



**HAL**  
open science

# Instrumentation, modélisation et automatisation de fermenteurs levuriers à destination oenologique

Clément Hussenet

► **To cite this version:**

Clément Hussenet. Instrumentation, modélisation et automatisation de fermenteurs levuriers à destination oenologique. Autre. Université Paris Saclay (COmUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLC009 . tel-01558823

**HAL Id: tel-01558823**

**<https://theses.hal.science/tel-01558823v1>**

Submitted on 10 Jul 2017

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

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

NNT : 2017SACL009

THESE DE DOCTORAT  
DE  
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY  
PREPAREE A  
"CENTRALESUPELEC"

ECOLE DOCTORALE N°579 SMEMAG  
Sciences mécaniques et énergétiques, matériaux et géosciences

Spécialité de doctorat : Génie des procédés

Par

**Clément HUSSENET**

Instrumentation, modélisation et automatisation de fermenteurs levuriers à destination œnologique

Thèse présentée et soutenue à Châtenay-Malabry, le 26 janvier 2017 :

**Composition du Jury :**

M. SABLAYROLLES Jean-Marie	Professeur, INRA Montpellier	Président
Mme BOUX Marielle	Professeur, AgroParisTech	Rapporteur
Mme TAILLANDIER Patricia	Professeur, ENSIACET	Rapporteur
M. PERRE Patrick	Professeur, CentraleSupélec	Examineur
M. DUCHIRON Francis	Professeur, U.R.C.A., Reims	Encadrant de thèse
Mme PAREAU Dominique	Professeur, CentraleSupélec	Directrice de thèse
M. TAIDI Behnam	Professeur, CentraleSupélec	Co-directeur de thèse
M. POISOT Maxime	Ingénieur, Ceno Concept	Invité



# Remerciements

---

Avant de débiter la présentation de mon travail de plusieurs années, il convient de remercier toutes les personnes ayant soutenu et pris part, tant moralement que financièrement, de près comme de loin, à l'aboutissement de ce périple qu'est la thèse de doctorat. Je remercie Monsieur *Patrick Perré* qui a succédé à *Dominique Pareau* en tant que directeur de la chaire de biotechnologie de l'école CentraleSupélec et du laboratoire de Génie des Procédés et Matériaux pour m'avoir accueilli et permis d'exploiter les différentes ressources du laboratoire.

Un soutien matériel a été apporté de la part de la coopérative de Nogent l'Abbesse et du Centre Viticole Nicolas Feuillatte qui nous ont fourni le vin sans quoi mon travail n'aurait pu être réalisé et je les en remercie.

J'adresse mes remerciements cordiaux à tous les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mes travaux. *Mesdames Marielle Bouix* (professeur à AgroParisTech) et *Patricia Taillandier* (professeur à l'INP-ENSIACET), pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger mon travail en tant que rapporteurs, pour le temps consacré à lire le manuscrit et pour les commentaires constructifs qu'elles m'ont adressé et qui ont permis d'améliorer la qualité de ce manuscrit de thèse. Monsieur *Jean-Marie Sablayrolles* pour avoir bien voulu présider le jury.

*Je tiens particulièrement à remercier Messieurs Gérard et Boxho*, respectivement président et directeur général de l'entreprise Ceno Concept et *Maxime Poisot*, ingénieur commercial, chef de projet, qualité et R&D, et j'en passe, qui m'ont accordé leur confiance et confié des missions valorisantes durant ces années de recherches ainsi que des conseils plus que judicieux.

Je remercie chaleureusement le professeur *Francis Duchiron*, d'avoir accepté de faire partie du jury et avoir supervisé mes recherches.

Aussi, je tiens à remercier tout particulièrement mon directeur de thèse, le professeur *Dominique Pareau* pour m'avoir accueilli dans son équipe durant cette thèse et d'avoir été une de mes encadrants lors de cette thèse. Merci pour vos qualités humaines, pour avoir cru en mes capacités et en mes possibilités et pour m'avoir épaulé. J'ai eu l'immense privilège de bénéficier de vos connaissances dans le domaine des Bioprocédés.

Le professeur *Behnam Taïdi* d'avoir bien voulu suivre ce travail tout en me conseillant, aussi bien humainement que techniquement. Après ces quelques années passées ensemble, je tiens à l'exprimer ici ma considération pour tes qualités humaines ainsi que mon respect.

J'adresse ma plus profonde gratitude envers les différents membres de l'équipe du laboratoire de Génie des Procédés et Matériaux de CentraleSupélec dont ceux de « Reims-Pomacle ». Ceux qui ont commencé cette expérience avant moi puis sont plus ou moins partis *Claire-Line*, *Thomas. Touhami* qui m'a fait confiance et « prêté » ou tout du moins permis d'encadrer les

étudiants en activités expérimentales et ainsi faire quelques manip en bioréacteur supplémentaires. Aux doctorants qui sont devenus des amis au cours de ces années, spécialement *Anne-Sophie* et *Valentin*, mes voisins d'un temps. *Fanny* pour tes conseils et le soutien apporté. *Carole L* pour tes conseils vinicoles et microbiologique. Enfin *Thuy* pour ton soutien, tes discussions et tes petits plats d'ici et d'ailleurs ! Je tiens également à remercier vivement *Rayen et Julien* mes coachs en motivation, merci pour votre aide.

Le laboratoire ICMR de l'URCA pour les mesures de viscosité réalisées, merci.

Je n'oublie pas mes collègues de chez Ceno Concept, plus particulièrement *Frédéric Gory*, *Christophe Kihn* et *Fabien*, qui m'ont toujours accueilli avec sympathie et aidé dans les études industrielles. Merci à tous pour votre contribution. *Jean-Moïse* ton implication dans le projet avec La Chablisienne fut une belle réussite.

Mes amis de toute la vie: vous avez une place très spéciale dans mon cœur! Merci pour tous ces soutiens, pour ne jamais m'avoir laissé tomber et toujours avoir été là !

Ma chérie, pour m'avoir supporté, épaulé, porté dans cette aventure. En plus de me supporter dans des conditions « normales », ce qui est déjà remarquable, subir mon humeur de fin de thèse, je sais que ce fut compliqué. Merci d'être là !!!

Et finalement... mais pas moins important, ceux qui ont toujours été là à mes côtés, qui m'ont soutenu quand le moral n'allait pas trop ou lorsque je n'avais plus d'énergie pour continuer. Le petit cocon familial ! Mes pensées s'adressent à mes frères à qui je dédie ce travail en signe de la profonde et indéfectible affection que je leur porte. Mes pensées vont également à mes grands-parents qui nous ont si vite quittés durant ces quelques années passées. Mes meilleures pensées vont aussi et surtout à mes parents à qui je dois tout, votre amour inconditionnel, de m'avoir soutenu dans tous mes projets et avoir débattu mes idées, m'avoir permis de partir loin. J'ai toujours eu beaucoup de mal à extérioriser mes sentiments, les mots sont peu de choses pour exprimer ma reconnaissance pour tout ce que vous m'avez apporté. Je vous dédie cette réussite et ce travail, merci d'être mes parents, oui je le dis peu, je vous aime très fort !!!

# Sommaire

Sommaire .....	a
Liste des symboles et abréviations.....	d
Liste des métabolites.....	e
Liste des gènes et des enzymes.....	f
Liste des figures .....	g
Liste des tableaux.....	m
Introduction générale .....	o
Introduction générale, contexte de l'étude .....	1
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique.....	7
1. La levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	11
2. Production de boissons alcoolisées grâce à <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	12
2.1. Bières .....	12
2.2. Cidres.....	13
2.3. Vins.....	13
3. Le métabolisme de la levure.....	16
3.1. Besoins nutritionnels.....	16
3.2. Le métabolisme oxydatif.....	18
3.3. Le métabolisme fermentaire .....	18
3.4. Production et consommation de l'éthanol et du glycérol par <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	22
3.5. Production et consommation du glycérol par <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	23
3.6. La transition glycolyse-gluconéogenèse .....	24
4. Paramètres influençant l'activité levurienne .....	24
4.1. La température .....	24
4.2. Le pH .....	25
4.3. Apport en azote.....	25
4.4. L'oxygénation du milieu.....	26
4.5. Le dioxyde de soufre.....	27
4.6. Le dioxyde de carbone dissous .....	27
4.7. Effet glucose fermentation-respiration .....	28
4.8. Notion de stress chez les levures .....	32
5. Cinétique de croissance microbienne .....	36
5.1. Croissance microbienne en culture discontinue (batch) .....	36
6. Les différents types de culture.....	38
6.1. Le mode de culture discontinu (batch).....	38
6.2. Le mode de culture discontinu alimenté (fed-batch) .....	39
6.3. Le mode de culture continu et à recyclage cellulaire (BRC) .....	40

7. Les levures sèches actives commerciales .....	41
8. Le bioréacteur.....	42
8.1. Dimensionnement d'un bioréacteur .....	44
8.2. Les approches de l'extrapolation .....	44
8.3. Les phénomènes de transfert.....	45
9. Production de chaleur lors de la croissance de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	46
9.1. L'énergie de maintenance .....	46
9.2. Energie-chaleur produite lors de fermentation.....	46
9.3. Energie-chaleur produite lors de respiration .....	47
Chapitre 2 : Matériel et méthodes .....	49
1. Micro-organismes.....	52
2. Milieux de culture .....	52
2.1. Caractéristiques du vin utilisé.....	52
2.2. Préparation des milieux en fiole Erlenmeyer.....	52
2.3. Préparation des milieux en bioréacteurs .....	52
3. Réhydratation-acclimatation et ensemencement .....	53
4. Culture en fiole Erlenmeyer .....	54
4.1. Mesures en fin de culture .....	54
4.2. Cinétique .....	54
4.3. Perte de masse et quantité de CO <sub>2</sub> produit.....	54
5. Culture en bioréacteur batch.....	55
5.1. Le bioréacteur utilisé et les sondes de suivi .....	55
5.2. Détermination de la distribution des temps de séjour .....	56
5.3. Caractérisation rhéologique du milieu de culture .....	57
5.4. Analyse de la composition de l'air en sortie .....	57
6. Culture en bioréacteur fed-batch .....	57
7. Méthodes analytiques .....	58
7.1. Caractérisation de la biomasse .....	58
7.2. Dosage des sucres, de l'éthanol et du glycérol .....	61
7.3. Dosage des ions.....	62
7.4. Méthodes d'analyse des cinétiques .....	63
7.5. Régulation de l'ajout de substrat au cours de la culture fed-batch.....	64
Chapitre 3 : Résultats et discussion : Production de levure en milieu hydro-alcoolique ..	67
1. Introduction .....	71
2. Etude et optimisation des cultures en fioles Erlenmeyer.....	72
2.1. Réhydratation et inoculation des levures .....	72
2.2. Effet de la concentration en glucose et effet Crabtree .....	77
2.3. Influence de la concentration en azote .....	83
2.4. Influence de la nature de la source carbonée .....	85

2.5. Effet du pH.....	87
2.6. Essai de fermentation avec les levures produites par le procédé .....	89
2.7. Conclusion de la partie fioles Erlenmeyer .....	90
3. Etude en bioréacteur batch .....	91
3.1. Corrélations entre poids sec, absorbance et concentration cellulaire.....	92
3.2. Détermination de la distribution des temps de séjour .....	94
3.3. Influence de l'aération sur l'oxygénation du milieu .....	96
3.4. Calcul des $k_L a$ .....	98
3.5. Influence de l'aération sur les temps de doublement .....	100
3.6. Influence de l'aération sur la production de biomasse et consommation de glucose .	102
3.7. Influence de l'aération sur les produits de fermentation.....	113
3.8. Vitesse spécifique de croissance .....	123
3.9. Détermination de la part de respiration et de fermentation dans les essais batch entre l'instant initial et celui où le glucose est épuisé .....	124
3.10. Conclusion .....	125
4. Production de levure en bioréacteur alimenté (fed-batch) .....	126
4.1. Optimisation de la phase de démarrage .....	126
4.2. Procédé mis en œuvre pour la production de micro-organismes .....	126
4.3. Nouveau procédé de culture.....	127
4.4. Conclusion des essais fed-batch.....	140
5. Fed-batch pilote.....	141
5.1. Caractérisation rhéologique du milieu de culture .....	141
5.2. Schéma de procédé .....	143
Conclusion générale et perspectives .....	145
Conclusion générale .....	147
Références bibliographiques.....	152
Annexes .....	164
Annexe 1 : Métabolisme carboné central de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , d'après Larpent (1990).....	i
Annexe 2 : Détail du métabolisme carboné central de la mitochondrie d'après Larpent (1990).....	ii
Annexe 3 : Détermination des vitesses spécifiques de croissance en réacteur batch .....	iii
Annexe 4 : Calcul de l'évaporation d'éthanol dans le réacteur avec condenseur .....	v
Annexe 5 : Détermination des rendements éthanol à partir du glucose .....	ix
Annexe 6 : Dessin de la cuve de stockage et mélange du milieu d'alimentation d'une contenance de 1000 litres .....	xii
Annexe 7 : Dessin de la cuve de croissance d'une contenance de 800 litres .....	xiii
Annexe 8 : Représentation graphique de l'évolution du nombre de levures et de leur taille lors des prélèvements quotidiens lors d'un essai de fermentation aérée à 0,1VVM .....	xiv
Annexe 9 : Glossaire .....	xv



## Liste des symboles et abréviations

% : pourcentage

® : marque déposée

°C : degré Celsius

CIHP : Chromatographie Ionique Haute-Pression

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Pression

FA : fermentation alcoolique

g : gramme

h : heure

hL : hectolitre

L : litre

Log : logarithme

LSA : Levures sèches actives

M : 1 mole par litre

mg : milligramme

min : minutes

mL : millilitre

MS : Matière sèche

nm : nanomètre

pH : potentiel hydrogène

rpm : révolution par minute

*S. cerevisiae* : *Saccharomyces cerevisiae*

v/v : volume par volume

VVm : litre d'air par litre de milieu et par minute

VNC: Viable non cultivable

YPD: Yeast peptone dextrose

$\mu$ : Taux népérien de croissance ( $h^{-1}$ )

$\mu m$  : micromètre

$\mu L$  : microlitre

## Liste des métabolites

1.6FDP	1,6 fructose biphosphate
ADP	Adénosine diphosphate
ATP	Adénosine triphosphate
2,3BUTA	2,3 butanediol
2PG	2-phosphoglycerate
PAPS	3-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate
13PDG	3-phospho-D-glyceroyl-phosphate
3PG	3-phosphoglycerate
6PGL	6-phospho glucolactone
6PG	6-phosphogluconate
ACAL	Acétaldéhyde
ACET	Acétate
ACTO	Acétoïne
ACCOA	Acetyl-coa
AKG	A-cétoglutarate
CIT	Citrate
DHA	Dihydroxyacetone
DHAP	Dihydroxyacetone phosphate
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
E4P	Erythrose-4-phosphate
EtOH	Ethanol
FAD+	Flavine adénine dinucléotide, forme oxydée
FADH <sub>2</sub>	Flavine adénine dinucléotide, forme réduite
FRUC	Fructose
F6P	Fructose-6-phosphate
FUM	Fumarate
GLU	Glucose
G6P	Glucose-6-phosphate
GLU	Glutamate
GLN	Glutamine
GSH	Glutathion
G3P	Glycéraldéhyde-3-phosphate
GL	Glycérol
GL3P	Glycérol-3-phosphate
H+	Hydrogène
ICIT	Isocitrate
MAL	Malate
NADP+	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme oxydée
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite
NAD+	Nicotinamide adénine dinucléotide, forme oxydée
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite
OAA	Oxaloacétate
O <sub>2</sub>	Oxygène
Pi	Phosphate
PEP	Phosphoenolpyruvate
PYR	Pyruvate
R5P	Ribose-5-phosphate
RL5P	Ribulose-5-phosphate
S7P	Sedoheptulose-7-phosphate
SUCC	Succinate
SUCCOA	Succinyl-coa
TRX	Thioredoxine
X5P	Xylose-5-phosphate




## Liste des gènes et des enzymes

<b>Gènes</b>	<b>Abréviations enzymes</b>	<b>Enzymes</b>
<i>ACO1, ACO2</i>	Acop	aconitase hydratase
<i>ACS1</i>	Acs1p	acétyl-CoA synthase
<i>ADH1, ADH2, ADH3, ADH4, ADH5, ADH6, ADH7</i>	Adhp ou H	alcool déshydrogénase
<i>ALD2, ALD3, ALD4, ALD5, ALD6</i>	Aldp ou ALD	acétaldéhyde déshydrogénase
<i>ARA1, GCY1, YPR1, GRE3</i>	Ara1p, Gcy1p, Ypr1p, Gre3p	glycérol déshydrogénase
<i>BDH1</i>	Bdhp ou BDH	butanediol déshydrogénase
<i>CDC19, PYK2</i>	Cdc19p, Pyk2p	pyruvate kinase
<i>CIT1, CIT3</i>	Citp	citrate synthase
<i>ENO1, ENO2</i>	Enop	énolase
<i>FBA1</i>	Fba1p	aldolase
<i>FRDS1, OSM1</i>	Frds1p, Osm1p	fumarate réductase
<i>FUM1</i>	Fum1p	fumarase
<i>GDH1, GDH2, GDH3</i>	Gdhp ou GDH	glutamate déshydrogénase
<i>GLN1</i>	Gln1p ou GS	glutamine synthétase
<i>GLT1</i>	Glt1p ou GOGAT	glutamate synthase
<i>GND1, GND2</i>	Gndp	6-phosphogluconolactonase
<i>GPD1, GPD2</i>	Gpdp ou GPDH	glycérol-3-phosphate déshydrogénase
<i>GPM1, GPM2</i>	Gpmp	phosphoglycérate mutase
<i>GPP1, GPP2</i>	Gppp	glycérol-3-phosphatase
<i>HXK1, HXK2</i>	Hxkp	hexokinase
<i>IDP1, IDP2, IDP3, IDH1, IDH2</i>	Idpp, Idhp	isocitrate déshydrogénase
<i>ILV2, ILV6</i>	Alsp	2-acetolactate synthase
<i>KGD1, KGD2, LPD1</i>	Akqp	complexe alpha-cétoglutarate déshydrogénase
<i>LSC1, LSC2</i>	Lscp	succinyl-CoA ligase
<i>MAE1</i>	Mae1p	Enzyme malique
<i>MDH1, MDH2</i>	Mdhp	malate déshydrogénase
<i>PPC</i>	PEPc	Phosphoénolpyruvate carboxylase
<i>PDA1, PDB1, LAT1, LPD1, PDX1</i>	Pdhp	complexe pyruvate dehydrogenase
<i>PDC1, PDC5</i>	Pdcp	pyruvate décarboxylase
<i>PFK1, PFK2</i>	Pfkp	phosphofructokinase
<i>PGI1</i>	Pgi1p	glucose-6-phosphate isomérase
<i>PGK1</i>	Pgk1p	3-phosphoglycérate kinase
<i>PYC1, PYC2</i>	Pycp	pyruvate carboxylase
<i>RKI1</i>	Rki1p	ribose-5-phosphate-ketolisomérase
<i>RPE1</i>	Rpe1p	ribulose-phosphate 3 épimérase
<i>SDH1, SDH2, SDH3, SDH4</i>	Sdhp	succinate déshydrogénase
<i>SOL3, SOL4</i>	Solp	6-phosphogluconolactonase
<i>TAL1</i>	Tal1p	transaldolase
<i>TDH1, TDH2, TDH3</i>	Tdhp	glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
<i>TKL1, TKL2</i>	Tklp	transcétolase
<i>TPI1</i>	Tpi1p	triosephosphate isomérase
<i>UTR1, YEF1, POS5</i>	Utr1p, Yef1p, Pos5p	NADH kinase
<i>ZWF1</i>	Zwf1p	glucose-6-phosphate déshydrogénase

## Liste des figures

Figure 1 : Schéma phylogénétique de la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> d'après (Morel et al. 2015) .....	12
Figure 2 : Schéma de l'élaboration traditionnelle des vins effervescents en bouteille, d'après Breban (2016). .....	15
Figure 3 : Représentation de la croissance de la levure dans un milieu contenant deux substrats ainsi que les concentrations des enzymes supposées responsables de la dégradation de chaque substrat ; phénomène appelé diauxie (d'après Kompala et al. 1986). .....	19
Figure 4 : Schéma métabolique simplifié du glucose chez la levure. Le glucose est oxydé soit par la voie des pentoses phosphates, qui permet de la biosynthèse des produits dérivés des sucres à 5 carbones, soit par la glycolyse. La glycolyse permet la synthèse d'ATP et de pouvoir réducteur (transporteurs activés). Le pyruvate peut être ensuite oxydé par la fermentation (anaérobiose en bleu) ou par la respiration (aérobiose en magenta). La fermentation alcoolique produit de l'éthanol moyennant la consommation de transporteurs activés qui permet de rétablir l'équilibre redox des cellules. La respiration a lieu dans les mitochondries. Le pyruvate y est totalement oxydé en dioxyde de carbone via l'acétyl-Coenzyme A. Le rendement théorique de la respiration est de 36 molécules d'ATP dont la plupart sont produites dans la membrane interne des mitochondries par la phosphorylation oxydative, qui restaure l'état oxydé des cofacteurs et transporteurs par une cascade de transporteurs d'électrons. Le gradient de protons ainsi créé au travers de la membrane mitochondriale est converti en ATP par l'ATP synthétase (Adapté de (Rodrigues et al. 2006)) .....	21
Figure 5 : Représentation de la croissance de la levure dans un milieu aéré non renouvelé contenant 5% de glucose montrant la phase initiale de croissance de type fermentaire durant les 10 premières heures puis une phase de type oxydatif qui utilise l'éthanol produit lors de la première phase (Larpent, 1990). .....	22
Figure 6 : Premières étapes de la néoglucogénèse avant de remonter la voie de la glycolyse, d'après (Nelson & Cox, 2008) .....	23
Figure 7 : L'effet Crabtree conduit à la baisse de production de biomasse car une partie du sucre est converti en éthanol. Ce qui signifie que pour obtenir le même rendement en cellules, plus de glucose doit être consommé comparé aux levures Crabtree négatives. Étant donné que seule une faible quantité de sucre est utilisée pour la biomasse et la production d'énergie, lors de culture mixte de micro-organismes, théoriquement cela entraîne un taux de croissance plus faible pour les levures Crabtree positive face à celles Crabtree négatives et aux micro-organismes. Cependant, l'éthanol est utilisé comme un inhibiteur et permet ainsi de contrôler la prolifération des micro-organismes en compétition avec ces dernières, d'après (Dashko, Zhou, Compagno, & Piškur, 2014). .....	30
Figure 8 : a) Cellule en milieu hypotonique et b) en milieu hypertonique. ....	34
Figure 9 : Fonctionnement schématisé des pompes à protons ATP dépendantes à travers la membrane cytoplasmique ; .....	35
Figure 10 : Courbe de cinétique microbienne d'une culture liquide de <i>S. cerevisiae</i> dans un milieu de culture optimal. On distingue 6 phases. (I) la phase de latence ; (II) la phase de démarrage ; (III) la phase exponentielle donnant un taux de croissance et un temps de division ; (IV) la phase de ralentissement durant laquelle apparaît l'assimilation des produits de la fermentation ;(V) la phase stationnaire accompagnée d'une vacuolisation prononcée et d'un arrêt de la division. Cette phase est réversible et les cellules repartent plus ou moins rapidement en présence de milieu frais (THONART, 2009 et (Bourat, 1992)).....	36

