de ceux obtenus en utilisant des moûts naturels, nous avons déterminé l'impact des principaux paramètres de fermentation sur la valeur de k_i .

Effet des concentrations en glucose et en éthanol. La présence de 220 g/L de glucose dans la solution augmente de façon très importante la valeur du coefficient de partage pour l'ensemble des composés étudiés, de 27% pour l'isobutanol à 62% pour l'acétate d'éthyle. Ceci correspond à un effet de 'salting out' du glucose et du fructose qui diminuent l'activité de l'eau et, par conséquent la solubilité des molécules aromatiques (Nahon et al. 1998). A l'inverse, la présence de 13% d'éthanol diminue fortement les valeurs de k_i (jusqu'à 50% de baisse pour l'hexanoate d'éthyle et l'alcool isoamylique), avant tout à cause d'une augmentation de la solubilité des composés aromatiques dans les solutions alcooliques.

Effet de la température. Nous avons déterminé les enthalpies de vaporisation des composés volatils dans le milieu de fermentation dans la gamme de température d'intérêt œnologique, c'est à dire entre 15 et 30°C. Les résultats obtenus montrent que cette enthalpie de vaporisation est supérieure en début de fermentation. Ce phénomène peut-être dû à des interactions chimiques plus fortes entre les molécules aromatiques et le sucre. Mais il semble plus vraisemblable que les différences observées ne soient pas significatives mais dues à la sensibilité de la méthode d'analyse utilisée pour mesurer les enthalpies de vaporisation. En particulier, pour les composés peu volatils, il est difficile de déterminer avec précision la pente de la droite $\ln(K_i) = f(1/T)$ (qui correspond à ΔH_{vap}) car le K_i varie peu pour ces composés.

Effet du CO₂. Nous avons tout d'abord montré qu'il n'y avait pas de différences significatives entre des coefficients de partage mesurés en présence de CO₂ (conditions œnologiques) ou d'air (conditions habituellement utilisées pour les mesures de k_i). Nous avons ensuite étudié l'impact du dégagement de CO₂ (dCO₂/dt), qui constitue une des caractéristiques importantes des fermentations alcooliques. Il peut en effet atteindre des valeurs élevées, parfois supérieures à 1 litre par heure et par litre de milieu. De plus, dans les conditions habituelles, sa valeur évolue tout au long de la fermentation. Pour nous affranchir de ces variations de dCO₂/dt, nous avons utilisé une approche originale, basée sur la mise en œuvre de fermentations conduites à vitesse constante grâce à des ajouts contrôlés d'azote ammoniacal. En jouant sur la concentration initiale en azote assimilable, il a été ainsi possible d'obtenir, pour une même température, différents niveaux de dCO₂/dt (0.3 et 0.6 g/L.h). Ces fermentations ont permis de montrer que **le ratio gaz/liquide était identique quelle que soit la vitesse de dégagement de CO₂**.

Chapitre 2

Après avoir étalonné le dosage des composés aromatiques dans la phase gaz, nous avons montré que non seulement les ratios de concentration entre les phases gaz et liquide, correspondant à k_i, évoluaient de façon indépendante de la vitesse de fermentation mais aussi que ces ratios étaient dans l'ordre de grandeur de ceux mesurés par la méthode PRV, c'est à dire en absence totale de dégagement de CO₂. Ce résultat, qui est tout à fait cohérent avec l'analyse théorique faite à partir des équations de transfert de matière, a confirmé l'absence d'effet de dCO₂/dt sur l'équilibre entre les deux phases et servi de préalable à notre démarche de modélisation de l'évolution du coefficient de partage en cours de fermentation.

Le modèle a été construit en considérant l'effet des concentrations en sucre et en éthanol, ainsi que celui de la température, y compris en conditions non isothermes qui sont courantes en conditions œnologiques. Sa formulation finale est de la forme :

$$\ln k_i = F1 + F2 \times E - \frac{F3 + F4 \times E}{R} \left(\frac{1000}{T} - \frac{1000}{T_{ref}} \right)$$

avec T : température, T_{ref} : 293 K (20°C) et F1, F2, F3 et F4 sont des constantes dont la valeur est spécifique à chaque composé volatil. F1 est le logarithme du coefficient de partage (lnk_i) à la température de référence dans le moût initial (E = 0). F2 représente la sensibilité du coefficient de partage à la composition du milieu de fermentation à la température de référence. F3 correspond à la valeur de ΔH_{vap} dans le moût initial (E = 0) ; ΔH_{vap}, enthalpie de vaporisation reflète la sensibilité du k_i aux changements de température. F4 représente la sensibilité de ΔH_{vap} aux changements de composition du milieu, décrite dans notre cas par la concentration en éthanol

Ce modèle a permis une très bonne estimation de k_i , avec une erreur inférieure à 10%, pour l'isobutanol, l'acétate d'isoamyl et l'hexanoate d'éthyle. Il a dès lors été possible d'établir des bilans de production de ces composés et ainsi de montrer que, **si les pertes dans la phase gaz sont négligeables dans le cas de l'isobutanol, elles représentent une proportion importante de la production totale pour les esters.** A 20°C, elles sont, en effet de 44 % et 25 % pour l'hexanoate d'éthyle et l'acétate d'isoamyle.