Figure 11 : Evolution du taux de croissance néperien ( $\mu$ ) en fonction du substrat permettant de définir le coefficient d'affinité de la levure pour son substrat correspondant à la moitié du taux de croissance maximal ( $12 de \mu_{max}$ ) (Bourat, 1992).....	37
Figure 12 : Représentations schématiques des différents modes d'alimentations en milieu nutritif de bioréacteurs .....	38
Figure 13 : Représentations des cinétiques des concentrations cellulaires (X), des substrats (S) et des produits (P) en fonction du mode d'alimentation du bioréacteur. ....	38
Figure 14 : Géométrie standard d'un bioréacteur (THONART, 2009).....	43
Figure 15 : Schéma d'un bioréacteur équipé de façon minimale, d'après Fries et al. (2005). ....	43
Figure 16 : Photo du bioréacteur de marque Sartorius BIOSTAT® B et son panneau de contrôle utilisés lors des expériences en batch.....	56
Figure 17 : Photo des bioréacteurs isolés réalisés par la société Ceno Concept et le panneau de contrôle de marque Sartorius BIOSTAT® B utilisés lors des expériences en fed-batch.....	58
Figure 18:Schéma d'une cellule de Fuchs Rosenthal .....	59
Figure 19 : Photo prise à l'aide de la caméra du microscope sur la lame de Fuchs & Rosenthal pour le dénombrement montrant les cellules mortes colorées par le bleu de méthylène et les cellules vivantes non colorées. ....	60
Figure 20 : Photo de l'appareil CLHP Ultimate 3000 avec les différents compartiments servant à l'analyse. ....	62
Figure 21 : Photo de l'appareil de chromatographie ionique avec les différents compartiments servant à l'analyse des ions .....	63
Figure 22 : Perte de masse des cultures en fonction du temps, pour différentes concentrations en LSA inoculées dans le milieu de croissance (mode discontinu, 28°C). ....	73
Figure 23 : Représentation de la biomasse totale (en gramme par litre de poids sec) en fonction du taux d'ensemencement en LSA du milieu de croissance pour une culture en mode discontinu à 28°C après 75 heures de culture. ....	74
Figure 24 : Représentation graphique de la perte de masse en fonction du temps, suivant différents temps de réhydratation des LSA inoculées dans le milieu de croissance pour une culture de la levure en mode discontinu à 28°C durant 24 ou 70 heures suivant 2 concentrations en glucose initiales différentes. ....	75
Figure 25 : Représentation de la biomasse totale (en gramme par litre de poids sec) en fonction de différents temps de réhydratation des LSA inoculées dans le milieu de croissance pour une culture en mode discontinu à 28°C durant 24 ou 70 heures suivant 2 concentrations en glucose initiales différentes. ....	76
Figure 26 : Représentation graphique de la perte de masse du milieu de culture en fonction du temps, suivant différentes concentrations en glucose initiales dans le milieu de croissance (10, 50, 100 g/L) pour une culture de la levure en mode discontinu à 28°C durant 139 heures. ....	77
Figure 27 : Représentation graphique de la vitesse de perte de masse du milieu de culture en fonction du temps, suivant différentes concentrations en glucose initiales dans le milieu de croissance (10, 50, 100g/L) pour une culture de la levure en mode discontinu à 28°C durant 139 heures. ....	78
Figure 28 : Représentation de la biomasse totale (en gramme par litre de poids sec) en fonction de différentes concentration en glucose initiales dans le milieu de croissance (10, 50, 100g/L) pour une culture de la levure en mode discontinu à 28°C durant 139 heures. ....	79
Figure 29 : Représentation graphique de la productivité de la levure en fonction de la concentration initiale en glucose.....	81

Figure 30 : Représentation graphique de la perte de masse en fonction du temps, suivant différentes concentrations en $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ dans le milieu de croissance pour une culture de la levure en mode discontinu à 28°C sur 30 heures de culture. ....	84
Figure 31 : Représentation de la biomasse totale (en gramme par litre de poids sec) en fonction de la concentration en phosphate diammonique dans le milieu de croissance en mode discontinu à 28°C après 30 heures de culture. ....	84
Figure 32 : Evolution du nombre de cellules par millilitre au cours du temps, la courbe avec le symbole  représente l'évolution du nombre de cellules ayant poussées avec le saccharose comme substrat carboné et  représente l'évolution du nombre de cellules ayant poussées avec le glucose, pour une culture de la levure en mode discontinu à 28°C durant 120 heures...	86
Figure 33 : Représentation graphique des concentrations dans le milieu de culture en fonction du temps a) en éthanol, b) en glycérol, suivant les deux conditions de concentrations en glucose ou saccharose initiales (10 g/L) pour une culture de la levure en mode discontinu à 28°C durant 120 heures. ....	87
Figure 34 : Représentation graphique de la perte de masse en fonction du temps, suivant différentes conditions de pH du milieu de croissance pour une culture de la levure en mode discontinu à 28°C durant 120 heures de culture. ....	88
Figure 35 : Représentation de la biomasse totale (en gramme par litre de poids sec) en fonction du pH du milieu de croissance pour une culture de la levure en mode discontinu à 28°C après 120 heures de culture. ....	88
Figure 36 : Concentration des produits de fermentation, suivant différentes conditions de pH du milieu de croissance pour une culture de la levure en mode discontinu à 28°C après 120 heures de culture. ....	89
Figure 37 : Concentration des produits de fermentation lors de l'inoculation et après trois semaines de culture en vase clos, à 30°C, de la levure issue du procédé développé en mode Fed-batch. ....	90
Figure 38 : Corrélation entre (a) l'Absorbance à 600nm et le poids sec ; entre (b) l'Absorbance à 600nm et la concentration cellulaire en condition aérée à 0,2VVM par balayage de la tête de cuve. ....	92
Figure 39 : Corrélation entre (a) l'Absorbance à 600nm et le poids sec ; entre (b) l'Absorbance à 600nm et la concentration cellulaire en condition aérée à 0,02VMM par micro diffuseur sous une agitation de 295 rpm à une concentration en phosphate diammonique de 3,2g/L. ....	93
Figure 40 : Schéma du dispositif pour le suivi de la conductivité du milieu afin de déterminer le temps de séjour. ....	95
Figure 41 : Représentation graphique du suivi de la conductivité (n=228 points de mesure) réalisé à l'aide d'un conductimètre. ....	96
Figure 42 : Evolution de la concentration d'oxygène dissous au cours du temps lors des développements de levure sur milieu hydro-alcoolique en fonction des différents débits d'aération du milieu de culture. Les cultures nommées micro aération, sont réalisées avec un micro diffuseur et celles nommées bullage avec un diffuseur d'air annulaire. Le balayage est quant à lui réalisé par simple envoi d'air à travers une entrée sur le haut de la cuve, au-dessus du liquide. ....	97
Figure 43 : Représentation du temps de doublement de la biomasse totale (en heure) en fonction de l'aération du milieu de croissance pour une culture en mode discontinu à 28°C. Les barres d'erreurs présentées ici sont issues du calcul de l'écart type réalisé sur les conditions de culture identiques (réplicats). Les symboles  représentent le pourcentage de viabilité. ....	101
Figure 44 : Représentations cinétiques de a) l'absorbance normalisée et b) la concentration du glucose dans le milieu en fonction du temps, obtenues lors des 5 fermentations, suite à un simple	

balayage de l'air de la tête de cuve à un débit correspondant à 0,2VVm et une agitation du milieu à 500 rpm. La concentration en phosphate diammonique est de 0,2 g/L. ....	102
Figure 45 : Représentations cinétiques de a) l'absorbance normalisée et b) la concentration du glucose dans le milieu en fonction du temps, obtenues lors des 2 fermentations, suite à un bullage à l'aide d'un diffuseur annulaire à un débit correspondant à 0,1VVm et une agitation du milieu à 500 rpm. La concentration en phosphate diammonique est de 0,2 g/L. ....	103
Figure 46 : Représentations cinétiques de a) l'absorbance normalisée et b) la concentration du glucose dans le milieu en fonction du temps, obtenues lors de 3 fermentations, suite à une aération par micro diffuseur à un débit correspondant à 0,1VVm pour la représentation de couleur jaune ; celle de couleur grise à 0,05VVm et enfin celle de couleur violette à 0,01VVm sous une agitation du milieu à 500 rpm. La concentration en phosphate diammonique est de 0,2 g/L. ....	104
Figure 47 : Représentations cinétiques de a) l'absorbance normalisée et b) la concentration du glucose dans le milieu en fonction du temps, obtenues lors des 4 réplicats, suite à un bullage à l'aide d'un micro diffuseur à un débit correspondant à 0,02VVm et une agitation du milieu à 295 rpm. La concentration en phosphate diammonique est de 3,2 g/L. ....	106
Figure 48 : Représentations cinétiques de a) l'absorbance à 600nm et b) la concentration du glucose dans le milieu en fonction du temps, obtenues lors d'une fermentation, suite à un bullage à l'aide d'un micro diffuseur à un débit correspondant à 0,1VVm et une agitation du milieu à 295 rpm. La concentration en phosphate diammonique est de 3,2 g/L. ....	107
Figure 49 : Représentations cinétiques de a) l'absorbance à 600 nm et b) la concentration du glucose dans le moût en fonction du temps, obtenues lors d'une fermentation avec vidange partielle et remplissage, suite à un bullage à l'aide d'un micro diffuseur à un débit correspondant à 0,02VVm et une agitation du milieu à 295 rpm. La concentration en phosphate diammonique est de 0,3 g/L. ....	108
Figure 50 : Rendements de biomasse par rapport au glucose pour les essais à 80 g/L de glucose initial. ....	111
Figure 51 : Vitesses de consommation du glucose en bleu et vitesses de consommation spécifiques (rapportée à la biomasse) en orange et en fonction des conditions d'aération, rapporté aux vitesses de consommation des sucres dans le moût, condition dont la productivité était maximale. ....	112
Figure 52 : Vitesse de production de biomasse à 80 g/L de glucose initial. ....	113
Figure 53 : Représentations cinétiques de a) la concentration de l'éthanol et b) la concentration du glycérol dans le milieu en fonction du temps, obtenues lors des 5 fermentations, suite à un simple balayage de l'air de la tête de cuve à un débit correspondant à 0,2VVm et une agitation du milieu à 500 rpm. La concentration en phosphate diammonique est de 0,2 g/L. ....	115
Figure 54 : Représentations cinétiques de a) la concentration de l'éthanol et b) la concentration du glycérol dans le milieu en fonction du temps, obtenues lors des 2 fermentations, suite à un bullage à l'aide d'un diffuseur annulaire à un débit correspondant à 0,1VVm et une agitation du milieu à 500 rpm. La concentration en phosphate diammonique est de 0,2 g/L. ....	116
Figure 55 : Représentations cinétiques de a) la concentration de l'éthanol et b) la concentration du glycérol dans le milieu en fonction du temps, obtenues lors de 3 fermentations, suite à une aération par micro diffuseur à un débit correspondant à 0,1VVm pour la représentation de couleur jaune ; celle de couleur grise à 0,05VVm et enfin celle de couleur violette à 0,01VVm sous une agitation du milieu à 500 rpm. La concentration en phosphate diammonique est de 0,2 g/L. ..	117
Figure 56 : Représentations cinétiques de a) la concentration de l'éthanol et b) la concentration du glycérol dans le milieu en fonction du temps, obtenues lors des 4 réplicats, suite à un bullage à l'aide d'un micro diffuseur à un débit correspondant à 0,02VVm et une agitation du milieu à 295 rpm. La concentration en phosphate diammonique est de 3,2 g/L. ....	119

Figure 57 : Représentations cinétiques de a) la concentration de l'éthanol et b) la concentration du glycérol dans le milieu en fonction du temps, obtenues lors d'une fermentation, suite à un bullage à l'aide d'un micro diffuseur à un débit correspondant à 0,1VVm et une agitation du milieu à 295 rpm. La concentration en phosphate diammonique est de 3,2 g/L.....	120
Figure 58 : Représentations cinétiques de a) la concentration de l'éthanol et b) la concentration du glycérol dans le moût en fonction du temps, obtenues lors d'une fermentation avec vidange partielle et remplissage, suite à un bullage à l'aide d'un micro diffuseur à un débit correspondant à 0,02VVm et une agitation du milieu à 295 rpm. La concentration en phosphate diammonique est de 0,3 g/L.....	121
Figure 59 : Rendements d'éthanol par rapport au glucose lors de l'épuisement du glucose en fonction des différentes conditions d'aération, la concentration en glucose initiale était pour toutes, proche de 80 g/L.....	122
Figure 60 : Vitesses de production spécifiques d'éthanol en fonction des différentes conditions d'aération, la concentration en glucose initiale était pour toutes, proche de 80 g/L.....	123
Figure 61 : Schéma du dispositif utilisé lors des études en fed-batch, cuve de 5 litres. ....	128
Figure 62 : Photo des bioréacteurs isolés réalisés par la société Ceno Concept et le panneau de contrôle Sartorius BIOSTAT® B plus utilisés lors des expériences en fed-batch.....	129
Figure 63 : Photo du panneau de contrôle du bioréacteur montrant la relative stabilité de la température (courbe jaune) malgré l'agitation mécanique, représentée par la courbe bleue et l'aération. ....	130
Figure 64 : Volume du milieu froid ajouté dans la cuve de propagation. ....	132
Figure 65 : Représentation logarithmique de la partie exponentielle de la courbe d'apport du milieu. ....	133
Figure 66 : Suivi de l'absorbance et de la température dans la cuve de propagation en fonction de la quantité de milieu apporté au cours du temps lors du fed-batch avec le milieu de propagation à une concentration initiale en glucose de 10 g/L et le milieu d'apport est à une concentration en glucose de 50 g/L.....	133
Figure 67 : Suivi des concentrations cellulaires au cours du temps lors du fed-batch avec le milieu de propagation à une concentration initiale en glucose de 5 g/L et le milieu d'apport à une concentration en glucose de 10 g/L.....	134
Figure 68 : Suivis de la concentration en glucose et de la température au cours du temps lors du fed-batch avec le milieu de propagation à une concentration initiale en glucose de 5 g/L et le milieu d'apport est à une concentration en glucose de 10 g/L.....	135
Figure 69 : Suivi du comportement d'un fed-batch durant deux semaines. ....	136
Figure 70 : Productivités moyennes de levures pour chaque essai en mode fed-batch (cells/mL/h). ....	139
Figure 71 : Vitesse de production de biomasse pour chaque essai fed-batch « F-b ». ....	140
Figure 72 : Evolution de la viscosité du milieu de croissance, la courbe avec le symbole —●— représente le milieu seul à t0 et le symbole —○— le milieu contenant les levures à une concentration de 350 millions par millilitre après 420 heures de croissance.....	142
Figure 73 : Détermination des vitesses spécifiques de croissance par la représentation du logarithme népérien du rapport de l'absorbance du milieu à 600 nm sur l'absorbance initiale des cinq conditions d'aération lors du balayage de l'air de la tête de cuve à 0,2 VVm. ....	iii
Figure 74 : Détermination des vitesses spécifiques de croissance par la représentation du logarithme népérien du rapport de l'absorbance du milieu à 600 nm sur l'absorbance initiale des de la condition d'aération par bullage à l'aide du diffuseur annulaire à 0,1 VVm en duplicats. .	iii



Figure 75 : Détermination des vitesses spécifiques de croissance par la représentation du logarithme népérien du rapport de l'absorbance du milieu à 600 nm sur l'absorbance initiale des trois conditions d'aération par le micro diffuseur à 0,1 ; 0,05 et 0,01 VVm.....	iv
Figure 76 : Détermination des vitesses spécifiques de croissance par la représentation du logarithme népérien du rapport de l'absorbance du milieu à 600 nm sur l'absorbance initiale de la condition d'aération par le micro diffuseur à 0,02 VVm des quatre réplicats.....	iv
Figure 77 : Montage bioréacteur-condenseur.....	v
Figure 78 : Modèle d'évaporation d'éthanol.....	vi
Figure 79 : Variation de la pente de $\ln (CE/CE_0) = f(t)$ en fonction du débit d'air .....	vii
Figure 80 : Détermination du rendement éthanol sur glucose pour la condition d'aération à 0,2 VVm par balayage de la tête de cuve.....	x
Figure 81 : Détermination du rendement éthanol sur glucose pour la condition d'aération à 0,1 VVm par le diffuseur annulaire.....	x
Figure 82 : Détermination du rendement éthanol sur glucose pour la condition d'aération à 0,01 ; 0,02 ; 0,05 VVm par le micro diffuseur.....	xi
Figure 83 : Schéma de la cuve de mélange du pilote.....	xii
Figure 84 : Schéma de la cuve de propagation du pilote.....	xiii
Figure 85 : Exemple de graphique suite aux comptages réalisés par le compteur de particules.....	xiv

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Sources et fonctions des éléments essentiels, d'après (Salma, 2013) .....	17
Tableau 2 : Récapitulatif des résultats obtenus suivant différentes concentrations en glucose initiales dans le milieu de croissance (10, 50, 100 g/L) pour une culture de la levure en mode discontinu à 28°C durant 139 heures. ....	80
Tableau 3 : Composition de la levure par méthode CHNS précision à 0,1 % près.....	83
Tableau 4 : Récapitulatif des corrélations lors des différentes conditions de cultures, entre les différentes mesures et masses d'une cellule. ....	93
Tableau 5 : $K_L$ a obtenus en fonction des débits et des agitations appliqués au milieu de culture. ....	98
Tableau 6 : Quantité de dioxygène transféré par unité de temps et volume en fonction des débits et agitation. En jaune sont représentées les valeurs calculées à partir de la corrélation obtenue. ....	100
Tableau 7 : Récapitulatif des vitesses de consommation du glucose et production de biomasse ainsi que les rendements obtenus suivant les différents débits d'aération et concentrations initiales en glucose. * : condition dont la concentration en $(NH_4)_2HPO_4$ initiale était de l'ordre de 3 g/L. ....	110
Tableau 8 : Proportion de fermentation par rapport à la respiration lors des différentes conditions d'aération. ....	124
Tableau 9 : Récapitulatif des rendements et productivités obtenus lors des différentes conditions d'aération et concentrations en glucose et phosphate diammonique initiales en batch. ....	125
Tableau 10 : Corrélations des principaux essais réalisés en fed-batch.....	131
Tableau 11 : Récapitulatif des rendements de production de biomasse et d'éthanol, ainsi que de la vitesse spécifique de consommation du glucose lors des divers essais.....	137



# Introduction générale



## Introduction générale, contexte de l'étude

Les premiers signes de l'homme ayant utilisé des levures pour produire des aliments fermentés mais également pour leur action bénéfique sur la peau et le teint, datent de 7000 avant JC, en Mésopotamie et régions du Caucase (Pérez-Torrado *et al.*, 2015). Plus tard, Pline l'Ancien, un naturaliste romain, raconte que vers 370 avant JC, Hippocrate, avait supposé une action diurétique du levain et le conseillait comme remède. Au Moyen-Âge, sans réellement savoir ce que c'était, les moines qui soignaient les lépreux, absorbaient de la levure afin de ne pas être contaminés à leur tour. Les premiers travaux scientifiques applicables aux levures bénéficient de l'invention du microscope par le Hollandais Antonie van Leeuwenhoek en 1677. À partir de 1789, Lavoisier consacre une part importante de ses travaux à l'étude des fermentations. En 1810, Gay-Lussac définit l'équation chimique globale de la réaction. En 1836, Cagniard-La Tour, Schwann et Kützing publient séparément leurs observations microscopiques et concluent que la levure est un organisme vivant. Mais ce n'est qu'en 1837, que le chercheur Meyen découvre que la levure, responsable de la fermentation, est en réalité, de nombreux petits organismes vivants unicellulaires qui se reproduisent par bourgeonnement. Il leur donne alors le nom de *Saccharomyces cerevisiae*. Cependant, les bases scientifiques qui permirent leur culture et leur utilisation en grandes quantités furent l'œuvre d'un microbiologiste français, Louis Pasteur. En 1845, il découvrit la présence naturelle de ces micro-organismes, en particulier de *S. cerevisiae*, entraînant spontanément le démarrage de la fermentation des sucres pour produire de l'éthanol et du dioxyde de carbone qui représente la base de nombreux produits liés à l'alimentation ou à la nutrition parfois aussi appelés alicaments de nos jours. Il étudia les voies de fermentation et démontra qu'il s'agissait de processus non seulement chimiques mais aussi biologiques en isolant et cultivant les levures responsables de ces phénomènes. A la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, le chimiste allemand Eduard Buchner publia son premier article sur l'étude des extraits de levure (1897). Au cours d'une série d'expériences à l'université Humboldt de Berlin, il découvrit que le sucre pouvait être fermenté par des extraits de levure même en l'absence de toute cellule de levure entière dans le mélange (prix Nobel de chimie (The Nobel Foundation, 1907)). C'est à cette période que l'utilisation de la levure exogène pour produire de la bière et du pain est devenue une pratique habituelle.

Le constat selon lequel les levures sont sans aucun doute le groupe le plus important de micro-organismes exploités commercialement par l'homme a été fait depuis bien longtemps. Aujourd'hui, l'importance de la levure dans le secteur industriel est très largement basée sur la capacité de certaines levures (principalement *S. cerevisiae*, *bayanus* et *pastorianus*) à effectuer une conversion rapide et efficace des sucres ou des hydrates de carbone en éthanol, glycérol, dioxyde de carbone, acides et/ou de la biomasse. Les technologies de la fermentation couvrent des domaines industriels variés. Dans le secteur alimentaire, il s'agit de la production des levures et ferments pour la production du pain, des fromages et des boissons alcoolisées, mais aussi des arômes, de certains acides et de biopolymères. Avec l'évolution des biotechnologies, dans le secteur chimique et pharmaceutique, les levures deviennent de plus en plus importantes pour produire des vitamines, des antibiotiques, divers produits tels que les stéroïdes, des protéines hétérologues (insuline, antigène de surface de l'hépatite B, alpha-amylases, cellulases, albumine de sérum humain, etc.), les levures deviennent des agents biologiques importants pour les biotransformations (éthanol, glycérol, alpha-carotène, acide ascorbique, lactique...), en tant que producteurs de composés de saveurs naturelles (acide citrique, acétate d'éthyl, acétaldéhyde,...)

(Baduel, 2002) et encore des matières grasses ou des huiles, par exemple *Cryptococcus curvatus* ou *Rhodotorula glutinis* ont une composition en triglycérides similaire à celle des plantes (Foucaud-scheunemann & Helinck, 2009). Les applications les plus récentes se sont développées grâce à la technologie de l'ADN recombinant ; il s'agit principalement de la production des protéines à usage thérapeutique et de la production des enzymes. L'application des fermentations au domaine de l'environnement pour la destruction des déchets et le traitement des eaux fait aussi son apparition depuis quelques années maintenant.

Plusieurs raisons ont stimulé le secteur industriel de production de la levure pour approvisionner le marché croissant de produits alimentaires fermentés avec des fermentations industrielles simples à mettre en œuvre, sûres, complètes et répétitives. L'une des utilisations les plus importantes de la levure est la production des boissons alcoolisées à partir de différents substrats, en fonction de la région géographique, exclusivement par la fermentation ou par fermentation suivie par distillation. La consommation mondiale de levure est estimée à plus de 3,2 millions de tonnes (Loëz, 2003) mais très peu de chiffres sont donnés. Les matières premières utilisées peuvent être de simples sucres, tels que ceux présents dans le jus de raisin, pour la vinification ou des hydrates de carbone de haut poids moléculaire, tels que l'amidon d'orge pour le brassage.

Les fermentations de ces différentes boissons entraînent potentiellement les mêmes problèmes, à savoir, un risque de fermentation lente et même arrêtée, et des productions de composés apportant un mauvais goût, les deux étant généralement associés à l'incapacité de la levure de s'adapter aux conditions défavorables (Attfield, 1997). Le développement de la chimie permet un accroissement des connaissances œnologiques. Les recherches actuelles portent sur l'amélioration des techniques de fermentation, la sélection de souches microbiennes à fort potentiel industriel et la découverte et l'exploitation de nouvelles voies biochimiques. Enfin les acteurs du monde viticole, qui étaient plus réticents à changer les pratiques traditionnelles, notamment apporter une matière exogène, commencent à pratiquer l'apport de la levure fraîche et sèche dans les années 50, en particulier dans les nouvelles régions viticoles mondiales (USA, Afrique du Sud, Australie et Nouvelle-Zélande). Dans les années 1960, pour résoudre ces problèmes, les industries de fabrication de Levure Sèche Active (LSA) développent les technologies pour générer de grandes quantités de levure sèche active (LSA) en sélectionnant la levure la plus appropriée à chaque substrat spécifique, et optimisent leurs conditions de production (Fleet, 2008) donnant de bonne qualité de produits fermentés ce qui a conduit à une rapide expansion dans les pays européens (Reed & Nagodawithana, 1988).

Sans levures, pas de vin. Ce sont elles qui assurent la fermentation alcoolique du moût de raisin, c'est-à-dire la transformation des sucres du raisin en éthanol.

Les levures œnologiques sont sélectionnées depuis des millénaires. Les levures commerciales ont été sélectionnées essentiellement à partir de souches de l'espèce *S. cerevisiae* isolées du vin. La connaissance du génome de *S. cerevisiae* a permis de cibler la sélection pour différents objectifs dont notamment, une production de levures à faible production d'alcool et à propriétés acidifiantes, mise sur le marché en 2016 (cf. article 4 (Infowine, 2016): Réduire la teneur en alcool des vins grâce à des levures).

Environ 80 % des vinificateurs ajoutent dans le moût de raisin, des levures commerciales sélectionnées et préparées sous la forme de levures sèches actives. L'atout majeur des LSA réside dans leurs facilités d'utilisation, elles sont vendues dans des contenants prêts à l'emploi après une réhydratation. Par contre, il y a tout de même un risque de contamination, bien que les fournisseurs donnent moins de 10 levures sauvages par million de cellules et lors du procédé de séchage des LSA une grande partie meurt. L'achat de LSA représente donc un achat de levures, en partie mortes. De plus, certains viticulteurs utilisent la flore indigène présente dans le raisin et le chai et réutilisent une même souche, conservée d'une année à l'autre pour garder une certaine constance au vin qu'ils produisent ; dans ce cas, pour ensemercer des milliers de litres par jour une grande quantité de levain leur est nécessaire, il faut donc un moyen simple et efficace de multiplier cette levure.