Les pertes d'esters en cours de fermentation devraient donc être prises en compte aussi bien (i) pour quantifier leurs voies métaboliques, qui sont essentielles dans le métabolisme azoté (alcools supérieurs, esters d'acétate) et lipidique (esters d'éthyle) de la levure que (ii) pour rechercher des profils de température, visant à obtenir le meilleur compromis entre cinétique de fermentation et maintien des pertes à un niveau acceptable.

Chapitre 3

Dans le dernier chapitre, grâce à la combinaison du suivi en ligne des composés volatils dans la phase gaz et l'utilisation du modèle de prédiction de k_i , nous avons pu calculer les cinétiques de production et de perte au cours de fermentations menées avec des régimes de température représentatifs de vinifications en blanc (isotherme à 20 °C) et en rouge (non isothermie avec une température initiale de 15°C et une température finale de 30°C). Le dispositif utilisé a permis de calculer ces vitesses de façon très précise et reproductible. Il a notamment permis de mettre en évidence le fait que les vitesses maximales de production et de perte ne sont pas synchronisées, la vitesse maximale de perte étant observée de façon plus tardive. Ces vitesses maximales sont aussi découplées de dCO_2/dt_{max} qui intervient très tôt, alors que moins du ¼ du sucre a été fermenté. Si la chronologie est toujours la même, le découplage entre ces différentes vitesses est plus ou moins marqué suivant le composé considéré et le régime de température. Ces considérations devraient aussi être intégrées dans la recherche de profils optimaux de la température.

Nous nous sommes ensuite attachés à répondre à la question suivante : 'l'effet de la température sur les concentrations finales en esters dans les vins est-il avant tout imputable à des phénomènes microbiologiques (impact de la température sur le métabolisme levurien) ou à des mécanismes physico-chimiques (impact de la température sur les pertes dans la phase gaz)'? Pour cela, nous avons comparé des fermentations réalisées à des températures différentes, avec le même milieu et la même souche de levure. Les résultats indiquent clairement que les deux mécanismes sont impliqués. Par exemple, avec le mout naturel la concentration finale en hexanoate d'éthyle était 2,49 fois plus élevée à 20°C qu'à 30°C, alors que la production totale (prenant aussi en compte les pertes) n'était augmentée que de 30%. Ainsi, **si l'on ne prend en compte que les concentrations dans la phase**

liquide, qui sont généralement les seules informations disponibles, on peut fortement surestimer l'impact de la température sur le métabolisme de composés fortement volatils, tels que les esters.

Perspectives

Ce travail, qui met en évidence l'importance de la réalisation de bilans de production de composés d'arôme au cours de la fermentation œnologique, ouvre de nombreuses perspectives.

Etude des coefficients de partage des principaux composés aromatiques. De nombreux autres composés sont susceptibles d'influencer l'arôme des vins soit positivement, soit négativement. Il est probable que la méthodologie utilisée dans notre travail soit utilisable pour certains d'entre eux, principalement (i) ceux qui ont des caractéristiques physico chimiques voisines des alcools supérieurs et des esters et/ou (ii) ceux qui sont présents à des concentrations comparables (quelques mg/L). Par contre, il est aussi fortement probable que notre approche ne soit pas directement utilisable dans le cas de composés extrêmement volatils (exemple du H₂S) ou dont les concentrations sont extrêmement basses, par exemple la 4 mercapto methyl pentanone, marqueur important du 'caractère Sauvignon', qui a un seuil de perception de l'ordre du ng/L et dont la concentration maximale est de quelques dizaines de ng/L.

Modélisation de la production de composés secondaire par la levure. Ce travail a permis de modéliser les phénomènes physico-chimiques régissant la répartition entre les phases gaz et liquide de molécules d'intérêt mais il ne permet en aucun cas de prédire la synthèse de ces composés en fonction des conditions opératoires (composition azotée du milieu, température, souche de levure...). Il s'agit là d'une problématique déjà abordée pour d'autres sous – produits de la fermentation mais (Sainz et al. 2003) qui demeure complexe et ne peut être traitée que sur le moyen-long terme. Elle débute actuellement dans différents laboratoires, dont l'UMR Sciences pour l'œnologie où elle est abordée en combinant différentes approches pour mieux comprendre et modéliser le métabolisme des alcools supérieurs et esters : traçage métabolique, suivi en ligne (avec estimation des vitesses spécifiques de production proportionnelles à des flux métaboliques), modélisation de flux métaboliques...