Optimiser le contrôle de la fermentation alcoolique en œnologie est complexe (J. M. Sablayrolles, 2009). En effet, l'épuisement des nutriments, la durée de la fermentation ou la quantité d'énergie nécessaire pour réguler la température de fermentation sont importants, mais l'objectif principal est l'optimisation du rapport qualité/coût du produit. Durant la fermentation, la levure est soumise à une succession de stress, causés notamment par une concentration élevée en éthanol, qui nécessitent une adaptation continue de son métabolisme. En ce sens, la production d'une levure adaptée à ces conditions est un sujet important pour les industriels. Le mode de conduite de la fermentation et la souche de levure joue un rôle majeur. De nos jours la Levure Sèche Active (LSA) est majoritairement utilisée. Son acclimatation préalable dans le vin de tirage (culture liquide composée de sucre, de vin tranquille et de levures aussi appelées « levain ») est aussi très importante et risquée. Si le levurage est réalisé avec une levure mal réhydratée ou mal acclimatée au milieu hydro-alcoolique, il peut devenir un poste très coûteux pour des structures de gros volumes (50 euros le kilogramme de LSA). L'inoculation des cuves de fermentation ou de bouteilles en méthodes traditionnelles champenoises représente une étape clef de l'élaboration des vins et encore plus des vins effervescents, comme le champagne qui obtiendront leurs fines bulles grâce à la fermentation alcoolique effectuée en bouteille par la levure. Jusqu'à présent, de nombreuses étapes sont nécessaires pour produire le levain, impliquant une rigueur d'organisation en cuverie, beaucoup de cuves et donc beaucoup de place.

Dans le but de proposer une plus-value sur des cuves destinées à la production des levains de tirages, permettant de sécuriser l'opération de réhydratation et d'acclimatation des levures, condition indispensable à l'efficacité du levurage ; ce projet de recherche doctorale en collaboration avec l'entreprise Œno Concept par une Conventions Industrielles de Formation par la Recherche (CIFRE), a porté sur l'étude et l'optimisation du procédé de culture en milieu hydro-alcoolique de la levure œnologique, *S. cerevisiae* dont la dénomination commerciale est IOC Fizz<sup>+</sup>. Nous avons choisi un milieu contenant de l'alcool pour acclimater la levure aux conditions contraignantes qu'elle rencontrera lors de la seconde fermentation. Les questions qui se posent sont de savoir si le comportement de la levure en milieu hydro-alcoolique est semblable au milieu riche, sans éthanol. Les levures devront être en pleine capacité de se développer dans le vin, un milieu pauvre en nutriments et sous des conditions de pression atmosphérique qui augmenteront à l'intérieur de la bouteille lors de l'élaboration du champagne.

Le premier chapitre de ce manuscrit va traiter de l'état de l'art de la levure *S. cerevisiae* et de son utilisation en fermentation qui désigne tantôt, l'opération unitaire permettant de produire de la biomasse ou des produits de bioconversion par la culture de micro-organismes dans un grand nombre de secteurs : l'alimentaire, la chimie fine, la pharmacie, l'agro-industrie et la cosmétique



(Mosrati, 1993) et parfois le métabolisme utilisé pour la dégradation du substrat permettant le développement de la levure.

Le deuxième chapitre renseignera sur le matériel et les méthodes utilisés pour conduire les études.

La stratégie pour mener à bien ce projet a donc été développée en trois étapes tout en gardant à l'esprit que l'on cherche un nouveau procédé fed-batch bien que d'autres existent déjà mais le but est de pouvoir proposer un procédé simple, robuste et peu onéreux :

Tout d'abord une étude de la réhydratation de la levure sèche active a été réalisée, puis une optimisation des conditions de croissance en batch et enfin une amélioration des rendements ainsi que le développement d'une nouvelle méthode de contrôle d'alimentation fed-batch ont été développées car la levure a besoin d'une source de carbone organique à faible concentration pour se développer.

L'objectif final pour l'industriel est de proposer une cuve de taille réduite pour la production de ferments concentrés disponible de façon quasi continue avec la possibilité de prélever un volume régulier adapté aux besoins de production.

Pour cela, le troisième chapitre présente les résultats expérimentaux, découpés en 3 parties.

Une première partie qui développera les études et optimisations réalisées en fioles Erlenmeyer, afin d'avoir une parfaite connaissance de l'influence des changements des facteurs physico-chimiques du milieu de culture les plus influents sur la croissance et l'activité levurienne (pH, température, agitation, aération et concentration en nutriments) qui représentent un enjeu majeur pour la compréhension du métabolisme levurien (Arroyo-López, Orlic, Querol, & Barrio, 2009; Charoenchai, Fleet, & Henschke, 1998; Torija, Rozès, Poblet, Guillamón, & Mas, 2002). Une étude de la réhydratation de Levure Sèche Active (LSA) a également été réalisée permettant un gain de temps de pré-inoculation et une diminution de la quantité apportée en début de process.

Une fois pris connaissance des principaux paramètres influents sur le métabolisme de la levure, de façon à ce que la culture se fasse dans des conditions optimales de croissance, l'apport en oxygène nécessaire à la biosynthèse des stérols et des acides gras insaturés pour maintenir la fonction et l'intégrité de la membrane plasmique et également pour la réplication des cellules a été étudié. Tout ceci pour se rapprocher des conditions physiologiques optimales pour la production efficace de biomasse notamment en milieu hydro-alcoolique (Hulse, 2003; Reed & Nagodawithana, 1988; K. A. Smart, 2003, pp. 265–269). Ensuite une deuxième partie sur les effets de différents débits d'aérations, car il est connu lors de faibles aérations en batch que le métabolisme de fermentation prédomine et le rendement en biomasse diminue (Boulton, 1980; Gómez-Pastor, Pérez-Torrado, Garre, & Matallana, 2011) et empêche l'activation des gènes de réponse au stress oxydatif (Pérez-Torrado *et al.*, 2015). Par conséquent, les dommages cellulaires oxydatifs augmentent si le bioréacteur est ensuite trop fortement aéré pour privilégier la respiration (Gómez-Pastor *et al.*, 2011). Dans cette partie, nous étudierons aussi différentes concentrations en glucose ainsi qu'un essai réalisé sur un milieu moût de raisin en culture discontinue.

Enfin viendra la dernière partie de ce chapitre dans lequel seront exposés les essais fed-batch réalisés à partir du procédé innovant développé durant la dernière phase de ce projet de recherche. La levure étant capable de croître en utilisant un métabolisme fermentaire et respiratoire, tous deux dégageant de la chaleur, la régulation de l'apport en nutriment sera basée sur ce dégagement. Le milieu étant refroidi, il permet par son apport de réguler la température de la culture qui est ainsi maintenue à la température consigne par l'ajout de milieu froid dont le débit est proportionnel au dégagement de chaleur donc à la croissance de la levure. Les objectifs ont été tout d'abord d'optimiser et de développer un procédé de production de micro-organismes dans un milieu hydro-alcoolique, ceci pour simplifier les opérations de préparation de levain pour les opérateurs du monde vinicole, une réflexion toute particulière a été apportée sur la mise au point d'un schéma de conduite simple et robuste.



# Chapitre 1 :

# Synthèse

# bibliographique



## Table des matières

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique.....	7
1. La levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	11
2. Production de boissons alcoolisées grâce à <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	12
2.1. Bières.....	12
2.2. Cidres.....	13
2.3. Vins.....	13
3. Le métabolisme de la levure.....	16
3.1. Besoins nutritionnels.....	16
3.2. Le métabolisme oxydatif.....	18
3.3. Le métabolisme fermentaire.....	18
3.4. Production et consommation de l'éthanol et du glycérol par <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	22
3.5. Production et consommation du glycérol par <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	23
3.6. La transition glycolyse-gluconéogénèse.....	24
4. Paramètres influençant l'activité levurienne.....	24
4.1. La température.....	24
4.2. Le pH.....	25
4.3. Apport en azote.....	25
4.4. L'oxygénation du milieu.....	26
4.5. Le dioxyde de soufre.....	27
4.6. Le dioxyde de carbone dissous.....	27
4.7. Effet glucose fermentation-respiration.....	28
4.8. Notion de stress chez les levures.....	32
5. Cinétique de croissance microbienne.....	36
5.1. Croissance microbienne en culture discontinue (batch).....	36
6. Les différents types de culture.....	38
6.1. Le mode de culture discontinu (batch).....	38
6.2. Le mode de culture discontinu alimenté (fed-batch).....	39
6.3. Le mode de culture continu et à recyclage cellulaire (BRC).....	40
7. Les levures sèches actives commerciales.....	41
8. Le bioréacteur.....	42
8.1. Dimensionnement d'un bioréacteur.....	44
8.2. Les approches de l'extrapolation.....	44
8.3. Les phénomènes de transfert.....	45
9. Production de chaleur lors de la croissance de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	46
9.1. L'énergie de maintenance.....	46
9.2. Energie-chaleur produite lors de fermentation.....	46
9.3. Energie-chaleur produite lors de respiration.....	47



## 1. La levure *Saccharomyces cerevisiae*

La levure *Saccharomyces cerevisiae* occupe une place privilégiée dans les activités de l'homme. De tout temps, les hommes l'ont utilisée sans le savoir, puis peu à peu ont appris à s'en servir pour la production de boissons et produits fermentés (vin, bière, pain et même fromage). De nos jours, cette levure est également largement utilisée comme usine cellulaire pour la production de molécules d'intérêt pour la pharmacie (antibiotiques, vaccins, protéines telles que l'insuline), mais aussi dans la production de synthons pour l'industrie chimique. Les *Saccharomyces* sont utilisées pour la fabrication de la bière depuis plus de 3000 ans, mais ce n'est qu'entre 1857 et 1863 que Louis Pasteur démontre son rôle dans la fermentation alcoolique (FA).

Le nombre de souches vinicoles commercialisées a augmenté de façon très importante au cours des 20 dernières années pour atteindre environ 330 (laVigne-mag.fr). Sauf rares exceptions, il s'agit de *Saccharomyces cerevisiae* (Lallemand™, 2016).

La levure *S. cerevisiae* est un eucaryote unicellulaire d'une taille allant de 4 à 15 µm, renfermant donc un noyau avec un nucléole, des vacuoles, un appareil de sécrétion (Réticulum Endoplasmique, golgi, vésicules de sécrétion) et des mitochondries. C'est le premier eucaryote dont le génome a été complètement séquencé avec ses 6000 gènes (Goffeau *et al.*, 1996). Elle possède une paroi composée de glucane, mannane et protéines. Elle se divise par bourgeonnement permettant la formation de deux cellules de taille inégale et les cicatrices créées lors de la multiplication sont formées de chitine. Son temps de génération (doublement de la population) est d'environ 3 h à 28°C en conditions optimales. Le cycle de vie de la levure au cours des divisions n'est pas infini ; les cellules vieillissent, puis meurent après 30 à 40 bourgeonnements, elle peut présenter un métabolisme aérobie (respiration) ou anaérobie (fermentation) suivant les conditions du milieu.

La levure est un champignon faisant partie du règne des Fungi, ascomycète unicellulaire, aérobie-anaérobie facultatif ; la classification étant en évolution rapide, nous présentons dans la Figure 1 suivante une des classifications possibles à partir de la division *Ascomycota*, puis sous-division *Saccharomycotina*, classe *Saccharomycetes*, ordre *Saccharomycetales* et Famille *Saccharomycetaceae*.



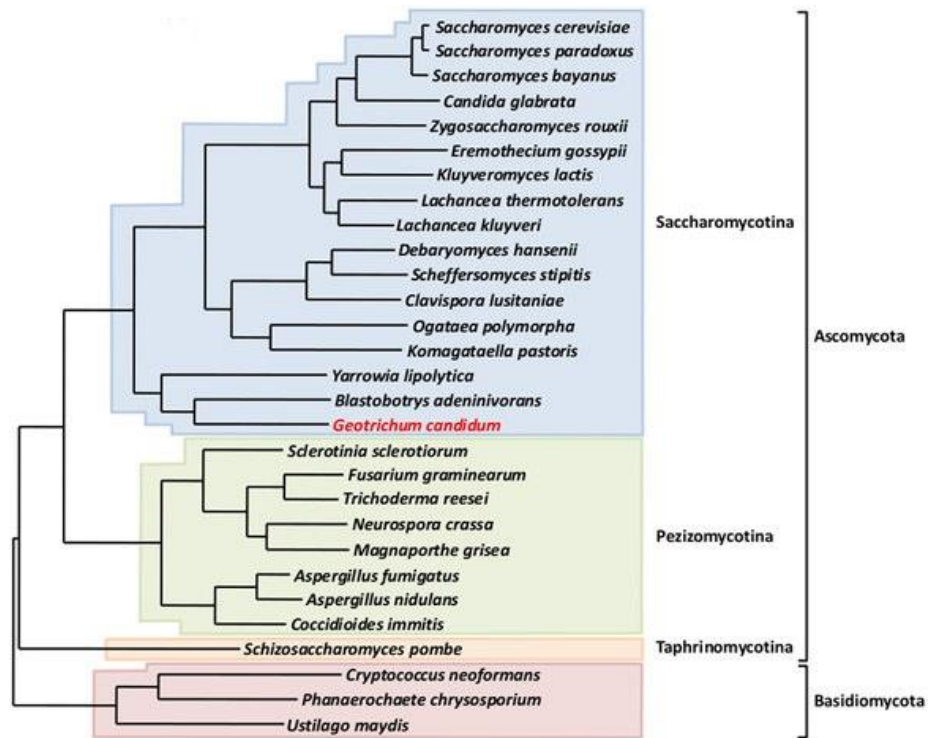


Figure 1 : Schéma phylogénétique de la levure *Saccharomyces cerevisiae* d'après (Morel et al. 2015)

## 2. Production de boissons alcoolisées grâce à *Saccharomyces cerevisiae*

### 2.1. Bières

Pour obtenir le moût qui servira de milieu nutritif à la levure, la céréale (orge, froment, avoine, blé, seigle, maïs, ou riz), matière première non fermentescible par la levure, est mise à germer, ce qui provoque la décomposition de l'amidon en sucres, notamment le maltose, grâce à des enzymes sécrétées par la céréale elle-même. La céréale ainsi transformée s'appelle malt. Les enzymes ne sont qu'en partie dégradées par la chaleur. Cette opération s'appelle le touraillage. Le malt ainsi produit est chauffé avec du houblon pour les bières européennes ou américaines, dans l'eau pour dissoudre les sucres produits. Le mélange après avoir été clarifié estensemencé de levure, démarrant ainsi le processus de fermentation en décomposant le maltose en éthanol et dioxyde de carbone.

Deux types de levures sont utilisés : *Saccharomyces cerevisiae* pour la fermentation haute, menée autour de 20 °C, où la levure retient une partie du gaz et finit par flotter à la surface et *Saccharomyces uvarum* et *pastorianus* pour la fermentation basse, menée au-dessous de 10 °C, la levure se dépose et s'accumule alors en fond de cuve en fin de fermentation, d'où leur nom. L'éthanol et le dioxyde de carbone restent dans la bière ce qui lui donnera son pétillant et sa mousse (Association des Brasseurs de France, 2016; Brasseurs de France, 2016; Univers biere, 2016). *Saccharomyces cerevisiae* se singularise par le fait que le transport du maltose demeure

élevé en aérobiose et que la respiration se situe à un niveau suffisamment bas pour que la fermentation aérobie puisse avoir lieu.

## 2.2. Cidres

La fabrication débute après la récolte en écrasant ou en broyant les pommes afin que le jus puisse plus facilement être extrait lors de l'étape suivante, le pressurage, qui consiste à exercer une forte pression sur les pommes broyées afin d'en extraire le jus.

A noter que tout comme lors du pressurage du raisin, le résidu de pomme pressée obtenu s'appelle le « marc », il est bien souvent considéré comme un déchet au même titre que les sous-produits de fermentation en brasserie qui ne sont que très peu traités alors que les graines solides restantes, les peaux et la pulpe contiennent encore de nombreux composés, polyphénols et antioxydants, aux multiples vertus et des molécules pouvant être utilisées en alimentation animale et comme matières premières en bio-raffinerie (Xiros & Christakopoulos, 2012).

Le jus sucré obtenu après le pressurage des pommes fermente rapidement et est entreposé dans une cuve à une température d'environ 15°C dans un environnement sec en contact avec de l'air. Après quelques semaines, des étapes simples de purification sont réalisées (soutirage, défécation ou clarification).

Le moment de la mise en bouteille arrive avec une seconde fermentation pour les cidres dits « fermiers » qui entraînera la « prise de mousse » (la formation de bulles) ; pour les cidres industriels clarifiés, des levures sont ajoutées et leur développement est contrôlé très précisément par le biais de la température, ce qui permettra d'arriver au produit souhaité (doux, brut, traditionnel...), puis du gaz carbonique est injecté au moment de la mise en bouteille (Pole Fruitier de Bretagne, 2016; Veron, 2006).

## 2.3. Vins

### 2.3.1. Vins tranquilles

La matière première pour la fabrication du vin est le jus de raisin. La levure peut fermenter ce dernier jusqu'à une concentration de 250 g/L de saccharose ; au-delà, comme vu précédemment, la pression osmotique est trop importante et endommage les cellules. De la même façon la concentration en éthanol que la levure peut supporter (140 g/L soit environ 18% vol.) est limitée (Ribéreau-Gayon, Glories, Maujean, & Dubourdieu, 2006). En fin de vinification, une atmosphère réductrice est souvent maintenue, par isolation de l'air, afin que l'acétaldéhyde soit hydrogéné en éthanol, entraînant une légère production d'éthanol supplémentaire. Ceci permet d'éliminer l'acétaldéhyde, molécule extrêmement toxique pour les cellules (réaction spontanée à pH7 avec les groupements NH<sub>2</sub> des protéines rendant ces dernières inactives) et a aussi l'avantage d'empêcher l'oxydation des arômes, ainsi que l'oxydation de l'alcool en acide acétique par des bactéries. (Fugelsang & Edwards, 2007; Nerantzis, Tataridis, Sianoudis, Ziani, & Tegou, 2007).

En 2015, la production mondiale de vin, hors jus et moûts, atteignait 275,7 millions d'hectolitres, en légère hausse de 2% par rapport à 2014, selon les premières estimations de l'Organisation Internationale de la vigne et du vin (OIV), mais plutôt stable sur les dix dernières années.

La production des vins tranquilles dans le monde reste stable et représente encore la majeure partie de la production de vins, environ quinze fois plus que les vins effervescents (275 contre 18 millions) (Bechet, 2016). Les chiffres montrent tout de même une légère tendance des consommateurs à moins consommer de vins tranquilles (FranceAgriMer, 2016b).

A noter que la consommation des vins bio augmente de 13% par an ces dernières années (Vignes et vins magazine).

### **2.3.2. Vins effervescents**

Il existe différents types de vins effervescents : les vins mousseux, les vins pétillants et les vins perlants. La distinction entre ces derniers s'effectue sur la base de la surpression en bouteille (ou autre conditionnement) due au gaz carbonique introduit ou produit lors de la fermentation, selon la méthode d'élaboration. Selon la réglementation européenne, la surpression doit, pour les vins mousseux, être supérieure à 3 bars et pour les vins pétillants, être comprise entre 1 et 3 bars. Non définis dans la réglementation, les vins perlants sont difficiles à identifier ; par défaut, ils accusent en bouteille une surpression inférieure à 1 bar (Brebant, 2016; FranceAgriMer, 2016a).

La fabrication des vins mousseux qui représentent la majeure partie des vins effervescents, repose dans un premier temps sur la même méthode que celle d'un vin tranquille auquel on fait subir une seconde fermentation alcoolique par l'ajout de levures et de sucre (Figure 2). Lors de cette seconde fermentation en vase clos, la concentration en éthanol augmente et le dioxyde de carbone produit est dissous dans le liquide, grâce à une augmentation de la pression du gaz surnageant ; ceci donnera les bulles bien connues des vins effervescents, produites lors du débouchage et de la détente à la pression atmosphérique du vin.

Sur l'année 2014, la France a exporté 1,65 million d'hectolitres, soit 50% de la production nationale de vins effervescents, dont 70% de champagne, ce qui représente en volume presque un quart des exportations mondiales. Les principaux importateurs de vins effervescents français sont le Royaume-Uni (20% des volumes exportés), les Etats-Unis (14%) et l'Allemagne (un peu moins de 14%).

En 2014, la production de vins effervescents a suivi la tendance de la production mondiale de vins. La part des vins effervescents représente environ 7 % de la production totale de vins dans le monde, avec une légère augmentation depuis plusieurs années. Cette production annuelle atteint en moyenne 18 millions d'hectolitres ces dernières années, ce qui représente un peu plus de 2,5 milliards de cols.

D'après le dernier rapport de FranceAgriMer (2016), la consommation mondiale de vins effervescents continue de croître, plus rapidement que celle des vins tranquilles. Elle représente 17,6 millions d'hL en 2014, soit une croissance de 4,1% entre 2005 et 2014, alors que sur la même période la croissance de la consommation de vins tranquilles n'est que de 1,3%. Les vins effervescents représentent 7% de la consommation globale de vins dans le monde, cette tendance est très encourageante pour la filière française de production de vins effervescents, et la Champagne en tout premier lieu.

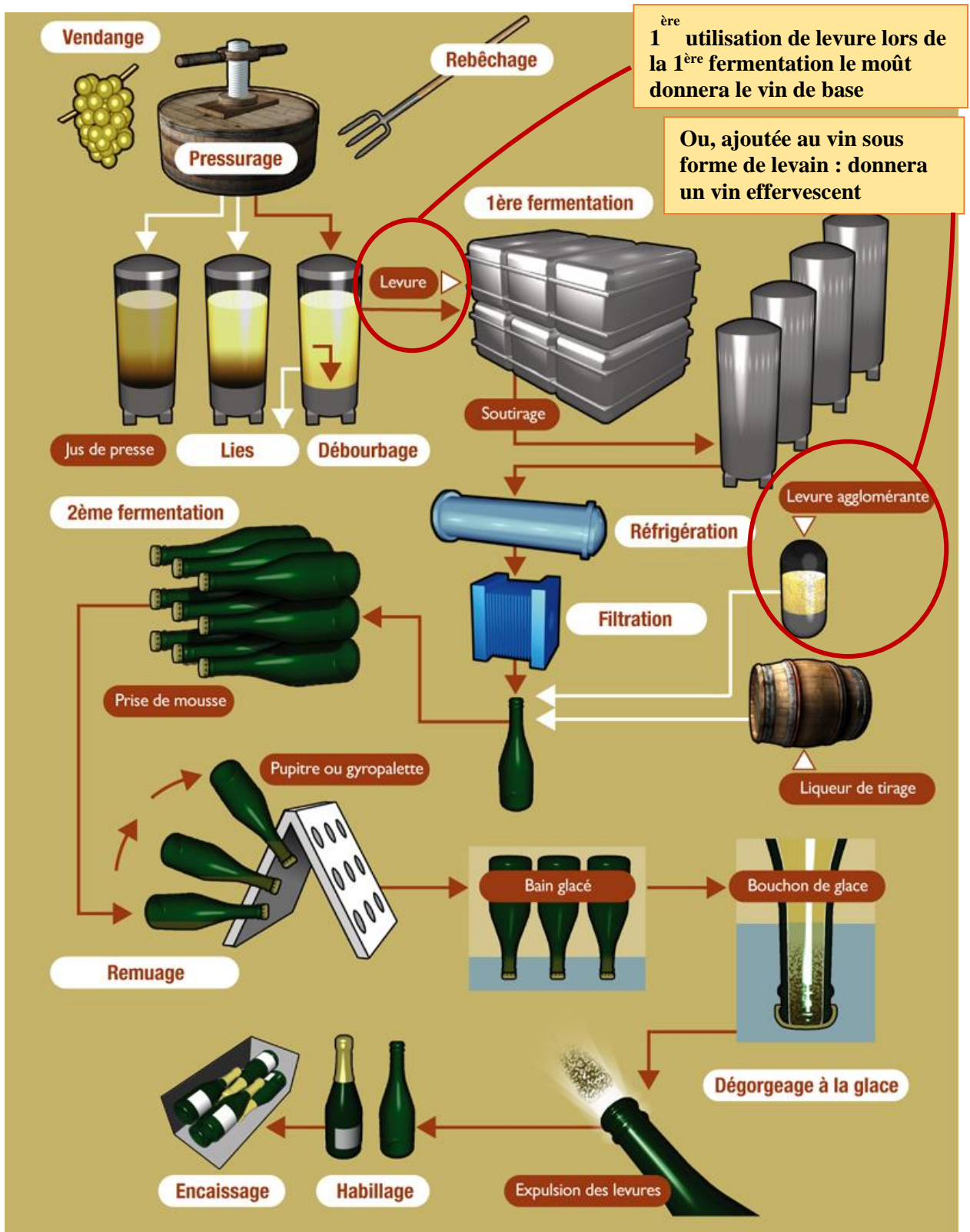


Figure 2 : Schéma de l'élaboration traditionnelle des vins effervescents en bouteille, d'après Breban (2016).

### 3. Le métabolisme de la levure

Le principal métabolisme de la levure est le métabolisme carboné central comprenant la glycolyse, la voie éthanol, le cycle de Krebs ou cycle de l'acide citrique (Tricarboxylic Acid (TCA) cycle) et la voie des pentoses phosphates. Le fonctionnement du métabolisme reste cependant relativement méconnu du fait de sa complexité avec ses nombreuses réactions et voies interconnectées, le produit de l'une étant souvent le réactif de l'autre. De plus, en fonction de la disponibilité en oxygène, *S. cerevisiae* étant un micro-organisme aérobie facultatif et Crabtree positif (cf. définition 4.7.2, page 28), elle présente la caractéristique de convertir rapidement les sucres en éthanol et dioxyde de carbone, à la fois en conditions anaérobies et aérobies.

La production de biomasse à partir de *Saccharomyces cerevisiae* est un procédé aérobie nécessitant un catabolisme oxydatif du substrat. Néanmoins, *S.cerevisiae* peut également présenter un métabolisme mixte qui lui permet de réaliser simultanément suivant différentes proportions la respiration et la fermentation en milieu aérobie quand la concentration en glucose dépasse un seuil critique. En métabolisme respiro-fermentaire, seulement un peu plus de 3 % des atomes de carbone sont « respirés » (Gancedo, 1998; Rodrigues, Ludovico, & Leão, 2006; Van Dijken, Weusthuis, & Pronk, 1993). Ce phénomène appelé effet Crabtree provoque une production d'éthanol même en présence d'oxygène, ainsi qu'une baisse du rendement de conversion du glucose en biomasse dont nous parlerons dans le paragraphe 4.7.2 (page 28).

#### 3.1. Besoins nutritionnels

Pour se développer la levure *Saccharomyces cerevisiae* a besoin d'une source carbonée (sucres, glycérol ou éthanol principalement) et d'autres composés en plus faibles quantités tels que, par ordre d'importance décroissant, l'azote, le phosphore et le soufre. La levure est capable d'assimiler le phosphate et le soufre inorganiques, elle est donc autotrophe pour ces éléments.

Viennent ensuite plus généralement :

- Les micronutriments, substances sans valeur énergétique, mais indispensables en très petites quantités au fonctionnement du métabolisme ; ils servent principalement de cofacteurs aux enzymes. Ils regroupent certains acides aminés que la levure ne sait pas synthétiser, les vitamines et les oligoéléments ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{Se}^{2-}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , ...). Ces derniers sont actifs à de très faibles concentrations (0,1 à 100  $\mu\text{M}$ ), mais inhibiteurs au-dessus d'une certaine concentration (10 à 100 mM) (Dombek & Ingram, 1986).

- Les macronutriments, substances requises en plus grande quantité (0,1 à 1mM) car servant à la structure de la levure et comme source d'énergie. On y retrouve de nombreux acides aminés, les protéines, lipides, glucides et minéraux ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{P}^{3-}$ ,  $\text{S}^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ , ...).

Parmi les espèces majeures présentes dans un milieu de culture, on s'attardera plus spécifiquement sur l'azote, le phosphore et le soufre.

Chez les levures, un peu moins de 10% de la masse sèche de la cellule est de l'azote ; celui-ci doit donc être présent dans le milieu de culture pour être assimilé (Thomas & Ingeldew, 1992). Dans les conditions de fermentation habituelles, une quantité importante d'azote extracellulaire est apportée sous forme de sels d'ammonium (phosphate, sulfate ou chlorure).

Le phosphore est très souvent assimilé sous forme de phosphate inorganique, l'ion  $\text{PO}_4^{2-}$  est la source de phosphate la plus facilement assimilable, son assimilation se fait toujours via l'ATP synthétase selon la réaction :  $\text{ADP} + \text{PO}_4^{2-} \Rightarrow \text{ATP}$

Cette réaction se rencontre dans plusieurs étapes du métabolisme : en aérobiose lors du rééquilibrage de la force proton motrice de la chaîne respiratoire, en anaérobiose lors de la fermentation alcoolique et dans tous les cas lors de la glycolyse. De plus, sous l'effet d'enzymes de type phosphotransférase, des groupes  $\text{PO}_4^{2-}$  peuvent être transférés à partir d'ATP ou de phosphoénolpyruvate (PEP) (Annexe 1 : Métabolisme carboné central de *Saccharomyces cerevisiae*, d'après Larpent (1990)).

Enfin le soufre organique provient des acides aminés soufrés mais généralement le soufre est assimilé plutôt sous forme inorganique, la seule forme utilisée par la levure étant  $\text{SO}_4^{2-}$ .

On alimente la culture la plupart du temps avec du sulfate d'ammonium ( $(\text{NH}_4^+)_2\text{SO}_4^{2-}$ ) qui apporte simultanément soufre et azote ; si le milieu contient de l'azote aminé on met du phosphate diammonique ( $(\text{NH}_4^+)_2\text{HPO}_4^{2-}$ ) pour apporter du phosphate (cas usuel dans les fermentations viniques, des  $\text{SO}_2$  étant apportés lors du sulfitage des moûts).

Eléments nécessaires à la croissance de <i>S. cerevisiae</i>		
Elément	Sources	Fonctions cellulaires
<b>Carbone</b>	sucres simples, polysaccharides, acides gras	Elément structural en combinaison avec O, H et N; source d'énergie du métabolisme
<b>Oxygène</b>	air/ $\text{O}_2$	Oxydant de la chaîne respiratoire, synthèse des stérols
<b>Azote</b>	sels d'ammonium, urée, acides aminés	Composant des protéines et enzymes
<b>Phosphore</b>	phosphates	Acides nucléiques, phospholipides, transduction d'énergie
<b>Hydrogène</b>	hydrates de carbones, protons de l'environnement acide, etc.	Régulation du pH intracellulaire, force proton-motrice
<b>Soufre</b>	sulfates, méthionine	Acides aminés et vitamines protéines FerSoufre
<b>Potassium</b>	sels de potassium	Equilibre ionique, activité enzymatique
<b>Magnésium</b>	sels de magnésium	Activité enzymatique
<b>Calcium</b>	sels de calcium	Transduction de signal
<b>Cuivre</b>	sels de cuivres	Oxydant
<b>Fer</b>	sels de fer	Cytochromes/protéines FerSoufre
<b>Manganèse</b>	sels de manganèse	Activité enzymatique
<b>Zinc</b>	sels de zinc	Activité enzymatique

Tableau 1 : Sources et fonctions des éléments essentiels, d'après (Salma, 2013)

Pour obtenir un taux de croissance maximal, il est nécessaire d'ajouter des facteurs de croissance tels que des vitamines que la levure ne sait pas synthétiser (biotine et thiamine par exemple).

Pour se nourrir la levure puise dans le milieu de culture les éléments indispensables présents, qui sont stockés, dans la vacuole principalement, soit complexés par des chélatants, soit directement utilisés par les voies anaboliques ou cataboliques de son métabolisme. Il existe quatre mécanismes qui régulent l'entrée et la sortie des métabolites : la diffusion simple, la diffusion facilitée, le transport dans des canaux de diffusion et le transport actif simple ou avec translocation de groupe (cas de l'entrée des sucres, c'est pour cela que l'on trouve du glucose-6-phosphate

(G6P) au départ de toutes les voies métaboliques, le glucose étant phosphorylé en position 6 lors du transport transmembranaire).

### 3.2. Le métabolisme oxydatif

Ce métabolisme permet la multiplication par bourgeonnement ; il s'agit de l'un des métabolismes apportant le plus d'énergie sous forme d'ATP, avec un rendement cellulaire important. Il repose sur la production de biomasse et de dioxyde de carbone grâce à l'oxydation complète du glucose via les voies métaboliques de la glycolyse (Figure 4 et Annexe 1 : Métabolisme carboné central de *Saccharomyces cerevisiae*, d'après **Larpent (1990)**), du cycle de Krebs (Figure 4 et Annexe 2 : Détail du métabolisme carboné central de la mitochondrie d'après **Larpent (1990)**) et de la phosphorylation oxydative. Pour cela, la concentration en oxygène disponible doit être la plus élevée possible tandis que la concentration en substrat doit être constante, mais plutôt faible (50 à 150 mg/L environ) (Larpent, 1990; Sanchez Gonzalez, 2008).

En métabolisme oxydatif, le rendement de production de biomasse théorique est, à son maximum, de l'ordre de 0,5 g de matière sèche/gramme de glucose consommé, le quotient respiratoire ( $QR = \frac{\text{quantité de dioxyde de carbone}}{\text{quantité de dioxygène}}$ ) est voisin de l'unité et l'éthanol n'est détecté qu'à l'état de traces (Käppeli, 1986; Käppeli & Sonnleitner, 1986; Larpent, 1990). Dans ces conditions, les cofacteurs réduits NADH et FADH<sub>2</sub> produits par la glycolyse et le cycle de Krebs sont réoxydés au niveau de la chaîne respiratoire (Celton, 2011; Ehsani, Fernández, Biosca, & Dequin, 2009).

L'équation suivante présente le bilan global théorique de cette voie métabolique :



### 3.3. Le métabolisme fermentaire

Le métabolisme fermentaire est réalisé en absence d'oxygène, le rendement de conversion de biomasse à partir du glucose est divisé par 5 par rapport aux conditions aérobies et 18 fois moins d'ATP est produit (Bakker *et al.*, 2001; C. Verduyn, Stouthamer, Scheffers, & Van Dijken, 1991).

La glycolyse, étape commune à la fermentation et à la respiration, produit 2 moles d'ATP, 2 moles de pyruvate et 2 moles de NADH à partir de la dégradation d'une mole de glucose. La conversion du pyruvate en éthanol permet de réoxyder une molécule de NADH (Annexe 1 : Métabolisme carboné central de *Saccharomyces cerevisiae*, d'après Larpent (1990)). Du point de vue oxydo-réduction, le bilan de la transformation de glucose en éthanol est nul.

L'équation globale de la fermentation est la suivante :



Pour ce métabolisme, le rendement théorique de conversion du glucose en éthanol est de 0,511 g éthanol/g glucose (Jacobson, 2006; Jacques, Lyons, & Kelsall, 2003, p. 163), mais la formation de composés secondaires, les réactions de maintenance et la synthèse des constituants cellulaires le limitent en pratique dans une gamme de 0,1 à 0,5 g éthanol/g glucose selon les souches (Käppeli, 1986). Le rendement de glycérol est de 0,027 g glycérol/g glucose à 27°C (Anne-Sophie Aldiguié, 2006), l'un des rôles du glycérol étant de rééquilibrer la balance rédox

de la cellule (Nevoigt & Stahl, 1997), il sera d'autant plus élevé lors de la fermentation par rapport à la respiration.

Le rendement en biomasse, de l'ordre de 10% (0,1 g de matière sèche par gramme de glucose consommé), est beaucoup plus faible qu'en métabolisme oxydatif (0,5 g matière sèche/g glucose) (Käppeli & Sonnleitner, 1986), le restant étant incorporé dans l'éthanol, le glycérol et le pyruvate, parfois même dans le succinate (Fiechter & Seghezzi, 1992). Ce faible rendement peut s'expliquer par la chaîne respiratoire qui ne fonctionne pas en absence d'oxygène ce qui entraîne la production de seulement 2 ATP. La croissance en anaérobiose n'est possible qu'avec les levures sensibles au glucose, mais l'apport d'ergostérol, d'acides gras insaturés et parfois de vitamines (acide nicotinique) est essentiel car ces molécules ne sont pas synthétisées dans ces conditions (Larpent, 1990).

En culture sur milieu non renouvelé, mais aéré, *Saccharomyces cerevisiae* qui est une levure sensible au glucose, montre une croissance de type diauxie (Figure 3). Quand la concentration en glucose est importante au départ, la croissance de la levure devient rapidement élevée atteignant un taux de croissance de 0,40 à 0,45 h<sup>-1</sup>. Le glucose réprime la respiration conduisant à l'accumulation de l'éthanol dans le milieu. Ainsi un rendement en biomasse faible (0,15 g matière sèche/g glucose) et un quotient respiratoire élevé sont les indicateurs d'un métabolisme fermentaire prédominant (Larpent, 1990).

Si plusieurs composés carbonés présents dans le milieu sont assimilés par des voies métaboliques différentes, à des vitesses différentes, on observe alors un phénomène de diauxie qui donne lieu à la courbe de croissance à deux phases (Figure 3).

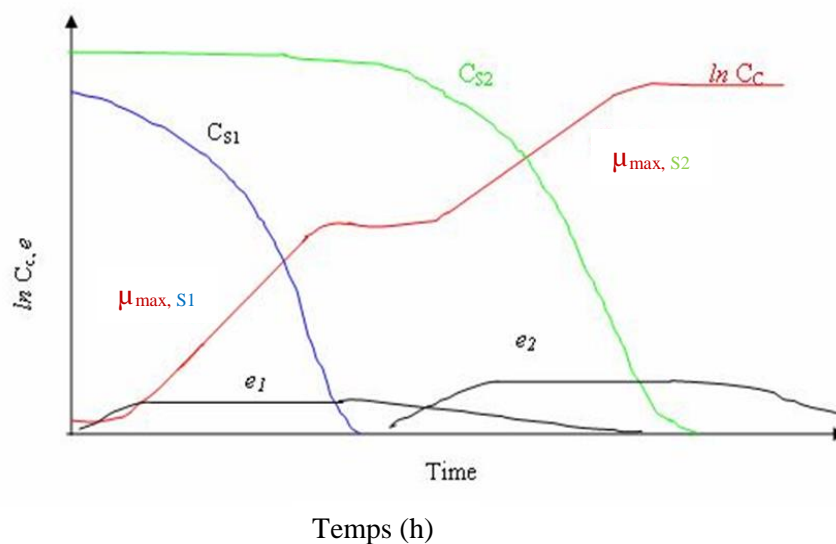


Figure 3 : Représentation de la croissance de la levure dans un milieu contenant deux substrats ainsi que les concentrations des enzymes supposées responsables de la dégradation de chaque substrat ; phénomène appelé diauxie (d'après Kompala et al. 1986).

Dans les cultures avec plusieurs substrats, on observe des taux de croissance différents suivant l'affinité de la levure pour le substrat et donc la vitesse à laquelle il est consommé. Le taux de croissance observé sera donc la moyenne des deux taux de croissance et non leur somme



(Dhinakar S. Kompala, 2013). La source de carbone la plus facilement assimilable sera consommée en premier lieu, donnant un taux de croissance supérieur ( $\mu_{\max, S1}$ ) ; il y aura ensuite une phase d'adaptation des cellules pendant laquelle le pool d'enzymes ( $e_2$ ) permettant de dégrader la deuxième source de carbone sera synthétisé (même si cette phase peut être très brève et difficilement observable) ; enfin la deuxième source de carbone sera consommée. Ce phénomène est rencontré lors de la culture en fermentation continue en présence d'un mélange de substrats et/ou lorsque l'un des produits d'une réaction biologique peut à son tour être consommé ; c'est systématiquement le cas lors de cultures dans du vin ou en milieu hydro-alcoolique supplémenté en glucose ; celui-ci est toujours assimilé en premier et le glycérol ou l'éthanol par la suite.

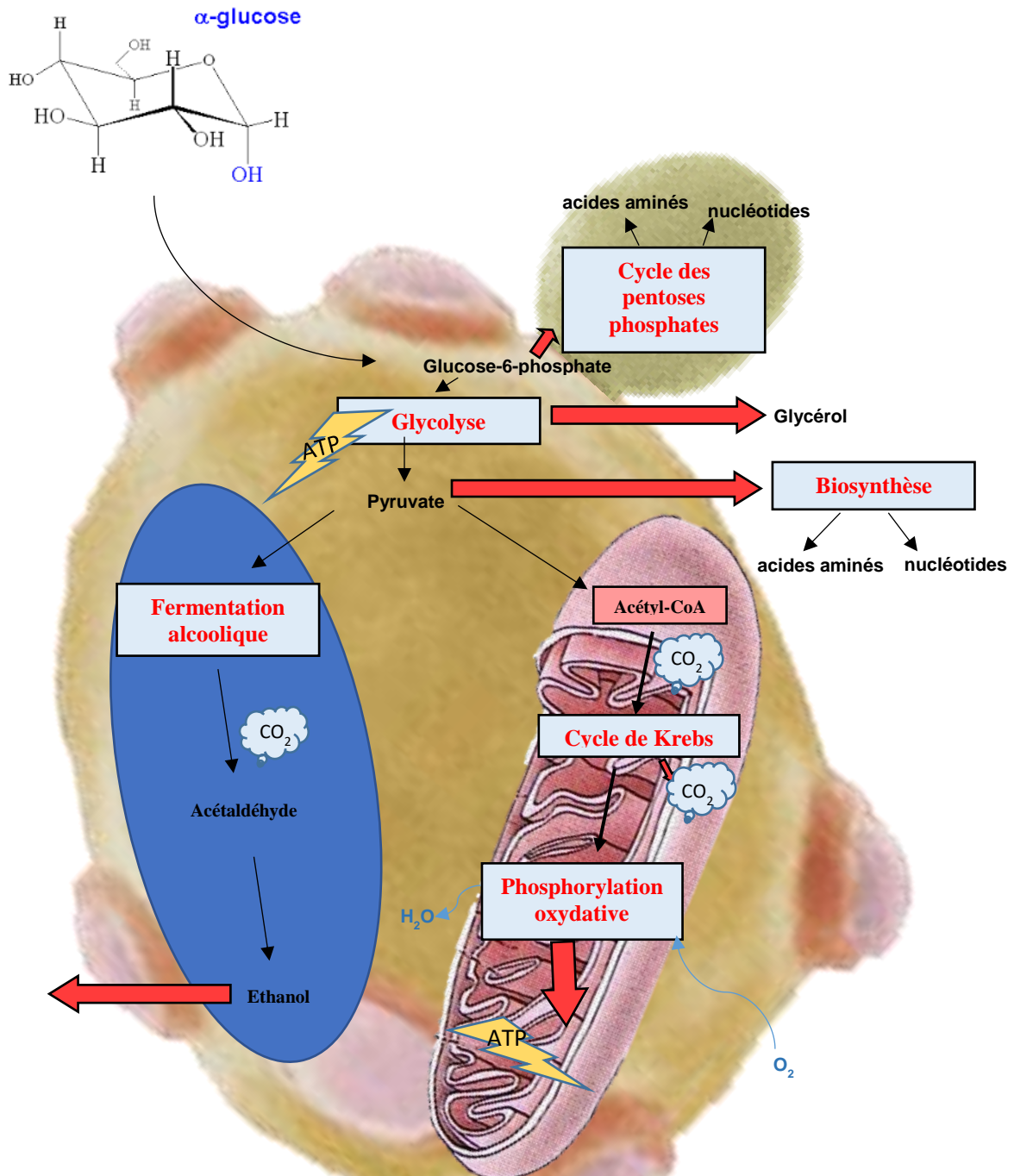


Figure 4 : Schéma métabolique simplifié du glucose chez la levure. Le glucose est oxydé soit par la voie des pentoses phosphates, qui permet de la biosynthèse des produits dérivés des sucres à 5 carbones, soit par la glycolyse. La glycolyse permet la synthèse d'ATP et de pouvoir réducteur (transporteurs activés). Le pyruvate peut être ensuite oxydé par la fermentation (anaérobiose en bleu) ou par la respiration (aérobiose en magenta). La fermentation alcoolique produit de l'éthanol moyennant la consommation de transporteurs activés qui permet de rétablir l'équilibre rédox des cellules. La respiration a lieu dans les mitochondries. Le pyruvate y est totalement oxydé en dioxyde de carbone via l'acétyl-Coenzyme A. Le rendement théorique de la respiration est de 36 molécules d'ATP dont la plupart sont produites dans la membrane interne des mitochondries par la phosphorylation oxydative, qui restaure l'état oxydé des cofacteurs et transporteurs par une cascade de transporteurs d'électrons. Le gradient de protons ainsi créé au travers de la membrane mitochondriale est converti en ATP par l'ATP synthétase (Adapté de (Rodrigues et al. 2006))

### 3.4. Production et consommation de l'éthanol et du glycérol par *Saccharomyces cerevisiae*

La production d'éthanol, en conditions d'aérobiose et de répression par le glucose, est pratiquement similaire à celle en conditions d'anaérobiose. La proportion de carbone métabolisé via l'éthanol est de 46 % en anaérobiose et de 39 % en conditions de répression par le glucose (Fiechter & Seghezzi, 1992).

En présence de dioxygène, lorsque le glucose est épuisé, *S. cerevisiae* réoriente son métabolisme vers la respiration de l'éthanol et du glycérol. Ce processus de respiration des substrats libérés par la fermentation rejoint le phénomène de diauxie et entraîne une croissance en deux temps. La réutilisation des produits de fermentation par la levure en présence de dioxygène peut se comprendre en ayant à l'idée comment ils se sont formés (Annexe 1 : Métabolisme carboné central de *Saccharomyces cerevisiae*, d'après Larpent (1990)). Les réactions qui conduisent à l'éthanol à partir du glucose sont les suivantes :

- la molécule de glucose par le biais de la glycolyse produit deux molécules de pyruvate ;
- l'acide pyruvique est, dans une première étape, décarboxylé en CO<sub>2</sub> et acétaldéhyde, grâce à la pyruvate décarboxylase qui a pour coenzyme la thiamine pyrophosphate ;
- dans une deuxième étape l'acétaldéhyde est réduit en éthanol par l'alcool déshydrogénase, ce qui permet la réoxydation du NADH.

Une fois que le glucose est épuisé, et après quelques heures d'adaptation de la levure à son nouvel environnement, une seconde phase de croissance rapide intervient correspondant à l'utilisation de l'éthanol en tant que substrat avec un rendement élevé (0,6 à 0,7 g de matière sèche par gramme d'éthanol consommé) et un quotient respiratoire faible comme le montre la Figure 5.

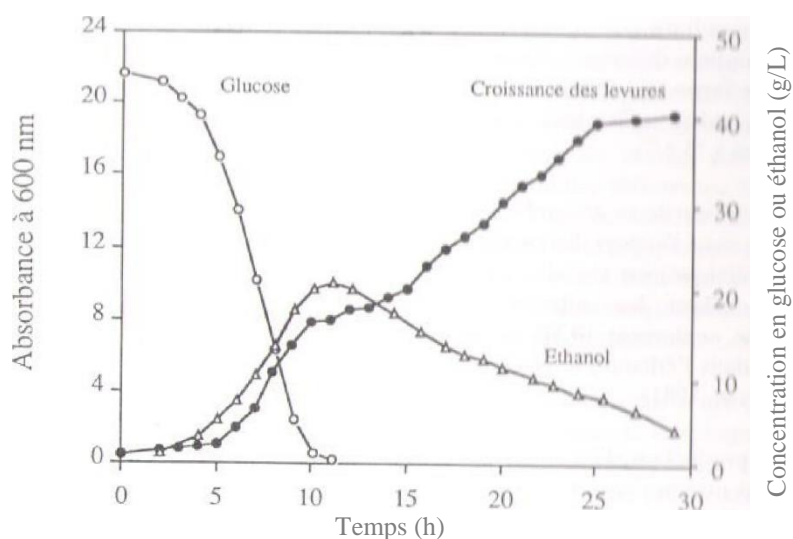


Figure 5 : Représentation de la croissance de la levure dans un milieu aéré non renouvelé contenant 5% de glucose montrant la phase initiale de croissance de type fermentaire durant les 10 premières heures puis une phase de type oxydatif qui utilise l'éthanol produit lors de la première phase (Larpent, 1990).

Dans un premier temps, l'éthanol et l'acétate traversent le plasmalemme des levures par diffusion passive. Cette diffusion est très rapide pour l'éthanol mais lente pour l'acétate à pH neutre contrairement à un pH acide où l'acétate pénètre massivement dans la cellule et entraîne une acidification à l'origine d'une protéolyse généralisée (Larpent, 1990). L'utilisation de l'éthanol implique une première oxydation de l'alcool donnant un acétaldéhyde par l'alcool déshydrogénase, un NADH est produit. Une seconde oxydation transforme l'acétaldéhyde en acétate grâce à l'acétaldéhyde déshydrogénase qui utilise à la fois le NAD et le NADP comme cofacteur.

L'acétate est ensuite condensé par l'acétyl-CoA synthétase en acétyl-CoA qui entre dans le cycle de Krebs (Annexe 2 : Détail du métabolisme carboné central de la mitochondrie d'après Larpent (1990)) producteur d'électrons à haut potentiel de transfert, récupérés à partir des NADH, qui peuvent ensuite circuler à travers la chaîne respiratoire pour permettre à leur tour la formation de molécules d'ATP par la phosphorylation oxydative.