Stratégies de conduite optimisée de la fermentation. La possibilité de coupler au suivi en ligne de la cinétique fermentaire un suivi en ligne de l'évolution de la concentration en molécules marqueurs et l'estimation en temps réel des pertes de ces molécules dans le gaz effluent ouvre un champ très vaste de perspectives en terme de pilotage des fermentations. Ce pilotage pourrait se traduire par un asservissement du contrôle de la fermentation (changement de la température de consigne, ajouts de nutriments...) à la production de ces molécules, de sorte à se rapprocher le plus possible d'une gamme de concentrations considérées comme optimale pour un type de vin recherché. La problématique est très complexe car elle implique d'améliorer les connaissances sur la synthèse de ces molécules, leur

impact effectif sur les caractéristiques du produit et l'effet des différentes variables opératoires. Il s'agit aussi de résoudre une question très complexe en terme d'optimisation car elle implique de maximiser la production de molécules d'intérêt et de minimiser celle de molécules indésirables. Il est à noter qu'à moyen-long terme, cette approche devrait se rapprocher de celle relative à la modélisation (paragraphe précédent) pour ajouter un caractère prédictif à ce contrôle.

Ainsi, la problématique de la synthèse d'arômes fermentaires en œnologie pose encore de nombreuses questions d'ordre physico chimique, microbiologique et technologique mais ce travail constitue d'ores et déjà une contribution significative dans la mesure où il fournit à la fois des résultats d'intérêt pratique (estimation des pertes en esters) et des outils pour appréhender de nouvelles avancées.

Références

- Aguera, E., M. Bes, A. Roy, C. Camarasa & J.-M. Sablayrolles. (2010). Partial removal of ethanol during fermentation to obtain reduced-alcohol wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **61**, 53-60.
- Aguera, E., C. Picou, M. Perez & J. M. Sablayrolles. (2005). Pilot scale vinifications (100 L). I. The controlled fermentations facility at the INRA in Pech Rouge. *Vinidea.net, Wine Internet Technical Journal # 4*.
- Alessi, P., M. Fermeglia & I. Kikic. (1991). Significance of dilute regions. *Fluid Phase Equilibria*, **70**, 239-250.
- Ansanay-Galeote, V., B. Blondin, S. Dequin & J.-M. Sablayrolles. (2001). Stress effect of ethanol on fermentation kinetics by stationary-phase cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, **23**, 677-681.
- Aprèa, E., F. Biasioli, T. D. Märk & F. Gasperi. (2007). PTR-MS study of esters in water and water/ethanol solutions: Fragmentation patterns and partition coefficients. *International Journal of Mass Spectrometry*, **262**, 114-121.
- Athes, V., P. Paricaud, M. Ellaite, I. Souchon & W. Fürst. (2008). Vapour-liquid equilibria of aroma compounds in hydroalcoholic solutions: Measurements with a recirculation method and modelling with the NRTL and COSMO-SAC approaches. *Fluid Phase Equilibria*, **265**, 139-154.
- Athès, V., M. Pena y Lillo, C. Bernard, R. Perez-Correa & I. Souchon. (2004). Comparison of experimental methods for measuring infinite dilution volatilities of aroma compounds in water/ethanol mixtures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 2021-2027.
- Atlan, S. (2007). Modélisation de la libération des composés d'arôme à partir de matrices alimentaires dans des systèmes expérimentaux et en bouche : détermination des propriétés et mécanismes de transfert de matière, Thèse AgroParisTech.
- Atlan, S., I. C. Trelea, A. Saint-Eve, I. Souchon & E. Latrille. (2006). Processing gas chromatographic data and confidence interval calculation for partition coefficients determined by the phase ratio variation method. *Journal of Chromatography. A*, **1110**, 146-155.
- Aznar, M., M. Tsachaki, R. S. T. Linforth, V. Ferreira & A. J. Taylor. (2004). Headspace analysis of volatile organic compounds from ethanolic systems by direct APCI-MS. *International Journal of Mass Spectrometry*, **239**, 17-25.
- Banavara, D. S., S. Rabe, U. Krings & R. G. Berger. (2002). Modeling dynamic flavor release from water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 6448-6452.
- Bataillon, M., A. Rico, J. M. Sablayrolles, J. M. Salmon & P. Barre. (1996). Early thiamin assimilation by yeasts under enological conditions: Impact on alcoholic fermentation kinetics. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **82**, 145-150.
- Bell, S. J. & P. A. Henschke. (2005). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **11**, 242-295.