Cette réutilisation de l'éthanol peut aussi conduire en mettant en jeu la voie inverse de la glycolyse, appelée néoglucogénèse, à la synthèse du glucose et d'autres sucres de réserve, comme le tréhalose et le glycogène, retrouvés dans les cellules en phase stationnaire en vue d'une utilisation lors d'une diète carbonée, ceci à partir de l'oxaloacétate provenant du cycle de Krebs. Ces réserves atteignent jusqu'à 30% du poids sec de la levure lors de croissance sur éthanol. Les 2 premières étapes exergoniques de carboxylation du pyruvate sont représentées dans la Figure 6.

La carboxylation du pyruvate s'effectue en 2 étapes.

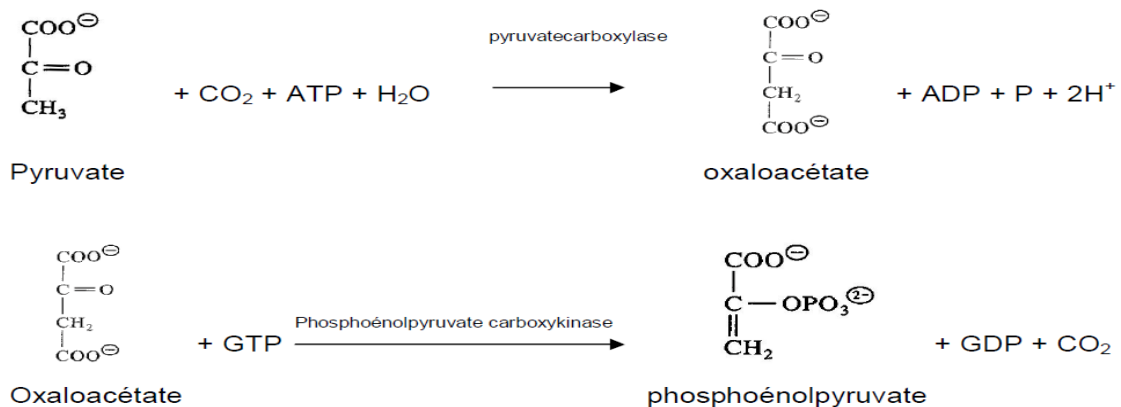


Figure 6 : Premières étapes de la néoglucogénèse avant de remonter la voie de la glycolyse, d'après (Nelson & Cox, 2008)

Une fois remonté au phosphoénolpyruvate les enzymes réversibles de la glycolyse permettront d'obtenir du glucose ou d'autres sucres de réserve, tels que le tréhalose et le glycogène.

### 3.5. Production et consommation du glycérol par *Saccharomyces cerevisiae*

La formation du glycérol se fait par la réduction du dihydroxyacétone phosphate grâce à la glycérol 3-phosphate déshydrogénase utilisant le NADH. (Annexe 1 : Métabolisme carboné central de *Saccharomyces cerevisiae*, d'après Larpent (1990)).

Cette voie fermentaire est souvent en équilibre avec la voie de synthèse de l'éthanol et les conditions défavorisant la production de ce dernier sont celles qui stimulent la formation du glycérol. Le glycérol est un effecteur allostérique de l'alcool déshydrogénase, il diminue la réaction de transformation de l'acétaldéhyde en éthanol. Il augmente l'affinité (diminue le  $K_s$ ) pour l'éthanol et le NAD et diminue celle du NADH, exerçant ainsi un rétrocontrôle qui favorise la réoxydation de l'éthanol (Larpent, 1990).

Le glycérol en plus d'être indispensable à la levure pour synthétiser ses membranes (di et triglycérides), il peut être utilisé comme source de carbone chez beaucoup de levures. Ce produit pénètre par diffusion passive à travers la membrane plasmique puis est phosphorylé par une glycérol kinase et est oxydé par la glycérol 3-phosphate déshydrogénase, ce qui constitue la voie inverse de la fermentation (Annexe 1 : Métabolisme carboné central de *Saccharomyces cerevisiae*, d'après Larpent (1990).

### **3.6. La transition glycolyse-gluconéogenèse**

La synthèse des glucides à partir du pyruvate ou de divers composés carbonés non glucidiques est un processus physiologique important. La gluconéogenèse utilise toutes les enzymes qui sont réversibles dans la glycolyse ; toutefois, les réactions catalysées par la phosphofructokinase et la pyruvate kinase sont fortement exothermiques et constituent des barrières énergétiques importantes au fonctionnement inverse du cycle glycolytique dans les conditions physiologiques. Deux enzymes permettent de franchir ces étapes, il s'agit de la fructose 1, 6- bisphosphatase qui convertit le fructose 1, 6-biphosphate en fructose 1,6- diphosphate et de la phosphoénolpyruvate carboxykinase qui, en liaison avec la pyruvate carboxylase, convertit en deux réactions le pyruvate en phosphoénolpyruvate (Figure 6).

## **4. Paramètres influençant l'activité levurienne**

### **4.1. La température**

La température joue un rôle important sur la croissance et la viabilité des levures, la production d'éthanol et les rendements de conversion du substrat (Gervais & Martinez de Maranon, 1995).

En milieu vinicole, le démarrage de la fermentation alcoolique par les levures indigènes est spontané si la température du moût est supérieure à 15°C. Ensuite la fermentation provoque un dégagement de chaleur, augmentant la température du milieu. Mais si le moût est trop chaud (au-delà de 35°C), les levures risquent de stopper le processus fermentaire. On régule donc la température pour vinifier entre 28 et 32°C pour les vins rouges et entre 18 et 20 °C pour les vins blancs (Sablayrolles et Barre, 1993).

Entre 15 et 25°C, la vitesse de fermentation est doublée lorsque la température est augmentée d'environ 8°C (Bely *et al.* 1990). L'effet est donc très significatif lorsque la température passe de 15 à 22°C pendant la deuxième partie de la fermentation (après la phase de croissance exponentielle) ; la durée de fermentation passe alors de 23 à 16 jours (Sablayrolles et Salmon, 2010).

Cependant, d'après Dominique Delteil de l'Institut Coopératif du Vin (ICV) de Montpellier, une température de fermentation élevée, de l'ordre de 28°C, entraîne une accumulation d'alcool dans la cellule, liée à une vitesse de production supérieure à la vitesse d'excrétion, plus particulièrement lorsque le niveau en sucre est élevé. Cette accumulation altère la membrane, même si la concentration alcoolique dans le jus reste assez basse. Cette accumulation précoce d'alcool dans la cellule affectera et limitera la résistance de la cellule au stress en fin de fermentation. Dans le jus de raisin, même si la vitesse de multiplication des cellules atteint son maximum à 28°C, on gardera une température inférieure à 25°C pendant le premier tiers de la fermentation afin d'éviter une accumulation excessive d'alcool dans la cellule. Eviter une production rapide d'alcool permet également une plus grande extraction et diffusion en phase aqueuse des tanins et des polysaccharides hydrophiles contenus dans les baies et rafles lors de vinification en rouge.

Une étude réalisée par Aldiguier *et al.* (2004) montre l'évolution des rendements chez *Saccharomyces cerevisiae* en fonction de la température lors de culture fed-batch aérée. D'après cette étude, les rendements substrat/biomasse ( $Y_{X/S}$ ) et substrat/éthanol ( $Y_{P/S}$ ) ne subissent pas de la même façon l'augmentation de la température.

Le rendement  $Y_{X/S}$  décroît au fur et à mesure que la température augmente à partir de 27°C, la température minimale testée alors que le rendement  $Y_{P/S}$  augmente jusque 33°C puis diminue jusqu'à la température maximale testée (39°C) (A-S Aldiguier *et al.*, 2004).

## 4.2. Le pH

Le pH optimal pour la croissance de la levure est de 5 à 5,2 mais les souches utilisées lors des fermentations sont capables de pousser à des pH compris entre 3,5 et 6 d'après Russell (2003).

Le pH des vins est généralement compris entre 3,2 et 3,8. Il dépend de la concentration des ions  $H_3O^+$  contenus dans le vin qui varie en fonction du millésime, des disponibilités en eau lors de la maturation de la baie de raisin, du rendement de la vigne et du cépage. La mesure du pH ne reflète pas l'acidité totale du vin car des protéines et de nombreux acides faibles (notamment L-malique et L(+) tartrique) sont présents et exercent un effet tampon.

Compte tenu de ce qui est noté dans la bibliographie, les levures peuvent donc croître dans un vin pas trop acide.

## 4.3. Apport en azote

Lors de l'arrêt de la phase de croissance dans la plupart des fermentations vinicoles, 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 assimilables (principalement acides aminés et azote ammoniacal) à l'intérieur des levures. On peut cependant retenir que l'azote ammoniacal est assimilé rapidement en même temps que les acides aminés les plus facilement assimilables (Ala-Arg-Asn-Asp-Glu-Leu-Val). 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 (Magasanik & Kaiser, 2002).

De plus d'autres études réalisées par la société Lallemand<sup>TM</sup> et l'Institut Œnologique de Champagne ont montré que l'azote ammoniacal seul (sulfate ou phosphate diammonique (DAP)) est assimilé trop rapidement pour permettre une croissance optimale des levures dans le moût, ce qui engendre des stress. Il est plutôt recommandé de réaliser un apport en nutriment complexe

composé à la fois d'azote aminé, absorbé par les levures dans la durée, et d'azote ammoniacal, de vitamines (dont la thiamine) et de minéraux avec un complément en oxygène facilitant l'assimilation de l'azote par la levure.

Bien que *S. cerevisiae* soit capable de synthétiser *de novo* la thiamine, le manque de thiamine exogène dans le milieu peut ralentir ou bloquer la fermentation (Bataillon *et al.* 1996) ; de plus la levure n'est pas capable d'utiliser la proline en conditions anaérobies. Seuls certains acides aminés et peptides simples (jusqu'à 6 acides aminés) sont métabolisables, Bell & Henschke 2005; Ingledew *et al.* 1987; Bataillon *et al.* 1996 insistent sur la nécessité de maîtriser les ajouts azotés de sorte à rester dans une fourchette acceptable d'azote assimilable disponible pour les levures :

- Si les quantités sont trop faibles, il y a production excessive de composés soufrés indésirables (comme H<sub>2</sub>S) et d'alcools supérieurs alors que la synthèse d'esters est limitée. 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 (Morakul, 2011).
- Si les quantités sont excessives les concentrations en acétate d'éthyle et en acide acétique produits augmentent. Ces risques liés aux quantités excessives d'azote doivent être d'autant plus pris en considération que l'ajout maximal autorisé a été augmenté ces dernières années, de 300 à 1000 mg/L de DAP (soit de 63 à 210 mg/L d'azote).

#### 4.4. L'oxygénation du milieu

La concentration en oxygène dissous dans le milieu de culture est un paramètre important dans l'orientation du métabolisme du micro-organisme. La multiplication des levures est fortement accélérée en milieu aérobie. C'est pourquoi, lors de la fabrication du vin, le moût est aéré par un passage dans un bac à l'air libre. En effet l'oxygène est indispensable à la survie et au développement des levures en favorisant leurs échanges avec le moût, en accroissant la perméabilité des membranes cellulaires et en permettant la dégradation complète du glucose par le biais de l'inhibition de la phosphofructokinase. L'oxygène intervient aussi dans la synthèse de l'ergostérol, un stérol membranaire des levures, il ne peut pas être synthétisé en absence d'oxygène et limite donc la croissance en anaérobiose, lors de carence en dioxygène (seules 3 divisions cellulaires sont possibles après passage d'un milieu oxygéné à un milieu anoxique).

*A contrario* l'absence d'oxygénation du levain et sa conservation au froid permettent de stabiliser la population levurienne.

A noter que l'oxygène dissous est consommé très rapidement ; sa concentration devient quasi nulle après seulement 30 heures de croissance, s'il n'est pas apporté en continu (Russell (2003)). Une micro-oxygénation en continu est recommandée ; en effet une étude menée en cuves par Gilis *et al.* (1999), a montré qu'un apport ponctuel mais important d'oxygène pouvait accélérer la croissance de levures indésirables du genre *Brettanomyces* qui donnent des odeurs phénolées au vin ; elles produisent des molécules aromatiques de type 4-éthylgâïacol (odeurs d'écurie ou de médicament rappelant l'eucalyptus).

L'apport de faibles quantités d'oxygène dans la culture peut permettre une meilleure tolérance à l'éthanol d'après Ryder & Sinclair (1972); Ryu *et al.* (1984).

A une température de 20°C et en équilibre avec l'air, la concentration en oxygène dissous en milieu aqueux ne peut pas dépasser 8,96 mg/L (ce qui représente 100% d'O<sub>2</sub> dissous par rapport à l'équilibre avec l'air).

#### 4.5. Le dioxyde de soufre

Dans l'industrie agroalimentaire, le dioxyde de soufre (SO<sub>2</sub>) est un composé antimicrobien et, plus particulièrement en vinification, l'additif le plus utilisé comme conservateur. Les processus de fermentation ont été considérablement améliorés suite à l'utilisation du SO<sub>2</sub>, en inhibant la croissance des bactéries et des levures indésirables. Tous les micro-organismes et notamment les bactéries et levures indésirables semblent être plus sensibles à l'action du SO<sub>2</sub> que la levure *S. cerevisiae* (Fugelsang & Edwards, 2007).

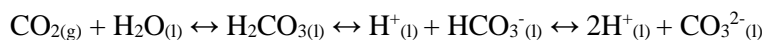
La dose de SO<sub>2</sub> à employer dépend à la fois de la population initiale, de la population finale et du temps que l'on accepte pour s'en débarrasser. Suivant les pH et concentrations, le SO<sub>2</sub> est soit fongistatique aux pH élevés et à faibles concentrations, soit fongicide aux faibles pH et à des concentrations élevées (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Dans la littérature, il est souvent décrit l'effet du SO<sub>2</sub> sur l'induction de l'état viable non cultivable (VNC) chez les eucaryotes, notamment chez la levure *S. cerevisiae*.

#### 4.6. Le dioxyde de carbone dissous

La concentration de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) dans le milieu peut varier en fonction de différents paramètres physico-chimiques tels que le pH ou la température (Aguilera *et al.* 2005).

Le dioxyde de carbone présent dans le ciel gazeux du réacteur et celui produit *in situ* par les réactions biologiques peuvent être dissous dans le milieu liquide sous forme d'acide carbonique (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), de bicarbonate (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) ou de carbonate (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) (Debs-Louka *et al.* 1999). Les réactions acido-basiques en jeu sont les suivantes :



Les indices g et l représentent respectivement les phases gazeuse et liquide.

D'après Aguilera *et al.* (2005) la présence de CO<sub>2</sub> dans le milieu inhibe la croissance de la biomasse. Différentes explications sont proposées : modification de composition des membranes cellulaires qui entraîne un désordre au niveau de la balance des électrons, inactivation des enzymes, inhibition du métabolisme cellulaire dû à la diminution du pH (intra et extracellulaire) et enfin effet inhibiteur direct sur la métabolisation des molécules dissoutes (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) pouvant entraîner une modification des composants vitaux de la levure.

Par contre d'autres auteurs montrent que le CO<sub>2</sub> peut être aussi bien activateur qu'inhibiteur du métabolisme de la levure (Hirasawa *et al.* 2007; Kunkee & Ough 1966). En effet le CO<sub>2</sub> initie les voies anapérotyques à faible concentration ; Jones & Greenfield (1982) ont montré que le rendement de conversion du substrat augmentait de 25 % lors d'une croissance en aérobiose sur glucose sous une pression partielle de 0,2 bar de CO<sub>2</sub>, par rapport à une pression partielle standard de CO<sub>2</sub> (3,89 10<sup>-4</sup> bar). Cependant une augmentation trop importante de la pression partielle en gaz carbonique semble entraîner une chute de la viabilité cellulaire (Ben Chaabane, 2006).



## 4.7. Effet glucose fermentation-respiration

Le glucose joue un rôle important dans le mode de fonctionnement de la cellule en présence d'oxygène. La respiration cellulaire est réalisée dans la mitochondrie, cet organe produit l'ATP, carburant des réactions endergoniques. Les concentrations en glucose et oxygène dissous dans le milieu poussent en effet une levure anaérobie facultative à emprunter des voies métaboliques de types fermentaire, respiratoire ou mixte. Les rôles de la mitochondrie sont différents lors de la fermentation, elle possède notamment des cytochromes impliqués dans la synthèse de l'ergostérol, des enzymes impliquées dans la désaturation des corps gras et dans la synthèse d'acides aminés et des bases puriques et pyrimidiques. Elle est capable d'apporter une adaptation physiologique face au stress causés par l'éthanol, les radicaux libres, etc. (Larpent, 1990). Des hautes teneurs en sucres sont associées à une formation accrue d'acide acétique par *S. cerevisiae* (Michnick, Roustan, Remize, & Barre, 1997; Pigeau & Inglis, 2005, 2007).

En présence d'oxygène et de glucose à forte concentration, la fermentation et la respiration coexistent avec une proportion plus élevée pour la fermentation. Le métabolisme respiro-fermentaire se caractérise par une diminution du rendement de la biomasse, la production de métabolites secondaires tels que l'éthanol, le glycérol et l'acétate et une vitesse spécifique de consommation d'oxygène réduite. En métabolisme respiro-fermentaire, environ 3% des atomes de carbone sont consommés par respiration (Gancedo, 1998; Rodrigues *et al.*, 2006; Van Dijken *et al.*, 1993).

De nombreux phénomènes, qui vont être décrits dans les paragraphes suivants, expliquent les différences entre les proportions du métabolisme respiratoire et fermentaire en lien avec l'apport de glucose.

### 4.7.1. Transport du glucose

Chez la levure, le transport du glucose contenu dans le milieu peut se faire à travers la membrane plasmique de deux façons, soit par simple diffusion grâce à un gradient de concentration de part et d'autre de la membrane permettant le passage sans dépense d'énergie, soit par un transfert avec utilisation d'énergie sous forme d'ATP.

D'après Fiechter & Seghezzi (1992), l'affinité pour le glucose est différente d'une levure à l'autre et permettrait de faire la distinction entre les levures « Crabtree positives » qui sembleraient incapables de contrôler le flux de glucose à travers la membrane et les levures « Crabtree négatives » dont la respiration n'est pas réprimée par la présence de glucose.

### 4.7.2. Effet glucose

Le terme « d'effet glucose » est utilisé pour désigner l'ensemble des conséquences physiologiques dues à la présence de glucose dans le milieu de culture. Chez *S. cerevisiae*, le glucose exerce un mécanisme de répression sur le catabolisme des autres sources de carbone assimilables en agissant sur certaines protéines de transport et sur l'ensemble du métabolisme cellulaire ; en effet la machinerie cellulaire est dirigée vers la dégradation exclusive du glucose, parfois au détriment d'une gestion économique et efficace de l'activité cellulaire, en empêchant notamment la respiration cellulaire pourtant bien plus efficace énergétiquement.

#### 4.7.2.1. Effet Pasteur

Cet effet a été découvert en 1857 par Louis Pasteur, qui, en aérant un bouillon de *S. cerevisiae* où les concentrations en sucre étaient faibles (inférieures à 2 g/L), a constaté une augmentation du développement des levures et une diminution de la production d'alcool. Pasteur en a déduit que le métabolisme respiratoire inhibait la fermentation alcoolique.

En réalité, il s'agit de l'inhibition de la glycolyse par l'oxygène. Ce phénomène apparaît primordial pour la production de biomasse à partir de glucose ; en effet l'oxydation par respiration produit un nombre bien supérieur de molécules d'ATP par molécule de glucose entraînant un meilleur rendement en biomasse.

Il est maintenant prouvé que la phosphofructokinase joue un rôle critique dans l'effet Pasteur. Le passage de l'aérobiose à l'anaérobiose se traduit en effet par une stimulation de cette enzyme, conséquence de toute une série de régulations (J V Passonneau & Lowry, 1964). L'augmentation de la concentration en AMP et en phosphate dans la cellule joue en effet un rôle activateur sur la phosphofructokinase. L'accumulation d'AMP active l'isocitrate déshydrogénase du cycle de Krebs, ce qui a pour conséquence de faire chuter la concentration cellulaire en citrate, inhibiteur allostérique de la phosphofructokinase. L'ATP, inhibiteur de l'enzyme, diminue également en concentration lors du passage en anaérobiose.

Suite à la stimulation de la phosphofructokinase, les concentrations en fructose 6-phosphate et en glucose 6-phosphate diminuent ce qui entraîne une augmentation du transport actif du glucose. Le glucose semble donc être transporté plus difficilement dans la cellule lorsque celle-ci se trouve en aérobiose (Janet V. Passonneau & Lowry, 1962). Il semble par conséquent que ces effets de régulation, notamment au niveau de la phosphofructokinase, soient les facteurs les plus importants du contrôle de la glycolyse.

Toutefois, au moins trois autres mécanismes peuvent contribuer à l'effet Pasteur :

- En aérobiose, l'ADP et le phosphate sont associés pour produire de l'ATP au cours de l'oxydation du pyruvate. Or, trois réactions de la glycolyse, celles catalysées par la glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase, par la phosphoglycérate kinase et par la pyruvate kinase, ont justement pour substrat le phosphate ou l'ADP. D'après Larpent (1990) plusieurs auteurs ont donc suggéré la possibilité d'une compétition pour l'ADP et le phosphate entre la respiration (c'est-à-dire les oxydo-réductions mitochondriales) et la glycolyse, bien que ces deux processus aient lieu dans des compartiments cellulaires différents (R. Lagunas, Dominguez, Busturia, & Saez, 1982; Rosario Lagunas & Gancedo, 1983).
- Certaines enzymes de la glycolyse, en particulier la glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase, comportent des groupements -SH nécessaires à l'activité catalytique. Il est possible qu'en aérobiose, ces groupements subissent une oxydation qui inhiberait l'enzyme (J V Passonneau & Lowry, 1964).

Le glucose 6-phosphate peut, au lieu d'entrer dans la voie de la glycolyse, être dégradé par la voie des pentoses phosphates, principale voie de production du NADPH (Cadière, Ortiz-Julien, Camarasa, & Dequin, 2011). Si cette voie était favorisée en anaérobiose, cela tendrait à détourner de la glycolyse une partie du glucose (Flores, Rodriguez, Petit, & Gancedo, 2000).

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'effet Pasteur est peu important. Il serait majoritairement dû aux changements de la concentration en phosphate qui régule la phosphofructokinase.

#### 4.7.2.2. Effet Crabtree

C'est en 1929, qu'Herbert Grace Crabtree met en évidence l'effet qui portera son nom par la suite (Crabtree, 1929). Cet effet correspond au phénomène de passage du métabolisme respiratoire au métabolisme fermentaire malgré la disponibilité de l'oxygène dans le milieu de culture, conduisant à la production d'éthanol. En condition aérobie, lorsque la concentration en glucose dépasse un certain seuil, la levure bascule son métabolisme de la respiration à la fermentation (Al-Mhanna, 2010; De Deken, 1966; Hagman, Säll, & Piškur, 2014).

Un des principaux problèmes rencontrés en fermentation industrielle lors de production de biomasse et de protéines hétérologues est que le niveau de sensibilité au glucose dépend de la souche de levure considérée ; il est donc difficile de prévoir la concentration à laquelle les coproduits indésirables vont se former.

*Saccharomyces cerevisiae* est une levure fortement « Crabtree positive », c'est-à-dire qu'au-delà de 100 à 150 mg/L de glucose dans le milieu (Cornelis Verduyn, Zomerdijk, Dijken, & Scheffers, 1984), elle produit de l'éthanol même en conditions aérobies alors que d'autres levures peuvent supporter de 20 à 50 g/L de glucose avant de basculer leur métabolisme en fermentation (Ratledge, 1991). Les levures dites « Crabtree » négatives catabolisent complètement le glucose grâce à la respiration (Figure 7).