- Beltran, G., M. Novo, J. M. Guillamon, A. Mas & N. Rozes. (2008). Effect of fermentation temperature and culture media on the yeast lipid composition and wine volatile compounds. *International Journal of Food Microbiology*, **121**, 169-177.
- Beltran, G., M. Novo, V. Leberre, S. Sokol, D. Labourdette, J. M. Guillamon, A. Mas, J. Francois & N. Rozes. (2006). Integration of transcriptomic and metabolic analyses for understanding the global responses of low-temperature winemaking fermentations. *Fems Yeast Research*, **6**, 1167-1183.
- Bely, M., J.-M. Sablayrolles & P. Barre. (1990a). Description of alcoholic fermentation kinetics - its variability and significance. *American Journal of Enology and Viticulture*, **41**, 319-324.
- Bely, M., J.-M. Sablayrolles & P. Barre. (1990b). Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **70**, 246-252.
- Birch, R. M., M. Ciani & G. M. Walker. (2003). Magnesium, calcium and fermentative metabolism in wine yeasts. *Journal of Wine Research*, **14**, 3-15.
- Blateyron, L. & J. M. Sablayrolles. (2001). Stuck and slow fermentations in enology: Statistical study of causes and effectiveness of combined additions of oxygen and diammonium phosphate. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **91**, 184-189.
- Buck, K. K. S., N. I. Gerhardt, S. R. Dungan & R. J. Phillips. (2001). The effect of solute concentration on equilibrium partitioning in polymeric gels. *Journal of Colloid and Interface Science*, **234**, 400-409.
- Buescher, W. A., C. E. Siler, J. R. Morris, R. T. Threlfall, G. L. Main & G. C. Cone. (2001). High alcohol wine production from grape juice concentrates. *American Journal of Enology and Viticulture*, **52**, 345-351.
- Butler, J. A. V. & C. N. Ramchandani. (1935). The solubility of non-electrolytes. Part II. The influence of the polar group on the free energy of hydration of aliphatic compounds. *Journal of the Chemical Society*, 952-955.
- Butler, J. A. V., C. N. Ramchandani & D. W. Thompson. (1935). The solubility of non-electrolytes. Part I. The free energy of hydration of some aliphatic alcohols. *Journal of the Chemical Society*, 280-285.
- Buttery, R. G., L. C. Ling & D. G. Guadagni. (1969). Volatilities of aldehydes, ketones, and esters in dilute water solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **17**, 385-389.
- Chaintreau, A., A. Grade & R. Munozbox. (1995). Determination of partition-coefficients and quantitation of headspace volatile compounds. *Analytical Chemistry*, **67**, 3300-3304.
- Charnomordic, B., R. David, D. Dochain, N. Hilgert, J.-R. Mouret, J.-M. Sablayrolles & A. Vande Wouwer. (2010). Two modelling approaches of winemaking: first principle and metabolic engineering. *Mathematical and Computer Modelling of Dynamical Systems*, **16**, 535 - 553.

- Cheyrier, V., R. Schneider, J.-M. Salmon & H. Fulcrand. (2010). Chemistry of wine. In L. Mander & H.-W. Lui (Eds.), *Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology*. Elsevier: Oxford.
- Colombie, S., S. Malherbe & J. M. Sablayrolles. (2005). Modeling alcoholic fermentation in enological conditions: Feasibility and interest. *American Journal of Enology and Viticulture*, **56**, 238-245.
- Conner, J. M., L. Birkmyre, A. Paterson & J. R. Piggott. (1998). Headspace concentrations of ethyl esters at different alcoholic strengths. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **77**, 121-126.
- Conner, J. M., A. Paterson & J. R. Piggott. (1994). Interactions between ethyl esters and aroma compounds in model spirit solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **42**, 2231-2234.
- Cottrell, T. H. E. & M. R. Mc Lellan. (1986). The effect of fermentation temperature on chemical and sensory characteristics of wines from seven white grape cultivars grown in New York state. *American Journal of Enology and Viticulture*, **37**, 190-194.
- Covarrubias-Cervantes, M., S. Bongard, D. Champion & A. Voilley. (2005). Effects of the nature and concentration of substrates in aqueous solutions on the solubility of aroma compounds. *Flavour and Fragrance Journal*, **20**, 265-273.
- D'Angelo, M., G. Onori & A. Santucci. (1994). Self-association of monohydric alcohols in water: Compressibility and infrared absorption measurements. *The Journal of Chemical Physics*, **100**, 3107-3113.
- Dean, J. A. (1999). *Lange's Handbook of Chemistry*. McGraw-Hill Handbooks: New York.
- Dufour, C. & C. L. Bayonove. (1999a). Influence of wine structurally different polysaccharides on the volatility of aroma substances in a model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 671-677.
- Dufour, C. & C. L. Bayonove. (1999b). Interactions between wine polyphenols and aroma substances. An insight at the molecular level. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 678-684.
- Duhem, P. & J. Vidal. (1978). Extension of the dilution method to measurements of high activity coefficients at infinite dilution. *Fluid Phase Equilibria*, **2**, 231-235.
- Eckert, C. A. & S. R. Sherman. (1996). Measurement and prediction of limiting activity coefficients. *Fluid Phase Equilibria*, **116**, 333-342.
- El Haloui, N., D. Picque & G. Corrieu. (1988). Alcoholic fermentation in winemaking: On-line measurement of density and carbon dioxide evolution. *Journal of Food Engineering*, **8**, 17-30.
- Escalona, H., J. R. Piggott, J. M. Conner & A. Paterson. (1999). Effect of ethanol strength on the volatility of higher alcohols and aldehydes. *Italian Journal of Food Science*, **11**, 241-248.