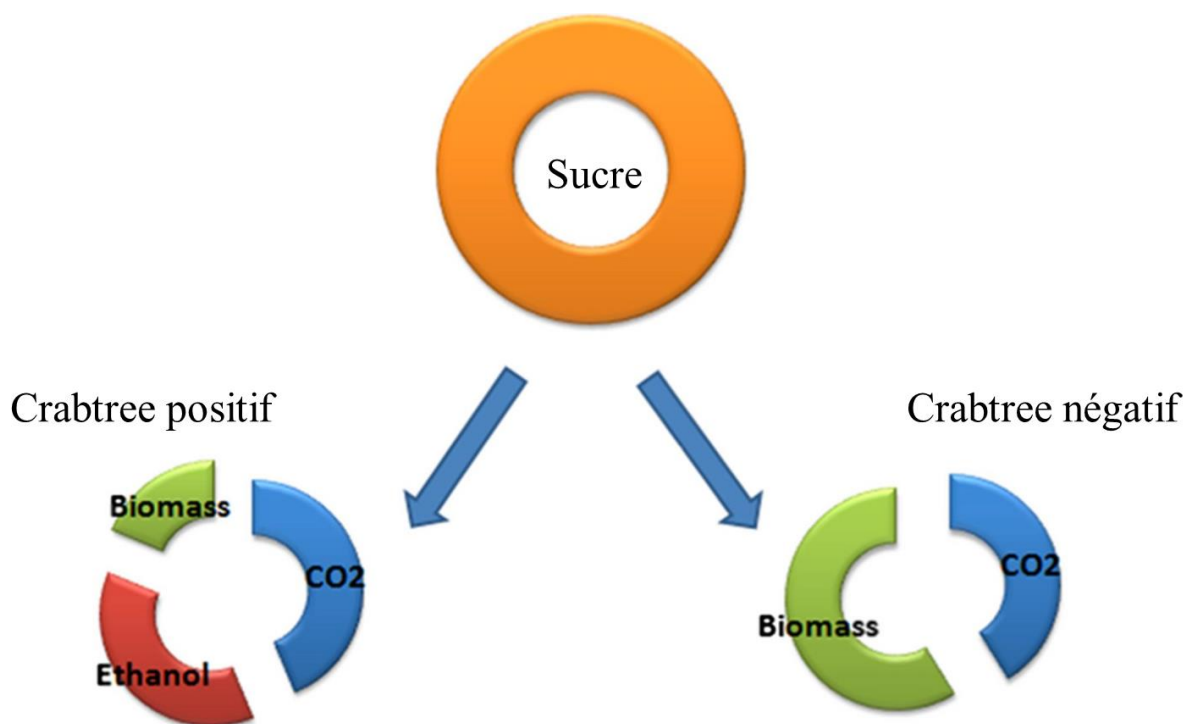


Figure 7 : L'effet Crabtree conduit à la baisse de production de biomasse car une partie du sucre est converti en éthanol. Ce qui signifie que pour obtenir le même rendement en cellules, plus de glucose doit être consommé comparé aux levures Crabtree négatives. Étant donné que seule une faible quantité de sucre est utilisée pour la biomasse et la production d'énergie, lors de culture mixte de micro-organismes, théoriquement cela entraîne un taux de croissance plus faible pour les levures Crabtree positive face à celles Crabtree négatives et aux micro-organismes. Cependant, l'éthanol est utilisé comme un inhibiteur et permet ainsi de contrôler la prolifération des micro-organismes en compétition avec ces dernières, d'après (Dashko, Zhou, Compagno, & Piškur, 2014).

Il semblerait qu'une des différences entre les levures Crabtree positives et négatives se situe au niveau du transport du glucose (Fiechter & Seghezzi, 1992; Van Urk, Postma, Scheffers, & Van Dijkeb, 1989).

Ainsi, en cas d'excès de glucose :

- les levures « Crabtree » positives doivent faire face à un afflux important de glucose dans la cellule du fait d'un transport passif par simple gradient de concentration.
- les levures « Crabtree » négatives régulent l'entrée du glucose grâce à un transport actif de plus haute affinité (symport-H<sup>+</sup>) et contrôlent ainsi le flux glycolytique.

Parmi les levures « Crabtree » positives, il existe deux types d'effet, à long terme et à court terme (Pronk, Steensma, & Van Dijken, 1996) :

- L'effet « Crabtree » long terme correspond à une fermentation alcoolique aérobie à des taux de croissance élevés quel que soit le mode de culture (croissance en excès ou limitation de sucre). Il se traduit par une production d'éthanol, une chute du rendement de bioconversion en biomasse et un quotient respiratoire supérieur à 1, au-delà d'un certain taux de dilution critique en culture continue ou en culture batch sur glucose.
- L'effet « Crabtree » court terme correspond à une fermentation alcoolique aérobie instantanée après ajout d'une quantité importante de glucose à une culture en limitation par rapport à ce substrat. Ce phénomène est suivi d'un retour progressif vers un métabolisme respiratoire.

La culture en mode fed-batch permet l'apport de substrats, dont le glucose, en quantité maîtrisée pour ne pas dépasser le seuil critique ; ce type de culture est donc indispensable pour des applications industrielles contrôlées dont le but est de produire de la biomasse en obligeant la levure Crabtree positif à utiliser son métabolisme respiratoire qui a un rendement de bioconversion plus important que le métabolisme fermentaire.

Mais la réelle cause de l'effet Crabtree est encore peu connue ; une hypothèse forte est la saturation des voies empruntées pour la respiration qui entraînerait le glucose excédentaire vers la voie fermentaire qui le convertirait en éthanol et empêcherait ainsi les phénomènes d'inhibition par excès de substrat.

La pyruvate déshydrogénase (PDH) catalyse la conversion du pyruvate en acétyl-CoA et alimente le cycle de Krebs en acétyl-CoA. Des études menées sur des mutants privés de l'activité PDH indiquent une croissance possible sur glucose mais avec un rendement en biomasse plus faible (Pronk *et al.*, 1996), du fait de l'utilisation par le glucose, de la voie fermentaire et non respiratoire.

#### 4.7.2.3. Effet Kluyver

Alors que certaines levures comme *Saccharomyces cerevisiae* sont capables de se développer et d'avoir un métabolisme fermentaire en aérobiose sur glucose et sur des disaccharides comme le maltose ou le saccharose, d'autres levures au contraire dans les mêmes conditions se développent sans fermentation. Ce phénomène a été appelé effet Kluyver et caractérise certaines levures comme *Saccharomyces fuctuum*, *Kluyveromyces lactis* et *Dekkeromyces lactis*. Les études taxonomiques ont montré qu'il s'agit en fait d'une incapacité de

fermenter ces sucres en aérobiose accompagnée par une incorporation lente des glucides dans la cellule et une intensité respiratoire élevée. Le phénomène apparaît donc comme une compétition entre respiration et fermentation en présence d'oxygène, ce qui est confirmé par le fait que des mutants déficients respiratoires acquièrent la capacité de fermenter le maltose en aérobiose (Ratledge, 1991; Weusthuis, Visser, Pronk, Scheffers, & Vandijken, 1994).

#### 4.7.2.4. Effet Custers

Plusieurs espèces de levures du genre *Brettanomyces* fermentent le glucose plus rapidement en aérobiose qu'en absence d'oxygène et ce phénomène a été appelé effet Custers (Wikén, Scheffers, & Verhaar, 1961).

La présence d'oxygène ou d'accepteurs artificiels d'électrons augmente la vitesse de fermentation qui produit en outre beaucoup d'acide acétique. L'explication avancée (Larpen, 1990), est qu'en aérobiose, le cofacteur réduit, produit par la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase et l'acétaldéhyde déshydrogénase, est réoxydé par la chaîne respiratoire et partiellement par la glycérol 3-phosphate déshydrogénase qui participe à la production du glycérol, il y a une régénération des  $\text{NAD}^+$  à partir des NADH. En anaérobiose, le NADH peut s'accumuler si la glycérol 3-phosphate déshydrogénase n'est pas suffisamment efficace pour l'utiliser rapidement. Un taux élevé de NADH bloquerait alors la glycolyse, et par conséquent la fermentation, au niveau de la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (Moulin, Boze, & Galzy, 1984).

Les effets Kluyver et Custers ne sont pas rencontrés chez *Saccharomyces cerevisiae*. Une fois que la concentration en glucose dans le milieu diminue, un autre phénomène vu précédemment, la diauxie, survient et la levure consomme l'éthanol produit dans le cycle de Krebs. Durant ce changement de substrat la répression catabolique exercée par l'effet glucose s'atténue (Pham, Larsson, & Enfors, 1998).

### 4.8. Notion de stress chez les levures

Des changements de paramètres de culture, qui vont être décrits par la suite, peuvent induire du stress chez les levures, entraînant des changements de processus physiologiques qui affectent leur comportement et par conséquent leurs capacités de croissance et de production.

D'après Booth (2002), les quatre principaux types de stress observés sont :

- nutritionnel lors de carences en éléments indispensables au développement de la levure
- physico-chimique lorsque des paramètres tels que la température, la pression osmotique et le pH ne sont pas à leurs valeurs optimales
- hydrodynamique pour des conditions de mélange trop brutales
- chimique lorsqu'un substrat est en excès (effet « Crabtree ») ou lorsqu'une substance chimique inhibe ou ralentit certaines fonctions métaboliques essentielles comme c'est le cas pour certains produits de la fermentation tel que l'éthanol.

Lors de stress, une augmentation de la concentration intracellulaire de glycérol est souvent mentionnée (Scanes *et al.* 1998; Aldiguier *et al.* 2004; Bideaux *et al.* 2006), ainsi qu'une diminution de l'activité métabolique entraînant une moindre utilisation du glucose ; par conséquent une baisse de la vitesse de croissance et de la production est souvent observée (Martini *et al.* 2004; van Dijken & Scheffers 1986; Ghose & Tyagi 1979). Par effet contraire, une

concentration élevée en glucose peut ralentir la croissance, voire la stopper totalement pour des concentrations en glucose supérieures à 400 g/L (voir section 4.7.2 effet glucose).

Comme vu précédemment, la levure opère des changements au niveau de ses voies métaboliques pour s'adapter aux stress provoqués par son environnement (mentionnés dans le paragraphe 4, page 24), mais elle peut aussi effectuer une adaptation morphologique en augmentant sa production de stérols ou de peroxysomes par exemple (Larpent, 1990).

#### **4.8.1. La pression osmotique et la force ionique**

Le milieu aqueux est favorable à la croissance de la levure car il facilite son activité en améliorant la mobilité des cellules, en dissolvant les constituants fermentescibles et en assurant le contact entre les enzymes et les substrats tels que les sucres. Toutefois le fonctionnement de la cellule dépend fortement de la pression osmotique du milieu.

En effet les sels et majoritairement les sucres présents lors de la production de levure augmentent la pression osmotique du milieu et diminuent de ce fait l'activité levurienne. Cette augmentation de la pression osmotique conduit à la diffusion de l'eau intracellulaire vers l'extérieur et donc à une déshydratation de la cellule (Figure 8). Le stress hyper osmotique cause une sur-régulation des gènes de la voie métabolique glycolytique et de la voie pentose phosphate (Erasmus, Van Der Merwe, & Van Vuuren, 2003), induisant une augmentation de produits secondaires du métabolisme levurien, comme l'acétaldéhyde et l'acide acétique, qui peut atteindre 1,5 g/L dans certains vins (Erasmus, Cliff, & Van Vuuren, 2004; Kontkanen, Inglis, Pickering, & Reynolds, 2004; Pigeau & Inglis, 2005)

De plus, la dissociation du chlorure de sodium et d'autres sels inorganiques dans l'eau, donnant des ions libres dans le milieu, contribue à diminuer les activités enzymatiques, donc le fonctionnement de la levure.

##### **Phénomènes biologiques engendrés par une variation de la pression osmotique**

Ce qui impacte la croissance n'est pas directement la pression osmotique subie par la cellule, mais plutôt la réorganisation de la machinerie cellulaire que la levure met en place pour résister à ce changement de milieu. Comme pour tout être vivant l'eau est vitale pour la levure ; une variation de pression osmotique entraîne un mouvement d'eau dans le sens du gradient osmotique:

- Milieu extérieur vers la cellule : celle-ci reçoit de l'eau venant du milieu extérieur, entraînant son gonflement, voire son éclatement (dans des milieux hypotoniques ou hypo-osmotiques ; Figure 8 (a))
- Cellule vers milieu extérieur : la cellule perd une partie de son eau et se rétracte (dans les environnements hypertoniques ; Figure 8 (b)).

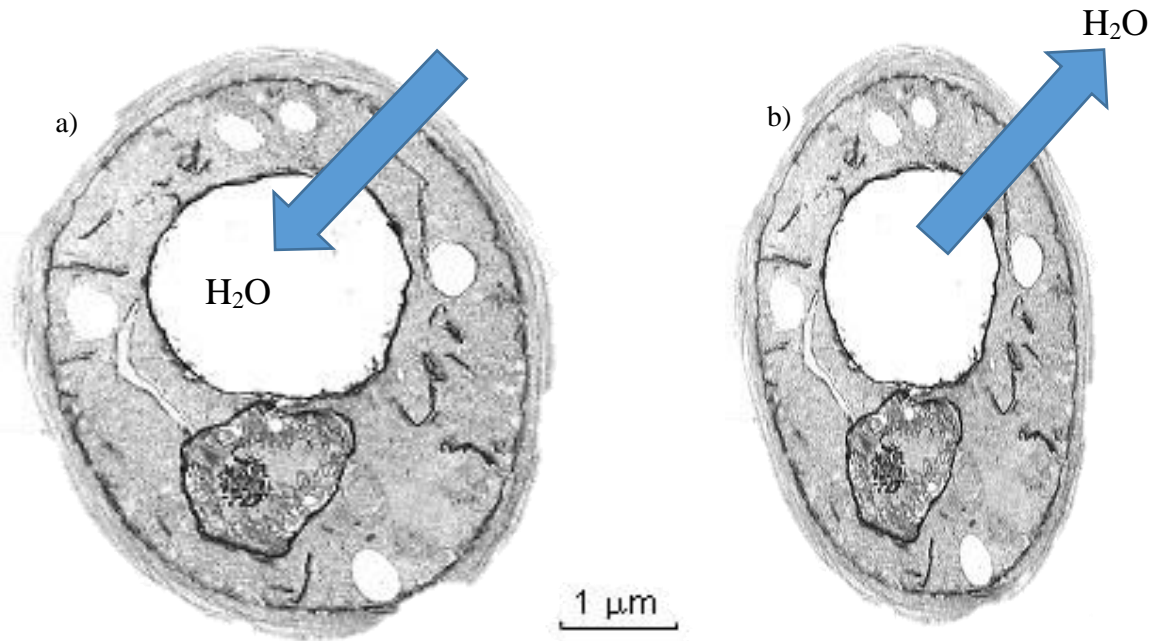


Figure 8 : a) Cellule en milieu hypotonique et b) en milieu hypertonique.

Les réponses de la levure placée dans un milieu hypertonique sont nombreuses et vont toutes à l'encontre de la perte d'eau des cellules:

- changements immédiats tels que des modifications structurelles : diminution de la fluidité de la membrane cellulaire, retenue d'eau intracellulaire
- arrêt temporaire de la croissance cellulaire
- production de substances osmoprotectrices comme le glycérol et le tréhalose qui augmentent la pression osmotique de la cellule
- diminution du volume cellulaire (Marechal, Martinez de Maranon, Molin, & Gervais, 1995).

#### 4.8.2. La concentration en alcool

Lors de sa croissance, en fermentation alcoolique en particulier, la levure produit de l'éthanol qui représente la principale cause de stress pendant la culture en batch car il s'accumule dans le milieu (Martini *et al.* 2004). La levure selon son espèce peut résister à des taux d'alcool de 5 à 23 % (V/V) (Fugelsang & Edwards, 2007).

Cette molécule, en raison de ses caractéristiques physico-chimiques assez proches de l'eau (polaire notamment), diffuse très facilement et librement dans la membrane cytoplasmique où elle parvient à remplacer les molécules d'eau et à interférer dans les interactions existantes entre les protéines et les phospholipides à l'intérieur de la membrane entraînant une dégradation de cette dernière (Soubeyrand *et al.* 2005; Luparia *et al.* 2004).

Les molécules d'éthanol présentes en grande quantité dans la membrane cytoplasmique rendent celle-ci plus perméable aux protons ce qui réduit l'activité des protéines de transport telles que les pompes à protons ATPase (Figure 9 (a)). Pour compenser cette pénétration accrue de protons, la cellule doit dépenser plus d'énergie pour en exporter autant. Enfin lorsque l'équilibre

entre cette pénétration passive de protons favorisée par l'alcool (sens B) et l'excrétion active de protons par le métabolisme cellulaire (sens A) n'est plus maintenu, la cellule finit par mourir par acidification intracellulaire (Figure 9 (b)).

Donc au fur et à mesure que l'éthanol est excrété dans le milieu, par son accumulation, il ralentit le développement des levures et peut causer des dommages irréversibles (Wang *et al.* 2013)

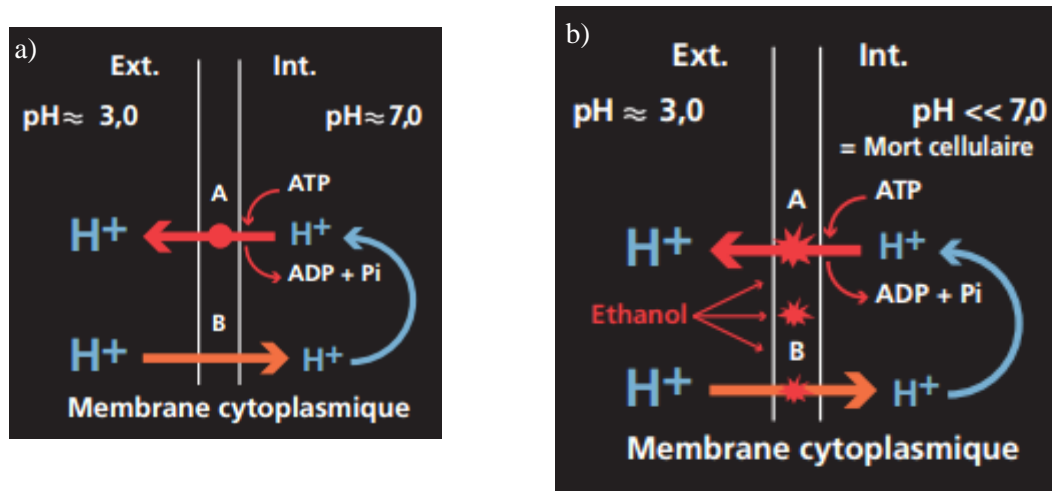


Figure 9 : Fonctionnement schématique des pompes à protons ATP dépendantes à travers la membrane cytoplasmique ;  
a) fonctionnement en conditions optimales b) fonctionnement lors d'un stress alcoolique.

En réponse à ce stress la levure va consommer de l'énergie pour favoriser certaines voies de son métabolisme et ainsi produire, au sein de la membrane, des molécules destinées à la protéger et lui permettre de mieux résister aux conditions défavorables du milieu ; mais ces mécanismes se produisent au détriment de la croissance. L'augmentation de la concentration en alcool au cours de la fermentation agit donc progressivement comme un rétrocontrôle négatif de l'activité de la levure.

On est donc souvent obligé de diluer le milieu de culture pour compenser l'effet de l'accumulation de l'alcool. Par exemple, selon Laurent et Valade (1998), un levain titrant 50 à 60 millions de levure par millilitre consomme environ 24 grammes de sucre par litre et par jour à une température de 20°C ; sachant que la levure produit 1% d'alcool à partir de 16 grammes de sucre par litre, la dilution par ajout de moût ou d'eau est indispensable. Cependant l'éthanol a un effet positif en protégeant le vin des moisissures et autres micro-organismes indésirables.

### 4.8.3. L'agitation du milieu

Qu'elle soit mécanique ou pneumatique, l'agitation est primordiale pour l'accessibilité des cellules aux nutriments dissous dans le milieu.

Une agitation mécanique à l'aide de pales (marines, Rushton, hélicoïdales, pitch blade, profilées) entraîne un écoulement axial, radial ou tangentiel et par conséquent un stress mécanique par le biais du cisaillement des cellules qui peut les endommager ; pour certains micro-organismes toutefois ce cisaillement peut se révéler bénéfique en augmentant leur taux de croissance par l'intermédiaire d'une augmentation du  $k_L a$  (Anne-Sophie Aldiguier, 2006; Xuereb, 2000).



L'agitation du milieu favorise aussi le transfert thermique à l'intérieur de la culture, réduisant les écarts de température entre les différentes zones et l'accumulation de chaleur en certains points. Elle est de ce point de vue, très importante et un compromis technologique doit être trouvé entre la minimisation du stress des cellules et l'optimisation du transfert thermique entre la double enveloppe et le milieu de culture.

## 5. Cinétique de croissance microbienne

### 5.1. Croissance microbienne en culture discontinue (batch)

#### 5.1.1. Les étapes de la croissance

Une population microbienne se développe au sein d'un bioréacteur en suivant une courbe de croissance basée sur la cinétique enzymatique de Michaelis-Menten. La courbe ci-dessous montre les différentes phases de croissance d'une population de levure (Figure 10) :

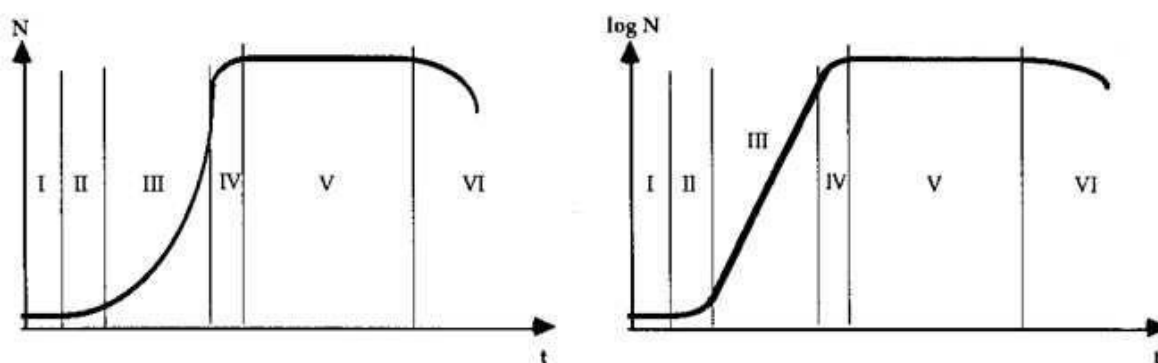


Figure 10 : Courbe de cinétique microbienne d'une culture liquide de *S. cerevisiae* dans un milieu de culture optimal. On distingue 6 phases. (I) la phase de latence ; (II) la phase de démarrage ; (III) la phase exponentielle donnant un taux de croissance et un temps de division ; (IV) la phase de ralentissement durant laquelle apparaît l'assimilation des produits de la fermentation ; (V) la phase stationnaire accompagnée d'une vacuolisation prononcée et d'un arrêt de la division. Cette phase est réversible et les cellules repartent plus ou moins rapidement en présence de milieu frais (THONART, 2009 et (Bourat, 1992)).

Le modèle de cinétique microbienne proposé par Monod est une boîte noire dans laquelle se déroule une série de réactions enzymatiques. Le substrat étant l'unique facteur limitant, l'enzyme la plus lente conditionne la vitesse de croissance d'un micro-organisme et donne la courbe ci-dessous où  $K_S$  représente la concentration en substrat pour laquelle la vitesse de croissance est la moitié de la vitesse maximale (Figure 11) :

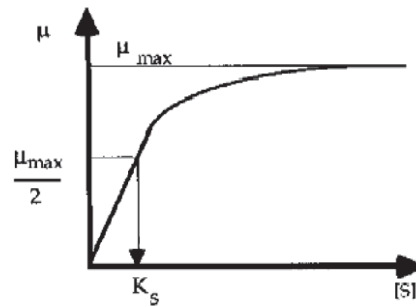


Figure 11 : Evolution du taux de croissance népérien ( $\mu$ ) en fonction du substrat permettant de définir le coefficient d'affinité de la levure pour son substrat correspondant à la moitié du taux de croissance maximal ( $\frac{1}{2}$  de  $\mu_{\max}$ ) (Bourat, 1992).

#### 5.1.1.1. Phase de latence et démarrage

La Phase (I) de la Figure 10 correspond à l'adaptation des cellules aux conditions imposées, il n'y a aucune division cellulaire ; au cours de la seconde phase, Phase (II), la croissance démarre avec une augmentation progressive de la vitesse de division cellulaire.

#### 5.1.1.2. Phase de croissance

Lors de cette phase on distingue :

- la phase de croissance exponentielle (III), avec un taux de croissance maximal ( $\mu_{\max}$ ) constant, la physiologie et la composition des cellules ne varient pas ;
- la phase de ralentissement (IV), avec une diminution du taux de croissance suite à de nombreux facteurs tels que l'épuisement du substrat et l'accumulation de l'éthanol allant jusque l'arrêt de la croissance même si le substrat est encore présent, des variations physico-chimiques importantes suite à la production d'acides par exemple (malique, lactique, acétique, citrique, ...) ou encore un manque de place pour la levure dans le réacteur (fréquent lors de procédés continus avec recyclage cellulaire).

#### 5.1.1.3. Phase stationnaire

Après la phase de croissance, les cellules peuvent entrer en phase stationnaire (notée V sur la Figure 10 vue précédemment), dans laquelle elles accumulent des réserves et modifient la composition de leur paroi (Werner-Washburne, Braun, Johnston, & Singer, 1993). La croissance s'arrête et la concentration cellulaire maximale est atteinte, une faible quantité de levures peut continuer à se diviser et avoir une activité métabolique de différenciation, de production de métabolites secondaires, etc. permettant ainsi de contrebalancer la faible mortalité qui commence à apparaître lors de cette phase. La prolifération peut redémarrer lorsque les levures sont à nouveau dans des conditions propices à leur développement.