- Ettre, L., C. Welter & B. Kolb. (1993). Determination of gas-liquid partition coefficients by automatic equilibrium headspace-gas chromatography utilizing the phase ratio variation method. *Chromatographia*, **35**, 73-84.
- Ferreira, V., C. Pena, A. Escudero & J. Cacho. (1996). Losses of volatile compounds during fermentation. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung*, **202**, 318-323.
- Francis, I. L. & J. L. Newton. (2005). Determining wine aroma from compositional data. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **11**, 114-126.
- Friel, E. N., R. S. T. Linforth & A. J. Taylor. (2000). An empirical model to predict the headspace concentration of volatile compounds above solutions containing sucrose. *Food Chemistry*, **71**, 309-317.
- Gee, D. A. & W. F. Ramirez. (1994). A flavour model for beer fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, **100**, 321-329.
- Gosset, J. M. (1987). Measurement of henrys law constants for C1 and C2 chlorinated hydrocarbons. *Environmental Science & Technology*, **21**, 202-208.
- Hine, J. & P. K. Mookerjee. (1975). Structural effects on rates and equilibria. XIX. Intrinsic hydrophilic character of organic compounds. Correlations in terms of structural contributions. *The Journal of Organic Chemistry*, **40**, 292-298.
- Jouenne, E. & J. Crouzet. (2000). Effect of pH on retention of aroma compounds by beta-lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 1273-1277.
- Jouquand, C., V. Ducruet & P. Giampaoli. (2004). Partition coefficients of aroma compounds in polysaccharide solutions by the phase ratio variation method. *Food Chemistry*, **85**, 467-474.
- Julien, A., J. L. Roustan, L. Dulau & J. M. Sablayrolles. (2000). Comparison of nitrogen and oxygen demands of enological yeasts: Technological consequences. *American Journal of Enology and Viticulture*, **51**, 215-222.
- Karl, T., C. Yeretzian, A. Jordan & W. Lindinger. (2003). Dynamic measurements of partition coefficients using proton-transfer-reaction mass spectrometry (PTR-MS). *International Journal of Mass Spectrometry*, **223**, 383-395.
- Katritzky, A. R., Y. L. Wang, S. Sild, T. Tamm & M. Karelson. (1998). QSPR studies on vapor pressure, aqueous solubility, and the prediction of water-air partition coefficients. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, **38**, 720-725.
- Killian, E. & C. S. Ough. (1979). Fermentation esters - formation and retention as affected by fermentation temperature. *American Journal of Enology and Viticulture*, **30**, 301-305.
- Kolb, B., C. Welter & C. Bichler. (1992). Determination of partition coefficients by automatic equilibrium headspace-gas chromatography by vapor phase calibration. *Chromatographia*, **34**, 235-240.

- Landy, P., J.-L. Courthaudon, C. Dubois & A. Voilley. (1996). Effect of interface in model food emulsions on the volatility of aroma compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**, 526-530.
- Landy, P., C. Druaux & A. Voilley. (1995). Retention of aroma compounds by proteins in aqueous solution. *Food Chemistry*, **54**, 387-392.
- Lazzara, M. J. & W. M. Deen. (2004). Effects of concentration on the partitioning of macromolecule mixtures in agarose gels. *Journal of Colloid and Interface Science*, **272**, 288-297.
- Leroi, J. C., J. C. Masson, H. Renon, J. F. Fabries & H. Sannier. (1977). Accurate measurement of activity-coefficients at infinite dilution by inert-gas stripping and gas-chromatography. *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development*, **16**, 139-144.
- Linforth, R. S. T. & A. J. Taylor. (2006). Release of flavor from emulsions under dynamic sampling conditions. *Food Lipids*, **920**, 159-169.
- Llaurado, J., N. Rozes, R. Bobet, A. Mas & M. Constanti. (2002). Low temperature alcoholic fermentations in high sugar concentration grape musts. *Journal of Food Science*, **67**, 268-273.
- Lubbers, S. & E. Guichard. (2003). The effects of sugars and pectin on flavour release from a fruit pastille model system. *Food Chemistry*, **81**, 269-273.
- Lubbers, S., C. Verret & A. Volley. (2001). The effect of glycerol on the perceived aroma of a model wine and a white wine. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, **34**, 262-265.
- Lucero, P., E. Penalver, E. Moreno & R. Lagunas. (2000). Internal trehalose protects endocytosis from inhibition by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 4456-4461.
- Mahmud, H., A. Kumar, R. M. Narbaitz & T. Matsuura. (2000). A study of mass transfer in the membrane air-stripping process using microporous polypropylene hollow fibers. *Journal of Membrane Science*, **179**, 29-41.
- Malherbe, S., V. Fromion, N. Hilgert & J. M. Sablayrolles. (2004). Modeling the effects of assimilable nitrogen and temperature on fermentation kinetics in enological conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, **86**, 261-272.
- Manginot, C., J. M. Sablayrolles, J. L. Roustan & P. Barre. (1997). Use of constant rate alcoholic fermentations to compare the effectiveness of different nitrogen sources added during the stationary phase. *Enzyme and Microbial Technology*, **20**, 373-380.
- Marin, M., I. Baek & A. J. Taylor. (1999). Volatile release from aqueous solutions under dynamic headspace dilution conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 4750-4755.
- Meylan, W. M. & P. H. Howard. (1991). Bond Contribution method for estimating Henry's law constants. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **10**, 1283-1293.
- Meynier, A., A. Garillon, L. Lethuaut & C. Genot. (2003). Partition of five aroma compounds between air and skim milk, anhydrous milk fat or full-fat cream. *Le Lait*, **83**, 223-235.