#### 5.1.1.4. Phase de déclin

Si les conditions propices à la reprise de la croissance ne sont pas rassemblées lors de la phase stationnaire, la phase de déclin (notée VI sur la Figure 10 vue précédemment) correspondant à la diminution d'organismes viables et l'autolyse sous l'action des enzymes protéolytiques

endogènes à ces dernières apparaît. Le taux de croissance devient alors négatif ( $\mu < 0$ ). Cependant, une certaine croissance persiste par utilisation de substances libérées lors de la lyse (nommée croissance cryptique).

## 6. Les différents types de culture

Les cellules peuvent être cultivées en suspension ou immobilisées. Pour les cultures de cellules en suspension, différents modes d'alimentation en milieu nutritif peuvent être utilisés (Figure 12).

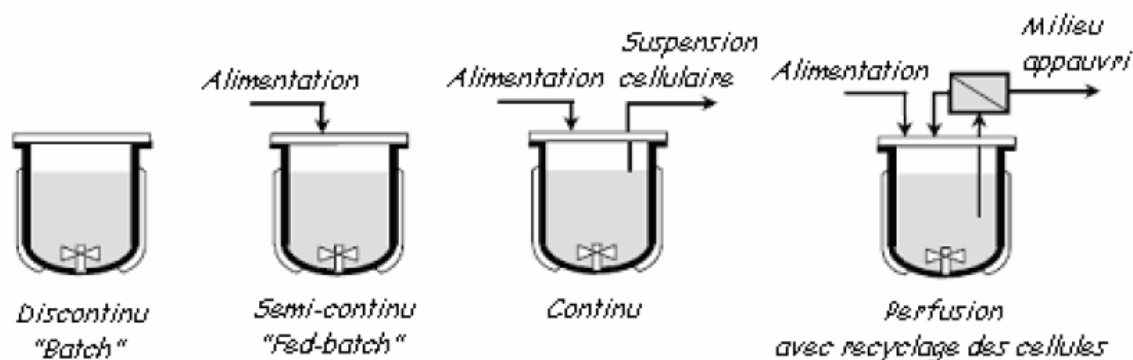


Figure 12 : Représentations schématiques des différents modes d'alimentations en milieu nutritif de bioréacteurs (D'après Branger, 2004; Crumplen, D'Amore, Panchal, Russell, & Stewart, 1989).

Ci-dessous (Figure 13), sont représentées les cinétiques observées selon le mode d'alimentation ; ces principaux modes seront décrits plus en détail dans les paragraphes suivants.

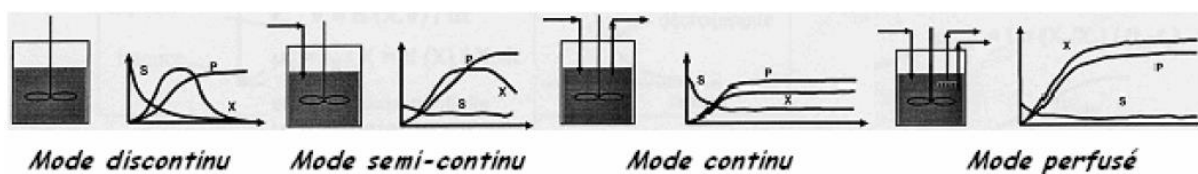


Figure 13 : Représentations des cinétiques des concentrations cellulaires (X), des substrats (S) et des produits (P) en fonction du mode d'alimentation du bioréacteur (D'après Branger, 2004; Crumplen, D'Amore, Panchal, Russell, & Stewart, 1989).

### 6.1. Le mode de culture discontinu (batch)

La culture en mode batch est un système fermé, aussi appelé réacteur batch. Une quantité fixée de milieu de culture avec une composition définie, tous les nutriments nécessaires à la croissance, puis l'inoculum sont ajoutés au début de la fermentation. Par conséquent, leurs concentrations ne sont pas contrôlées, mais varient au cours du temps en fonction de la consommation liée à la croissance des cellules vivantes. Les produits, qu'ils soient intra- ou extracellulaires, sont récoltés uniquement à la fin de la culture. Le pH, la concentration d'oxygène dissous et la température sont habituellement maintenus constants au cours du fonctionnement du réacteur. Les paramètres que l'on peut optimiser sont la composition du milieu initial

principalement, mais aussi la concentration d'oxygène dissous, la température et le pH ce qui peut conduire à une amélioration des performances.

Les micro-organismes se développent dans ce milieu au cours du temps en consommant les substrats présents et en contrepartie des composés, bien souvent inhibiteurs, sont produits pouvant entraîner une productivité faible. De plus les substrats doivent être en deçà de teneurs limites donnant une inhibition, ce qui diminue d'autant la biomasse et donc la productivité.

Les évolutions au cours du temps des concentrations (en masse par unité de volume, g/L) en biomasse (X) et en substrat (S) sont déterminées par les équations suivantes :

$$r_x = \frac{dX}{dt} = \mu X \quad \Rightarrow \quad r_x = \mu_{\max} \left( \frac{S}{S + K_S} \right),$$

$$\text{Et } r_S = \frac{-dS}{dt} = \frac{\mu X}{Y_{x/s}} + m_S X,$$

avec  $\mu$  le taux de croissance népérien ( $h^{-1}$ ),  $r_x$  et  $r_S$  les vitesses de division cellulaire et de consommation en substrat (g/L/h),  $K_S$  (g/L) la concentration en substrat pour laquelle  $\mu = \frac{\mu_{\max}}{2}$  (constante de demi-saturation),  $Y_{x/s}$  le rendement de bioconversion (g de biomasse/g de substrat) et  $m_S$  le coefficient de maintenance ( $h^{-1}$ ).

## 6.2. Le mode de culture discontinu alimenté (fed-batch)

Le fed-batch (de l'anglais to feed, pour alimenter), est le mode de culture le plus utilisé industriellement. La fermentation est démarrée en discontinu puis la source de carbone et d'autres nutriments sont ajoutés de manière intermittente ou continue sans soutirer de milieu conduisant à une augmentation du volume dans la cuve au cours du temps. Le bouillon de culture est récolté habituellement seulement à la fin de la période d'exploitation, que ce soit entièrement ou partiellement (le reste servant d'inoculum pour la prochaine production).

Le terme de culture fed-batch a été introduit dans la communauté scientifique par un brevet déposé par Sugimoto *et al.* (1973) ; il est également connu sous le nom *Zulaufverfahren* en Allemagne ou *Ryukaho* au Japon. Ce mode de culture permet d'atteindre de plus hautes concentrations en levure que la culture en batch car il évite l'inhibition par une concentration en substrat trop élevée (effet Crabtree), l'appauvrissement en éléments nutritifs et les effets toxiques des produits qui se retrouvent dilués lors des apports (Roukas 1994; Stanbury *et al.* 1989).

Ce mode de culture est toujours précédé d'une phase batch durant laquelle la levure consomme les nutriments présents dans le milieu. Le mode fed-batch démarre lorsque les cellules, en pleine croissance exponentielle, ont épuisé le glucose. Pour une culture fed-batch, l'ajout de substrat est souvent réalisé par le haut de la cuve via une pompe péristaltique (Nonus, Cognart, Kergoat, & Lebeault, 2008).

- En phase fed-batch il faut tenir compte de la dilution du milieu par les apports, on part de l'équation du batch à laquelle on ajoute une composante d'ajout de volume :

$$r_x = \frac{dX}{dt} = \mu \left( \frac{-X}{V} \right) \left( \frac{dV}{dt} \right),$$

$$\text{Et } r_S = -\frac{dS}{dt} = \frac{\mu X}{Y_{x/s}} + m_S \left( \frac{-(S_a - S)}{V} \right) \left( \frac{dV}{dt} \right),$$

avec  $S$  la concentration en substrat dans le réacteur (g/L),  $S_a$  la concentration d'alimentation du substrat (g/L),  $V$  le volume de culture (L).

Le principe d'optimisation de la culture fed-batch est de maintenir une concentration faible en substrat dans le milieu de culture afin que la levure utilise le glucose par voie respiratoire pour produire de la biomasse. Plusieurs types de régulation existent :

- sans contrôle: une équation régulant l'ajout de la solution nutritive est déterminée préalablement afin de maintenir un taux de croissance maximum correspondant à la concentration maximale de substrat acceptable, méthode peu fiable en cas de changement de vitesse de croissance.
- avec contrôle direct: la concentration en substrat limitant dans le milieu est suivie de manière continue afin de la maintenir constante au cours de la culture : suivi coûteux et fastidieux.
- avec contrôle indirect: activation de la pompe d'ajout en fonction des paramètres qui dépendent de la concentration en substrat limitant :
  - concentration en oxygène dissous ( $dO_2$ ): en présence de substrat,  $dO_2$  chute car les cellules respirent. Une fois que le substrat est épuisé,  $dO_2$  remonte. La pompe d'ajout s'active uniquement lorsque  $dO_2$  est supérieure à une valeur prédéterminée (Bodizs *et al.*, 2007). Cette régulation génère des oscillations de  $dO_2$ .
  - coefficient respiratoire (QR) : le QR permet de donner une idée de l'état physiologique de la levure :  $QR = \frac{\text{quantité de CO}_2 \text{ produit par la culture}}{\text{quantité de O}_2 \text{ consommé par la culture}}$

Trois cas possibles sont distingués:

$QR > 1$  : la levure produit de l'éthanol et exerce la fermentation

$QR < 1$  : la levure respire l'éthanol produit car elle est en manque de glucose

$QR = 1$  : la levure crée uniquement de la biomasse

### **6.3. Le mode de culture continu et à recyclage cellulaire (BRC)**

Il s'agit de cultures réalisées dans des réacteurs de type chémostat pour les plus simples en régime stationnaire (entrée = sortie par unité de temps). La concentration et la productivité en biomasse obtenues sont plus faibles que pour les cultures de type fed-batch vues précédemment, elles se rapprochent de celles de type batch. La source de carbone et d'autres nutriments sont ajoutés en continu en soutirant le milieu contenant donc les cellules, les métabolites et le substrat résiduel.

Bien qu'il n'y ait ni limitation nutritionnelle ou inhibition par le produit (éthanol), ce type de culture est mal adapté à la production de biomasse et oblige à retenir les cellules au sein du procédé. Ainsi, le fait de recycler la biomasse donne la possibilité de dissocier le temps de séjour hydraulique et le temps de séjour de la biomasse, permettant :

- d'une part, la rétention des cellules au fur et à mesure de leur croissance, ce qui permet d'atteindre des concentrations en poids sec de micro-organismes très élevées jusqu'à 300 g/L (Lafforgue, Malinowski, & Goma, 1987) ;

- d'autre part, une meilleure maîtrise des conditions nutritionnelles et physico-chimiques du milieu.

Différentes techniques existent pour recycler les cellules au sein du réacteur : floculation, immobilisation, inclusion, centrifugation et filtration.

Mais nous ne détaillerons pas plus ce mode étant donné qu'il n'a pas été utilisé lors de notre travail.

## 7. Les levures sèches actives commerciales

Il existe différentes formes sous lesquelles les levures sont conservées dont les levures sèches actives (LSA). Depuis plusieurs années maintenant, les levures sélectionnées sont très utilisées industriellement et permettent d'obtenir une qualité stable d'une année à l'autre, ce qui est essentiel à la production du vin. Cette formulation des levures *S. cerevisiae* en LSA est maintenant très répandue (80-90% des vins français) mais il a fallu attendre 1964 pour qu'une levure œnologique sèche active soit commercialisée (en Californie) bien que dès 1890, Müller-Thurgau et Wortmann avaient exposé pour la première fois l'intérêt des levures sélectionnées (Phong Lai, 2010).

Cependant, dès l'apparition des LSA, de nombreux débats ont émergé sur la différence entre vins fermentés par des cultures pures et ceux par une population complexe de levures indigènes importante pour l'équilibre du profil aromatique du vin (Ciani, Beco, & Comitini, 2006)

La plupart des fermentations sontensemencées avec des levures sèches actives, à des taux d'inoculation de 1 à 8 millions de cellules/mL (Lonvaud, Renouf, Strehaiano, & Ribéreau-Gayon, 2010; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Les levures sèches actives répondent généralement à des critères spécifiques pour avoir un produit final bien défini.

La production de LSA, notamment vinicole, fait subir un grand nombre de stress à la levure. Durant une période de plusieurs heures, avant le traitement de séchage final, les cellules subissent une limitation en nutriments et sont soumises à tout un mélange complexe de différentes contraintes (thermiques, osmotiques, oxydantes, etc.) (Garre, Raginel, Palacios, Julien, & Matallana, 2010). Elles sont ensuite concentrées et déshydratées à la fin du processus pour obtenir des levures qui peuvent être stockées pendant de longues périodes (Lallemand<sup>TM</sup>, 2016). Mais de nombreux auteurs ont montré que ces lésions environnementales affectent sérieusement le rendement en biomasse, la capacité de fermentation, la vitalité et la viabilité cellulaire (Attfield, 1997; Gómez-Pastor *et al.*, 2011; Pérez-Torrado, Bruno-Barcena, & Matallana, 2005; Pérez-Torrado, Gómez-Pastor, Larsson, & Matallana, 2009).

Lors de leur utilisation, un protocole de réhydratation de levures sèches actives est décrit par le fournisseur ; il faut réhydrater les levures dans dix fois leur poids d'eau à une température de 35-37°C. Pour les futurs développements dans un milieu hydro-alcoolique, après réhydratation, une phase d'acclimatation (de 12 à 24h) est nécessaire afin que la levure se prépare

physiologiquement aux conditions physico-chimiques du vin (alcool, pH, sucres, SO<sub>2</sub>, température...).

## 8. Le bioréacteur

On peut décrire le bioréacteur comme une unité technologique dans laquelle la multiplication des micro-organismes est favorisée à des fins industrielles. Initialement utilisé dans la production alimentaire (ex. : vin, bière, yaourts, additifs alimentaires) ou médicale (ex. : vaccins, antibiotiques, vitamines, acides aminés), ce terme a même été étendu à l'industrie du déchet pour faire référence à des « mégadécharges », et s'imisce désormais dans les textes de loi.

Il est composé d'une cuve cylindrique à fond bombé en acier inoxydable ou en verre (pour les modèles de laboratoire), fermée hermétiquement et stérilement sur le dessus par une platine et parfois munie d'une double enveloppe pour la régulation de la température ; on trouve en complément de cette cuve :

1-un système d'agitation comportant un ou plusieurs mobiles d'agitation selon leur taille, assurant le mélange du fluide et les transferts de chaleur et de matière au sein de la cuve. Il existe deux types de mobiles : le mobile radial entraîne un mouvement perpendiculaire à l'axe d'agitation et des phénomènes de cisaillement et de turbulence qui assurent une bonne dispersion gaz-liquide ; le mobile axial quant à lui fait circuler le fluide parallèlement à l'axe d'agitation et garantit une bonne homogénéisation.

2-un système d'aération, pour assurer l'oxygénation du milieu de culture, le bioréacteur est composé d'un élément muni de trous appelé sparger (diffuseur annulaire) ou fritté (micro diffuseur) suivant la taille des orifices qu'il contient qui envoie de l'air en direction du premier mobile d'agitation.

3-des capteurs pour la mesure de la température (thermomètre), du pH (pH-mètre), de la concentration en oxygène dissous (sonde oxymétrique), du niveau, etc., connectés à une unité de contrôle plus ou moins automatisée, qui commandera suivant les besoins la régulation de la double enveloppe quand elle existe ou la pompe d'ajout d'acide/de base et un piquage pour des prélèvements.

Pour gérer, enregistrer et piloter tous les paramètres de fonctionnement, un système de contrôle commande piloté par ordinateur bien souvent, est relié au dispositif.

Dans le domaine de la biotechnologie, le terme de fermenteur est parfois utilisé sans aucune distinction par rapport à celui de bioréacteur. Il renseigne plus sur la finalité de la cuve que sur son design ; pour des cultures de bactérie, de levure sans apport d'oxygène on aura tendance à utiliser le terme fermenteur alors qu'une enceinte aérée sera qualifiée de bioréacteur.

La géométrie d'un bioréacteur est caractérisée par une série de paramètres qui respectent en général une configuration standard (Figure 14 et Figure 15).

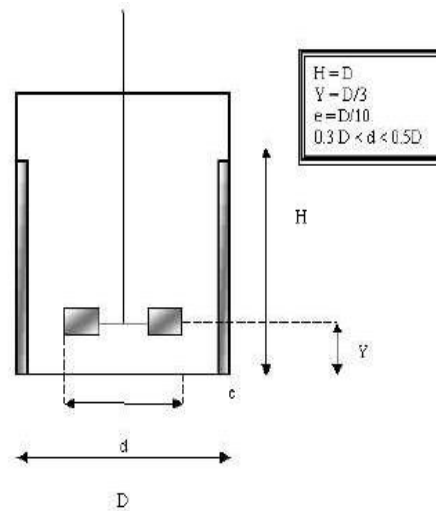


Figure 14 : Géométrie standard d'un bioréacteur (THONART, 2009).

Il s'agit d'une cuve de forme cylindrique avec un rapport  $\frac{\text{Hauteur de liquide (H)}}{\text{Diamètre de la cuve (D)}}$  allant de deux à trois, suivant l'aération et l'agitation mise en place. Des contre-pales de largeur  $b = \frac{D}{12 \text{ ou } 10}$  et de hauteur égale à celle du liquide (H) au nombre de quatre peuvent être disposées de façon symétriquement opposée. Et enfin le nombre de pales des mobiles d'agitation varie en fonction du type de mobile utilisé, de 3 à 8, d'un diamètre  $d = \frac{D}{3}$  et à une distance du fond de cuve de  $Y = \frac{D}{3}$ .

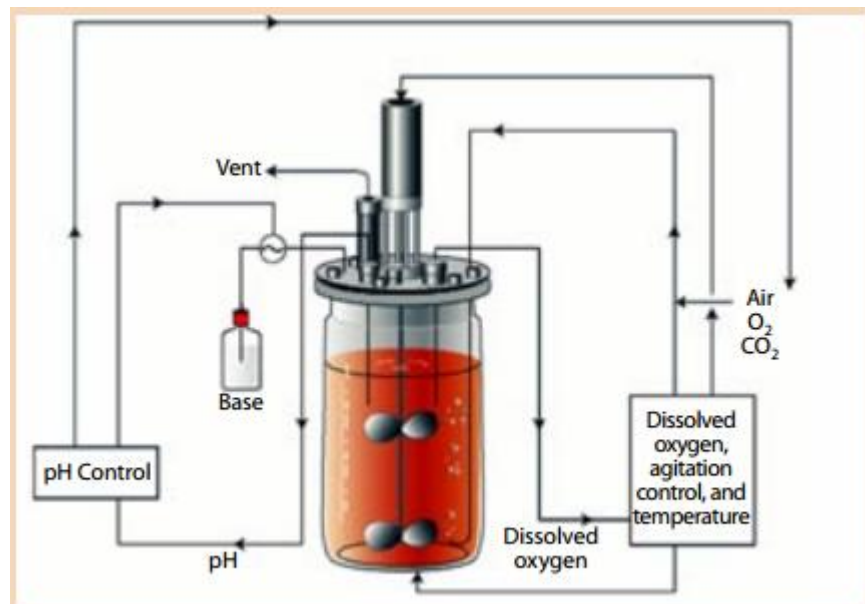


Figure 15 : Schéma d'un bioréacteur équipé de façon minimale, d'après Fries et al. (2005).

La complexité du génie biochimique nécessaire à la mise en œuvre des cultures cellulaires de type fed-batch en bioréacteur, réside dans l'interaction de deux composantes, l'une biologique



avec le développement de la population levurienne et l'autre physique avec les phénomènes de transfert et d'hydrodynamique au sein du bioréacteur.

## 8.1. Dimensionnement d'un bioréacteur

Lors de la mise en œuvre d'une production de levure, la première étape consiste à dimensionner les différents éléments constitutifs du bioréacteur en vue d'optimiser le procédé. Dans le génie chimique et biochimique, l'opération de mélange est la phase critique du procédé, qui permet de réaliser les transferts de matière et chaleur nécessaires intervenant au sein du réacteur.

## 8.2. Les approches de l'extrapolation

Dans un premier temps, pour optimiser un phénomène il est primordial de le comprendre et pour cela il est plus facile de reproduire les procédés industriels à petite échelle pour des raisons de temps et de coût. Par la suite, une approche classique de « scale up » se basant sur des relations empiriques, est utilisée pour extrapoler les conditions optimisées à petite échelle.

Habituellement pour extrapoler les phénomènes rencontrés à petites échelles sur de plus grosses unités, deux principes de base sont utilisés, l'analyse dimensionnelle et des similitudes. L'hypothèse avancée est que lors de la transition à plus grande échelle certains paramètres spécifiques évoluent proportionnellement tels que la puissance volumique ( $P/V$ ), le temps de mélange, le stress hydrodynamique, la variabilité des temps de circulations, etc.

*A contrario* il existe une approche « scale down » qui consiste à reproduire à l'échelle du laboratoire les conditions rencontrées lors de l'agrandissement des cuves. Dans l'approche « scale down », le génie biochimique tient compte de l'impact de ces transformations sur la physiologie cellulaire. En effet, si les cellules se retrouvent au sein d'un réacteur non homogène, suivant leur position dans la cuve, elles vont devoir utiliser différents métabolismes variables de plus en fonction du temps. Ceci entraîne parfois des différences entre les résultats observés à l'échelle de laboratoire ou pilote dans des conditions parfaitement homogènes et ceux obtenus à l'échelle industrielle.

Au sein d'un bioréacteur, 4 types de paramètres physicochimiques apparaissent comme importants lors de la transition à l'échelle industrielle:

- la concentration en oxygène ou en dioxyde de carbone dissous
- l'apport de substrat
- le pH
- la température

Dans ce contexte, l'intérêt de la technologie « scale-down » est de fournir des outils permettant de simuler les gradients de ces paramètres existant à grande échelle et de prévoir le comportement des cellules lors de leur passage d'une échelle à une autre. A l'heure actuelle, l'approche « scale-down » propose une panoplie de méthodes pour reproduire à petite échelle les phénomènes mis en jeu à grande échelle :

- le réacteur combiné : ce système est composé d'une partie parfaitement agitée connectée à une partie non-mélangée, cette association permettant de rendre

compte des hétérogénéités. Au cours de leurs déplacements, les micro-organismes sont confrontés à des gradients de concentration dans la partie non-mélangée. Cette dernière peut être une boucle de recirculation dans laquelle l'ajout de substrat s'effectue au début de celle-ci afin de créer artificiellement un gradient de substrat. Des capteurs peuvent être ajoutés pour assurer un suivi continu de certains paramètres dans des zones précises du bioréacteur ( $dO_2$ , pH, métabolites, etc.).

- le microréacteur : en recherche et développement, la longue durée des cultures en réacteur représente l'inconvénient principal des expérimentations menées pour optimiser les procédés. Pour résoudre ce problème on peut utiliser des microréacteurs de volume de l'ordre du millilitre, qui permettent des temps de culture plus réduits et sont ainsi des outils performants de *screening*. Ce sont par exemple des systèmes avec production automatique de substrat. Par exemple, l'apport de glucose dans le milieu de culture peut être contrôlé par libération progressive à partir d'un polymère qui l'emprisonne.
- la simulation informatique : l'hydrodynamique du réacteur et le mouvement des micro-organismes en son sein sont modélisés par des méthodes d'éléments finis. On ne considère donc plus le bioréacteur comme une boîte noire. Cette modélisation du bioréacteur permet par exemple de simuler l'évolution des gradients de concentration expérimentés par les micro-organismes.

### 8.3. Les phénomènes de transfert

L'opération de mélange effectuée par les mobiles d'agitation placés sur l'axe rotatif assure les trois phénomènes de transfert intervenant dans le bioréacteur :

- transfert de chaleur: la cuve à double enveloppe/les serpentins assurent un apport de chaleur, le transfert étant ensuite réalisé à l'intérieur du fluide grâce à l'agitation qui réduit la couche limite de diffusion à la surface de l'échangeur. On peut ainsi se trouver dans des conditions optimales de température pour la croissance des micro-organismes.
- transfert de quantité de mouvement: les pales des mobiles d'agitation transmettent la quantité de mouvement au fluide et aux cellules en suspension. Le temps de mélange est un paramètre utile pour mesurer l'efficacité de l'agitation dans un bioréacteur. En effet, il rend compte du temps requis pour homogénéiser la cuve, suite par exemple à un ajout de substrat, sous forme de pulse, dans le cas d'une régulation fed-batch.
- transfert de masse : le transfert dans le milieu liquide vers la levure d'un substrat soluble comme le glucose est assez facile, compte tenu de l'agitation. Par contre, le transfert d'oxygène de la phase gazeuse vers la cellule est plus lent car il comprend plusieurs étapes plus lentes: transfert de l'oxygène du gaz vers le liquide avec une interface gaz liquide limitée, transfert de l'oxygène

dissous du liquide vers la cellule avec une concentration d'oxygène dissous très faible. Le paramètre quantifiant l'efficacité du transfert global d'oxygène dans un bioréacteur est le  $k_L a$ , produit du coefficient de transfert de l'oxygène dans la phase liquide  $k_L$  par  $a$  l'aire interfaciale disponible entre les phases gazeuse et liquide par unité de volume de liquide.