- Molina, A. M., V. Guadalupe, C. Varela, J. H. Swiegers, I. S. Pretorius & E. Agosin. (2009). Differential synthesis of fermentative aroma compounds of two related commercial wine yeast strains. *Food Chemistry*, **117**, 189-195.
- Molina, A. M., J. H. Swiegers, C. Varela, I. S. Pretorius & E. Agosin. (2007). Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **77**, 675-687.
- Morakul, S., V. Athes, J.-R. Mouret & J.-M. Sablayrolles. (2010). Comprehensive study of the evolution of gas-liquid partitioning of aroma compounds during wine alcoholic fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 10219-10225.
- Morakul, S., J.-R. Mouret, P. Nicolle, I. C. Trelea, J.-M. Sablayrolles & V. Athes. (2011). Modelling of the gas-liquid partitioning of aroma compounds during wine alcoholic fermentation and prediction of aroma losses. *Process Biochemistry*, doi:10.1016/j.procbio.2011.01.034.
- Mouret, J.-R., P. Nicolle, M. Angenieux, E. Aguera, M. Perez & J.-M. Sablayrolles. (2010). On-line measurement of 'quality markers' during winemaking fermentation. *International Intervitis Interfructa Congress*. Stuttgart, Germany.
- Nahon, D. F., M. Harrison & J. P. Roozen. (2000). Modeling flavor release from aqueous sucrose solutions, using mass transfer and partition coefficients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 1278-1284.
- Nahon, D. F., P. A. N. y. Koren, J. P. Roozen & M. A. Posthumus. (1998). Flavor release from mixtures of sodium cyclamate, sucrose, and an orange aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 4963-4968.
- Nawar, W. W. (1971). Variables affecting composition of headspace aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **19**, 1057-1059.
- Philippe, E., A.-M. Seuvre, B. Colas, V. Langendorff, C. Schippa & A. Voilley. (2003). Behavior of flavor compounds in model food systems ; a thermodynamic study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 1393-1398.
- Plyasunov, A. V., N. V. Plyasunova & E. L. Shock. (2004). Group contribution values for the thermodynamic functions of hydration of aliphatic esters at 298.15 K, 0.1 MPa. *Journal of Chemical & Engineering Data*, **49**, 1152-1167.
- Poling, B. E., J. M. Prausnitz & J. P. O'Connell. (2000). *The properties of gases and liquids*. McGraw-Hill.
- Pozo-Bayon, M. A. & G. Reineccius. (2009). Interactions between wine matrix macro-components and aroma compounds. In M. V. Moreno-Arribas & M. C. Polo (Eds.), *Wine Chemistry and Biochemistry*. pp 417-435.
- Raal, J. D. (2000). Characterization of differential ebulliometers for measuring activity coefficients. *Aiche Journal*, **46**, 210-220.

- Reid, R. C., J. M. Prausnitz & B. E. Poling. (1987). *Properties of gases and liquids*. McGraw Hill: New York.
- Ribereau-Gayon, P., D. Dubourdieu, B. Doneche & A. Lonvaud. (2006). Biochemistry of alcoholic fermentation and metabolic pathways of wine yeasts. In Ribereau-Gayon, P., D. Dubourdieu, B. Doneche & A. Lonvaud (Eds.), *Handbook of enology. Volume 1. The microbiology of wine and vinifications*. pp. 53-77.
- Robinson, A. L., S. E. Ebeler, H. Heymann, P. K. Boss, P. S. Solomon & R. D. Trengove. (2009). Interactions between wine volatile compounds and grape and wine matrix components influence aroma compound headspace partitioning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 10313-10322.
- Sablaylorles, J. M. (2009). Control of alcoholic fermentation in winemaking: Current situation and prospect. *Food Research International*, **42**, 418-424.
- Sablaylorles, J. M. & P. Barre. (1993). Kinetics of alcoholic fermentation under anisothermal conditions .2. Prediction from the kinetics under isothermal conditions. *American Journal of Enology and Viticulture*, **44**, 134-138.
- Saerens, S. M. G., K. J. Verstrepen, S. D. M. Van Laere, A. R. D. Voet, P. Van Dijck, F. R. Delvaux & J. M. Thevelein. (2006). The *Saccharomyces cerevisiae* EHT1 and EEB1 genes encode novel enzymes with medium-chain fatty acid ethyl ester synthesis and hydrolysis capacity. *Journal of Biological Chemistry*, **281**, 4446-4456.
- Saint-Eve, A. (2006). Compréhension de la libération de la perception et de la perception en conditions de dégustation : cas du yaourt brassé aromatisé. Thèse, AgroParisTech.
- Sainz, J., F. Pizarro, J. R. Perez-Correa & E. Agosin. (2003). Modeling of yeast metabolism and process dynamics in batch fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, **81**, 818-828.
- Salmon, J. M. & P. Barre. (1998). Improvement of nitrogen assimilation and fermentation kinetics under enological conditions by derepression of alternative nitrogen-assimilatory pathways in an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 3831-3837.
- Savary, G., J.-L. Dublier & N. Cayot. (2006a). Phase ratio variation method as an efficient way to determine the partition coefficients of various aroma compounds in mixture. *Developments in Food Science*, **Volume 43**, 461-464.
- Savary, G., E. Guichard, J.-L. Dublier & N. Cayot. (2006b). Mixture of aroma compounds: Determination of partition coefficients in complex semi-solid matrices. *Food Research International*, **39**, 372-379.
- Seuvre, A.-M., E. Philippe, S. Rochard & A. Voilley. (2007). Kinetic study of the release of aroma compounds in different model food systems. *Food Research International*, **40**, 480-492.

- Seuvre, A. M., C. Turci & A. Voilley. (2008). Effect of the temperature on the release of aroma compounds and on the rheological behaviour of model dairy custard. *Food Chemistry*, **108**, 1176-1182.
- Smith, J. M., H. C. Van Ness & M. M. Abbott. (2005). *Introduction to Chemical Engineering Thermodynamics*. McGraw-Hill: Singapore.
- Snider, J. R. & G. A. Dawson. (1985). Tropospheric light alcohols, carbonyls, and acetonitrile: concentrations in the Southwestern United States and Henry's Law data. *J. Geophys. Res.*, **90**, 3797-3805.
- Sumby, K. M., P. R. Grbin & V. Jiranek. (2010). Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. *Food Chemistry*, **121**, 1-16.
- Swiegers, J. H., E. J. Bartowsky, P. A. Henschke & I. S. Pretorius. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **11**, 139-173.
- Taylor, A. J. (1998). Physical chemistry of flavour. *International Journal of Food Science & Technology*, **33**, 53-62.
- Tehrany, E. A. & S. Desobry. (2004). Partition coefficients in food/packaging systems: a review. *Food Additives and Contaminants*, **21**, 1186-1202.
- Tominaga, T. & D. Dubourdieu. (2000). Studies on varietal aroma of wines from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc and their formation from non-aromatic precursors in grapes. *Revue des Oenologues et des Techniques Vitivinicoles etnologiques*, **97**, 22-28.
- Torija, M. J., G. Beltran, M. Novo, M. Poblet, J. M. Guillamon, A. Mas & N. Rozes. (2003). Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. *International Journal of Food Microbiology*, **85**, 127-136.
- Trelea, I. C., E. Latrille, S. Landaud & G. Corrieu. (2001a). Reliable estimation of the key variables and of their rates of change in alcoholic fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **24**, 227-237.
- Trelea, I. C., M. Titica & G. Corrieu. (2004). Dynamic optimisation of the aroma production in brewing fermentation. *Journal of Process Control*, **14**, 1-16.
- Trelea, I. C., M. Titica, S. Landaud, E. Latrille, G. Corrieu & A. Cheruy. (2001b). Predictive modelling of brewing fermentation: from knowledge-based to black-box models. *Mathematics and Computers in Simulation*, **56**, 405-424.
- Tsachaki, M., A.-L. Gady, M. Kalopesas, R. S. T. Linforth, V. Athès, M. Marin & A. J. Taylor. (2008). Effect of Ethanol, Temperature, and Gas Flow Rate on Volatile Release from Aqueous Solutions under Dynamic Headspace Dilution Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 5308-5315.

- Tsachaki, M., R. S. T. Linfoth & A. J. Taylor. (2005). Dynamic headspace analysis of the release of volatile organic compounds from ethanolic systems by direct APCI-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 8328-8333.
- Tsachaki, M., R. S. T. Linfoth & A. J. Taylor. (2009). Aroma release from wines under dynamic conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 6976-6981.
- van Ruth, S. M. & J. P. Roozen. (2010). Delivery of flavours from food matrices. In A. J. Taylor & R. S. T. Linfoth (Eds.), *Food Flavour Technology*. Blackwell Publishing Ltd: Singapore.
- Verstrepen, K. J., G. Derdelinckx, J. P. Dufour, J. Winderickx, J. M. Thevelein, I. S. Pretorius & F. R. Delvaux. (2003). Flavor-active esters: Adding fruitiness to beer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **96**, 110-118.
- Voilley, A., V. Beghin, C. Charpentier & D. Peyron. (1991). Interactions between aroma substances and macromolecules in a model wine. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, **24**, 469-472.
- Voilley, A., D. Simatos & M. Loncin. (1977). Gas-phase concentration of volatiles in equilibrium with a liquid aqueous phase. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, **10**, 45-49.
- Whitehead, P. G. & S. I. Sandler. (1999). Headspace gas chromatography for measurement of infinite dilution activity coefficients of C-4 alcohols in water. *Fluid Phase Equilibria*, **157**, 111-120.
- Whiton, R. S. & B. W. Zoecklein. (2000). Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of wine aroma compounds. *American Journal of Enology and Viticulture*, **51**, 379-382.
- Wiemken, A. (1990). Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **58**, 209-217.
- Williams, L. A. (1982). Heat release in alcoholic fermentation - a critical reappraisal. *American Journal of Enology and Viticulture*, **33**, 149-153.
- Williams, L. A. & R. Boulton. (1983). Modeling and prediction of evaporative ethanol loss during wine fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, **34**, 234-242.
- Zhao. (2005). Effet du dioxyde de soufre sur la cinétique fermentaire. Master, Université de Montpellier II. Montpellier.

RESUME : Ce travail décrit les équilibres gaz-liquide lors des fermentations alcooliques en conditions œnologiques, en se focalisant sur les composés d'arôme les plus abondants : isobutanol, alcool isoamylique, acétate d'éthyle, acétate d'isoamyle et hexanoate d'éthyle. Les coefficients de partage à l'équilibre (k_i) de ces molécules sont quantifiés, grâce à la méthode PRV (Phase Ratio Variation), en précisant l'effet de la composition du milieu et de la température. Grâce à la mise en œuvre de fermentations spécifiques pendant lesquelles la vitesse de dégagement de CO₂ est contrôlée (grâce à une perfusion d'azote ammoniacal), il a été montré que le dégagement de CO₂ n'avait pas d'effet sur le rapport de concentrations entre phase gaz et liquide et pouvait être assimilé au k_i . Une démarche de modélisation est ensuite effectuée, pour estimer la valeur du rapport de concentrations entre phase liquide et gaz pour ces composés (à l'exception de l'acétate d'éthyle et de l'alcool isoamylique), à tout moment de la fermentation et quelle que soit la température, y compris en conditions de non isothermie. Le modèle, basé sur l'équilibre des phases gaz et liquide, conduit à une erreur moyenne d'estimation inférieure à 10%. Grâce à ce modèle, il devient possible de réaliser des bilans de production des différents composés tout au long de la fermentation, à partir de leur seule mesure dans la phase gaz. Ces bilans permettent de différencier (i) la quantité globale produite, représentative des potentialités de la levure (intérêt microbiologique), (ii) la quantité restant dans la phase liquide (intérêt organoleptique) et (iii) la quantité perdue dans le gaz effluent (intérêt technologique). Il est ainsi mis en évidence que les pertes d'esters sont très importantes. Par exemple, à 20°C, elles atteignent respectivement 44 % et 25 % pour l'hexanoate d'éthyle et l'acétate d'isoamyle. Grâce à un dispositif de suivi en ligne permettant des mesures très fréquentes (une par heure), les vitesses de production et de pertes sont calculées. Elles constituent de nouvelles informations utiles à la fois pour l'étude du métabolisme (suivi de la dynamique de flux métaboliques) et pour mieux raisonner les conduites de fermentation, notamment le régime de température. L'impact de ce régime de température est étudié plus en détail en réalisant des bilans de production lors de fermentations conduites avec la même souche de levure et le même moût. Les résultats obtenus montrent que si l'on ne prend en compte que les concentrations dans la phase liquide - généralement les seules informations disponibles - on surestime fortement l'impact de la température sur le métabolisme de composés fortement volatils, tels que les esters.

TITRE : Etude et modélisation de la composition du gaz fermentaire en conditions œnologiques : intérêt pour le contrôle de la fermentation.

MOTS CLES : Arômes, fermentation, vin, transfert gaz/liquide, modélisation

SUMMARY: The gas-liquid partitioning during winemaking fermentations was studied, with a focus on the main aroma compounds: isobutanol, isoamyl alcohol, ethyl acetate, isoamyl acetate, ethyl hexanoate. The partition coefficients (k_i) of these molecules were quantified, using the PRV (Phase Ratio Variation) method. The influence of the must composition and temperature was assessed. The absence of any effect of CO₂ production on gaz-liquid ratio compared to k_i value was established by running specific fermentations in which the rate of CO₂ production was kept constant by perfusion with assimilable nitrogen. A model was then elaborated to calculate gaz-liquid ratio of these molecules (excepted ethyl acetate and isoamyl alcohol) at any fermentation progress and at any temperature, including anisothermal fermentations. The model based on the equilibrium between the gas and liquid phases predicted k_i with less than 10% error. Using this model, balances were calculated, with a differentiation between (i) the total production, representative of the yeast potential (microbiological interest), (ii) the amount remaining in the fermenting must (organoleptic interest) and (iii) the amount lost in the exhaust CO₂ (technological interest). High losses of esters were observed. For example, at 20°C, they represented 44% and 25 % for ethyl hexanoate and isoamyl acetate, respectively. Using an on line monitoring with a high frequency of measurements (one per hour), rates of production and loss were calculated. These new data are useful both for studies on metabolism (dynamics of metabolic fluxes) and for improving fermentation control, in particular temperature profile. The impact of temperature was assessed in more detail by comparing balances of production during fermentations run with the same yeast strain and must. These experiments demonstrated that the effect of temperature on the yeast metabolism was highly overestimated when only considering the concentrations in the liquid, i.e. usually the only available information.

TITLE: Study and modeling of gas composition during the alcoholic fermentation in winemaking conditions : interest for fermentation control.

KEYWORDS : Aroma compounds, fermentation, wine, gas/liquid transfer, modeling

LABORATOIRE : Equipe Microbiologie, INRA UMR Sciences pour l'œnologie, 2 place Pierre Viala, 34060 MONTPELLIER, France