## 9. Production de chaleur lors de la croissance de *Saccharomyces cerevisiae*

Le batch est un dispositif biotechnologique que l'on peut simplifier comme un système non isolé, car le batch est le plus souvent, soit non isolé thermiquement, soit thermostaté. Dans les deux cas, il échange de l'énergie sous forme de chaleur avec son environnement. Ceci conduit à penser que les réactions du métabolisme cellulaire sont globalement exothermiques entraînant une production de chaleur au sein de l'enceinte de culture.

On peut le qualifier de système ouvert bien que les micro-organismes et le milieu de culture soient confinés dans le récipient, donc séparés du monde extérieur, car lors de culture aérobie ou anaérobie, il existe un flux gazeux entre la culture et le monde extérieur. Dans le cas d'une culture aérobie, de l'air est fourni au système et un mélange différent (enrichi en dioxyde de carbone, par exemple lors de respiration et fermentation) en ressort. Dans le cas de cultures anaérobies, du CO<sub>2</sub> quitte la culture.

### 9.1. L'énergie de maintenance

Si les micro-organismes consomment de l'énergie sous formes de nutriments pour se développer, ils en consomment également pour se maintenir dans leur environnement sans aucune croissance, il s'agit de l'énergie de maintenance représentée par les nombreux processus cellulaires, tel que l'assemblage des macromolécules, la charge des ARN de transfert ou encore la traduction des protéines. C'est-à-dire pour assurer le turnover chimique des composants cellulaires, pour maintenir une pression osmotique interne correcte.

### 9.2. Energie-chaleur produite lors de fermentation

Comme nous l'avons vu, sous conditions anoxiques, la respiration cellulaire avec la phosphorylation d'ADP en ATP de la chaîne respiratoire ne fonctionne pas, la seule source d'énergie dans ces conditions est la glycolyse avec formation d'ATP par phosphorylation du substrat. Elle ne fournit que 2 molécules d'ATP par molécule de glucose (Bakker *et al.*, 2001; C. Verduyn *et al.*, 1991).

Si la décomposition du glucose en pyruvate venait à s'arrêter, le processus s'arrêterait vite, parce que la glycolyse utiliserait tout le NAD<sup>+</sup> disponible. Cette substance n'existe qu'en traces dans la cellule, et doit être constamment régénérée. C'est pourquoi lors de la fermentation alcoolique, le pyruvate est décarboxylé et l'acétaldéhyde est réduit en éthanol par le NADH, avec oxydation du NADH en NAD<sup>+</sup>. En prenant la chaîne de réaction globale du glucose à l'éthanol, il ne se produit pas de NADH, molécule riche en énergie.

Dans les systèmes biologiques, les conditions ne sont pas standard en règle générale, et elles changent souvent pendant le métabolisme, par exemple la concentration des ions H<sup>+</sup> ne peut

être 1 mol/L correspondant au pH 0, non tolérée par la plupart des êtres vivants, mais  $10^{-5.5}$  mol/L correspondant au pH 5,5, pH optimal de croissance chez la levure. La variation d'enthalpie libre sous les conditions standards n'offre donc chez les êtres vivants qu'un point de repère pour la quantité d'énergie libérée dans une chaîne métabolique.

En reprenant l'équation globale de la fermentation ci-dessous :



Il est possible de faire le bilan énergétique de la réaction : on produit donc pour une mole de glucose  $2 \times 36 = 72$  kJ, soit en comparant avec 2850 kJ, l'énergie totale potentiellement libérée par une mole de glucose (Nelson & Cox, 2008, p. 516), un rendement massique de bioconversion de glucose en biomasse très faible de 2,5 %. La chaleur produite lors de l'utilisation de l'ATP pour fournir de l'énergie métabolique en fermentation est très faible, ce sera la différence d'énergie entre le besoin de la réaction utilisant une mole d'ATP et les 36 kJ que peut apporter au maximum l'hydrolyse d'une mole d'ATP.

### 9.3. Energie-chaleur produite lors de respiration

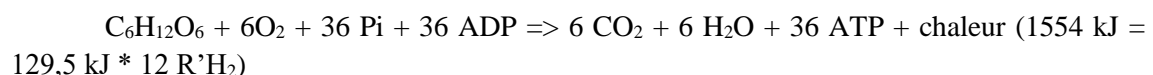
A la pression atmosphérique, à un pH de 7, une mole d'ATP correspond à 36 kilojoules (kJ) à 28°C. Donc pour une mole de glucose utilisée lors de la respiration de la levure, cette réaction apporte 1296 kJ d'énergie métabolique (36 ATP x 36 kJ).

Mais il est à noter que la température a un effet non négligeable sur l'énergie produite car à 37°C, une mole d'ATP correspond à 42 kJ/mole, d'où un bilan énergétique dépendant de la température. Moran (2011) et Nelson & Cox (2008) ont montré qu'il était possible de calculer la variation d'enthalpie libre réelle pour l'hydrolyse de l'ATP (ADP), compte tenu des concentrations connues des réactifs et des produits dans les cellules, notamment chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* en condition de croissance aérobie sur glucose.

A partir des schémas (Annexes 1 et 2), on peut calculer l'énergie relative à la respiration.

La dégradation d'une mole de glucose libère 2850 kJ. De façon plus détaillée, lors du passage dans la chaîne respiratoire, par radical  $\text{R}'\text{H}_2$ , 237,5 kJ ( $2850 \text{ kJ} / 12 \text{ R}'\text{H}_2$ ) sont produits par mole de  $\text{H}_2$  transférée de  $\text{R}'\text{H}_2$  à  $\text{O}_2$  pour produire une mole d' $\text{H}_2\text{O}$ . Cette énergie totale par radical peut se décomposer en énergie métabolique et chaleur. En ce qui concerne l'énergie métabolique, 108 kJ ( $=3 \times 36\text{kJ}$ ) sont réutilisés pour la production de 3 moles d'ATP au sein de la chaîne respiratoire. Le reste, soit 129,5 kJ, est transformé en chaleur. 54,5 % de l'énergie est donc transformée en chaleur qui s'accumule dans le milieu (et par conséquent 45,5 % sont transformés en énergie métabolique) (The Royal Society of Chemistry, 2016).

Soit :



Cela rejoint (Bourat, 1992) : Lors d'une croissance aérobie, durant la phase de croissance, un peu moins de la moitié de l'enthalpie disponible est convertie en biomasse et le reste est dissipé sous forme de chaleur. Pendant la phase stationnaire, toute l'enthalpie du substrat est transformée en chaleur.

## Synthèse bibliographique

Nous allons maintenant exposer le matériel et les méthodes utilisés pour mener à bien ce projet de recherche doctorale.

# Chapitre 2 :

# Matériel et

# méthodes



Chapitre 2 : Matériel et méthodes .....	49
1. Micro-organismes.....	52
2. Milieux de culture .....	52
2.1. Caractéristiques du vin utilisé.....	52
2.2. Préparation des milieux en fiole Erlenmeyer.....	52
2.3. Préparation des milieux en bioréacteurs .....	52
3. Réhydratation-acclimatation et ensemencement .....	53
4. Culture en fiole Erlenmeyer .....	54
4.1. Mesures en fin de culture.....	54
4.2. Cinétique.....	54
4.3. Perte de masse et quantité de CO <sub>2</sub> produit.....	54
5. Culture en bioréacteur batch.....	55
5.1. Le bioréacteur utilisé et les sondes de suivi.....	55
5.2. Détermination de la distribution des temps de séjour .....	56
5.3. Caractérisation rhéologique du milieu de culture .....	57
5.4. Analyse de la composition de l'air en sortie.....	57
6. Culture en bioréacteur fed-batch .....	57
7. Méthodes analytiques .....	58
7.1. Caractérisation de la biomasse.....	58
7.1.1. Mesure de l'absorbance.....	58
7.1.2. Comptage de la biomasse et viabilité.....	58
7.1.3. Mesure du poids sec des levures .....	60
7.1.4. Composition élémentaire CHNS de la biomasse .....	60
7.2. Dosage des sucres, de l'éthanol et du glycérol .....	61
7.3. Dosage des ions .....	62
7.4. Méthodes d'analyse des cinétiques.....	63
7.4.1. Calcul des vitesses de production de CO <sub>2</sub> et de consommation d'O <sub>2</sub> .....	63
7.4.2. Calcul des rendements de production des produits de fermentation suivis .....	64
7.5. Régulation de l'ajout de substrat au cours de la culture fed-batch .....	64



## 1. Micro-organismes

Les levures utilisées sont issues d'une souche commercialisée par l'Institut Œnologique de Champagne sous la dénomination IOC Fizz<sup>+</sup>. Elles se présentent sous forme de Levures Sèches Actives (LSA). Il s'agit d'une levure *Saccharomyces cerevisiae* galactose<sup>-</sup>, résistant à l'alcool jusqu'à 14% vol. (110 g/L d'éthanol environ) et possédant le facteur killer (K2), ce qui lui permet de se développer tout en bloquant les levures indigènes ne possédant pas ce facteur K2. Le nombre de levures vivantes après réhydratation est donné pour plus 10 milliards de cellules/g avec une pureté de moins de 10 levures sauvages par million de cellules.

Durant ce projet de recherche, 3 lots de 500 grammes de LSA Fizz<sup>+</sup> ont été utilisés au fil des ans car, à deux reprises, des baisses de vitesses de fermentation significatives ont été observées.

## 2. Milieux de culture

La composition du milieu de culture est peu propice à la croissance de la levure, notamment la concentration en éthanol proche de celle du vin. Des ajouts de phosphate diammonique, de sulfate de zinc et d'extrait de levure sont réalisés.

### 2.1. Caractéristiques du vin utilisé

Le vin utilisé est un vin blanc tranquille à 11,6 %V/V d'alcool produit avec des raisins blancs issus de cépage *Chardonnay* : le seul raisin blanc en Champagne. La coopérative de Nogent l'Abbesse nous a gracieusement fourni les premiers lots de vin et les suivants ont été réalisés à partir de vin du Centre Vinicole du Champagne Nicolas Feuillatte (CV-CNF).

### 2.2. Préparation des milieux en fiole Erlenmeyer

Les milieux ont été préparés extemporanément avant le démarrage de l'essai, par assemblage des différents composants requis (vin, phosphate diammonique, glucose, eau, extrait de levure sulfate de zinc) à partir de solutions mères stérilisées individuellement, excepté le vin qui a été seulement filtré. Le milieu a ensuite été réparti stérilement dans les fioles, préalablement autoclavées 20 min à 121°C, à la pipette à raison de 50 mL de milieu par fiole de 250 mL.

### 2.3. Préparation des milieux en bioréacteurs

Les milieux ont été préparés avant autoclavage, directement dans le bioréacteur pour la solution contenant l'extrait de levure (0,5 g/L), le phosphate diammonique (0,2 ou 3,2 g/L suivant les essais), et le sulfate de zinc (0,2 g/L), ainsi que dans une bouteille pour la solution du glucose ; cette solution de glucose stérile sera ensuite versée dans le bioréacteur à la suite de l'autoclavage (20 à 80 g/L).

L'assemblage des différents composés se fait ensuite dans le fermenteur par les entrées prévues à cet effet, à l'aide de la pompe péristaltique, à partir des solutions stérilisées

individuellement d'une part l'eau contenant le phosphate diammonique, l'extrait de levure et le sulfate de zinc de l'autre la solution de glucose et enfin le vin qui a été filtré.

### 3. Réhydratation-acclimatation et ensemencement

La souche de *Saccharomyces cerevisiae* a été réhydratée et acclimatée à différentes concentrations initiales en nutriments (glucose, éthanol, glycérol et phosphate diammonique) durant différents temps en fioles Erlenmeyer. Pour les fermentations en bioréacteur, nous nous sommes basés sur les conditions optimales trouvées en fioles Erlenmeyer pour le taux d'ensemencement en Levures Sèches Actives (LSA) et les concentrations en nutriments.

Les précultures pour les essais ont été réalisées sur 100 minutes en deux étapes, le but étant de générer une biomasse capable de vivre dans le milieu hydro-alcoolique dans des conditions les plus proches possible de celles pratiquées chez le viticulteur (comme préconisé par les fournisseurs de levures sèches, à savoir 0,2 g/L de LSA), afin de ne pas lui faire subir de choc osmotique.

Suite à différents essais et optimisations que nous avons réalisés, le milieu de croissance utilisé étant contraignant pour la levure car contenant déjà 50 g/L d'éthanol après dilution, nous avons défini les conditions suivantes pour la réhydratation. Une première étape consiste à ajouter à une quantité de LSA, 10 fois leurs poids en eau stérile, du saccharose à une concentration de 54,4 g/L, à une température de 37°C et sous agitation à 80 rpm (agitateur-incubateur plateau Thermo Scientific™ MaxQ™ 8000) durant 25 minutes (préconisation du fournisseur de levure pour de futures utilisations dans un moût). Puis dans une deuxième étape durant 75 minutes pour acclimater les levures, le volume nécessaire de vin est ajouté afin d'avoir une concentration finale en éthanol de 50 g/L sachant que le vin utilisé à une concentration de 95 g/L d'éthanol.

Le protocole de réhydratation a ensuite été simplifié et réalisé sur 100 minutes en une seule étape par incubation à 37°C sous une agitation de 80 rpm avec le même agitateur dans un milieu contenant 2 g/L de phosphate diammonique, 54,4 g/L de saccharose et 50 g/L d'éthanol.

Durant les fermentations en fioles Erlenmeyer, le taux d'inoculation est de 1 g/L, les fioles ont été directementensemencées avec une masse de 0,05 g de LSA afin d'avoir une bonne répétabilité entre chaque fiole, seule la détermination du temps de réhydratation, les optimisations de concentrations en glucose et le pH optimal ont été réalisées avec une inoculation à 0,5 g de LSA par litre.

Pour les fermentations en bioréacteur batch, le taux d'inoculation est de 0,5 g/L, excepté pour les quatre duplicats réalisés avec la condition aérée par le micro diffuseur à 0,02 litre d'air par litre de milieu et par minute (VVm) et agitée à 295rpm ainsi que celles réalisées par le micro diffuseur à 0,02 VVm (295rpm) et 20 g/L de glucose, dont l'inoculation est de 0,1 g/L. La condition sur moût est inoculée avec de 1,3 g de LSA/L. Au moment de procéder à l'ensemencement du fermenteur, les levures réhydratées sont inoculées dans le fermenteur à l'aide de la pompe péristaltique de la même façon que le milieu de croissance.

Pour les fermentations de type fed-batch, les levures réhydratées sont inoculées dans le fermenteur à l'aide de la pompe péristaltique de la même façon que lors des batch mais le taux d'inoculation est de 2 g/L (sauf fed-batch 2 et 3 ; 0,5 g/L).

## 4. Culture en fiole Erlenmeyer

Les fermentations en fioles Erlenmeyer ont été étudiées à un pH de 4,5 et à 28°C.

### 4.1. Mesures en fin de culture

Pour les essais d'optimisation de la concentration en phosphate diammonique, le suivi a été réalisé en fin de culture, en effectuant une analyse du milieu au temps zéro (t0) et une analyse en fin de culture (entre 24 et 170 heures, suivant les conditions testées) sans prélèvement intermédiaire. Quatre fioles ont été préparées pour chaque condition à tester: une fiole a été sacrifiée à l'instant t0 pour effectuer l'analyse des conditions initiales. Les autres fioles ont été analysées à la fin de l'essai, à raison de trois fioles par condition, ce qui permet d'avoir des triplicats pour chaque paramètre analysé.

### 4.2. Cinétique

Les autres essais, à savoir la recherche de la concentration en glucose réduisant l'effet Crabtree, l'optimisation du pH, de la concentration en azote et du taux d'ensemencement en LSA dans des conditions représentatives de ce qui se fait en cave, ont été réalisés en cinétique en effectuant plusieurs prélèvements entre le début et la fin de l'essai (entre 1 et 8 jours), c'est-à-dire un prélèvement à l'instant initial, puis un toutes les 12 ou 24 heures.

### 4.3. Perte de masse et quantité de CO<sub>2</sub> produit

Les fioles sont pesées à vide, puis avant et après chaque prélèvement pour déterminer la masse de CO<sub>2</sub> produite entre deux prélèvements.

Un suivi de la masse des fioles a ainsi été réalisé pour chaque essai toutes les 24 heures et en point final. Cela permet, pour chaque point réalisé, d'évaluer la perte de masse due à l'évaporation et au dégazage de CO<sub>2</sub>. Une fiole contenant du milieu seul a servi de témoin d'évaporation pour chaque essai, de sorte à pouvoir quantifier la perte de masse due à l'évaporation. Par ailleurs le milieu est acide (pH inférieur ou égal à 4,5), donc CO<sub>2</sub> dissous est l'espèce majoritaire mais il convenait également de vérifier que la quantité de carbone inorganique dissous était toujours négligeable par rapport à la quantité dégagée.

L'espèce majoritaire dans cette gamme de pH (de l'ordre de 4) est CO<sub>2</sub> dissous ; en effet le pK du couple CO<sub>2</sub> dissous/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> est de 6,3 à 28°C.

Nous supposons qu'il y a équilibre entre les deux phases, la loi de Henry peut donc être appliquée pour CO<sub>2</sub>. Elle peut s'exprimer selon :  $dCO_2 = k_{HCO_2} pCO_2$

où dCO<sub>2</sub> est la concentration de CO<sub>2</sub> dissous, pCO<sub>2</sub> sa pression partielle dans la phase gazeuse et k<sub>HCO<sub>2</sub></sub> sa constante de Henry égale 0,026 mol/L/atm à 28C (G. Liger-Belair, 2012; Gérard Liger-Belair, 2010; Gérard Liger-Belair, Polidori, & Jeandet, 2008; Gérard Liger-Belair & Rochard, 2008).

Le bouchon des fioles permet le transfert de gaz ; la pression partielle de CO<sub>2</sub> dans le ciel gazeux est donc supposée égale à celle régnant dans l'air (0,04% de CO<sub>2</sub>) et la pression totale est de 1 atm.

$$d\text{CO}_2 = 0,026 \times 4 \cdot 10^{-4} \times 44000 = 0,465 \text{ mg/L}$$

Si cette hypothèse n'était pas vérifiée et que la pression partielle de CO<sub>2</sub> était plus importante dans le ciel gazeux, la concentration de CO<sub>2</sub> dissous resterait faible ; par exemple, pour une pression partielle de CO<sub>2</sub> de 0,2 atm, certainement largement surestimée, la concentration de dCO<sub>2</sub> serait de 229 mg/L.

Il convient de comparer les masses de CO<sub>2</sub> dissoutes dans le volume de liquide de la fiole (50 mL), avec les pertes de masse mesurées qui sont toujours supérieures à 500 mg. Dans le cas d'un ciel gazeux composé d'air, la masse dissoute est de 0,009 mg ; dans le cas d'une pression partielle de CO<sub>2</sub> plus élevée (0,2 atm), la masse dissoute est de 4,6 mg. Dans les deux cas les masses de CO<sub>2</sub> dissoutes sont largement inférieures aux pertes de masse mesurées. On peut donc tout à fait légitimement relier la perte de masse mesurée (corrigée de la quantité évaporée) à la quantité de CO<sub>2</sub> produite et donc à l'activité biologique.

## 5. Culture en bioréacteur batch

### 5.1. Le bioréacteur utilisé et les sondes de suivi

Le réacteur utilisé est un Sartorius® BIOSTAT B, de 5 litres de capacité maximale. Dans le bio-fermenteur (Figure 16) le milieu est mélangé par un agitateur mécanique (pitch blade 3 pales) à 295 ou 500 rotation par minute (rpm) suivant les conditions opératoires testées. Un condenseur à la température de 10°C est disposé en sortie du gaz pour limiter l'évaporation de l'eau et de l'éthanol.

La vitesse de 295 rpm a été définie pour se rapprocher de ce qui se pratique habituellement en cave, à savoir 30 rpm pour une pale de 80 cm de diamètre. Ceci correspond à une vitesse de 1,2 m/s en bout de pale ; avec la pale de laboratoire de 8 cm de diamètre, à 500 rpm la vitesse en bout de pale était de 2 m/s. Nous avons adopté par la suite une vitesse de rotation de 295 rpm pour avoir une similitude.

Le pH est contrôlé en continu grâce à l'ajout d'hydroxyde de potassium (1 mol/L) pour maintenir une valeur de pH à 4,5 (±0,1), pour ne pas trop s'éloigner de celle du vin. La sonde pH (Hamilton EasyFerm™ Bio PHI ARC) était calibrée avant chaque stérilisation avec des étalons (pH 4,01 et 7,00). Chaque jour, un contrôle de la calibration est réalisé par la mesure du pH d'un prélèvement à l'aide d'une sonde de pH externe (calibrée à pH 4,01 et 7,00 juste avant la mesure) et la calibration de la sonde interne a été réalisée avec ce point.

La teneur en oxygène dissous n'est pas régulée mais est mesurée en continu grâce à une sonde à capteur optique (pO<sub>2</sub> de chez Hamilton VisiFerm™ DO ARC). La valeur affichée pO<sub>2</sub> est le pourcentage par rapport à la saturation en oxygène du liquide.

Une aération, dont le but est de pouvoir dissoudre les bulles d'air dans le liquide avant leur arrivée en surface, est réalisée par un diffuseur annulaire de 6cm de diamètre comportant 14 trous de 0,5mm de diamètre ou un micro diffuseur (fritté, en céramique dont les pores sont compris entre 1 et 12µm), placés au fond de la cuve, à différents débits d'air filtré à 0,2 µm (filtre Sartorius Midisart®), contrôlée par un débitmètre massique est réalisée afin d'apporter l'oxygène à la culture. Le débit d'air est exprimé en fonction du volume de milieu dans le bioréacteur en litre

d'air par litre de milieu et par minute (VVm) ; les valeurs de 0 ; 0,01 ; 0,02 ; 0,05 et 0,1.VVm ont été étudiées.

Un logiciel de contrôle et d'acquisition (BioPAT® MFCS) permet le suivi de la fermentation en temps réel, les valeurs des paramètres étant enregistrées toutes les 5 minutes, et la commande simultanée et automatique de différents paramètres influençant la culture des micro-organismes (pO<sub>2</sub>, pH, vitesse d'agitation, température).

Le fermenteur et les sondes étaient stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 20 minutes. Après stérilisation, lorsque la température du milieu était encore supérieure à 80°C, nous procédions à la calibration du point 0% en dioxygène dissous de la sonde pO<sub>2</sub> (la quantité d'oxygène dissous à cette température est nulle). Pour réaliser la calibration à 100%, le fermenteur était alimenté en air, au débit maximal utilisé pendant la fermentation, pendant plus de 10 heures pour saturer le milieu en oxygène.



Figure 16 : Photo du bioréacteur de marque Sartorius BIOSTAT® B et son panneau de contrôle utilisés lors des expériences en batch

La température a été maintenue à 28° C ( $\pm 0,2$ ) à travers une double enveloppe reliée à un cryostat (10°C) plus ou moins réchauffée par un système automatique, selon les besoins de la culture.

## 5.2. Détermination de la distribution des temps de séjour

Un volume de 5 litres d'une solution de NaCl à 8 g/L et de conductivité 14 mS/cm (conductimètre Consort C3010) à 28°C est mis dans la cuve du bioréacteur. Une pompe péristaltique introduit dans le réacteur de l'eau distillée (conductivité 15  $\mu$ S/cm) à 5 mL/min. Une

pompe de sortie soutire le mélange au même débit. Des fractions de 10 mL sont collectées toutes les deux minutes pendant 23 heures grâce à un collecteur de fraction (Gilson FC 203B). La mesure de la conductivité des fractions collectées permet de générer une courbe de distribution des temps de séjour expérimentale.

### **5.3. Caractérisation rhéologique du milieu de culture**

Des mesures de viscosité ont été effectuées à l'aide d'un rhéomètre (Lamy Rheology modèle RM 300 piloté par ordinateur à l'aide du logiciel Rheomatic-P), sur les échantillons de milieu prélevés avant inoculation, en début et en fin d'expérience. La contrainte de cisaillement est mesurée pour différentes valeurs de gradient de vitesse appliquées à un échantillon. Différents modèles de rhéologie ont été employés dont seuls certains ont donné des résultats exploitables suivant les caractéristiques définies (Ben Azouz Ahmed, 2012). Le comportement rhéologique du milieu est identifié en présence et en absence de cellules, à une température de 25°C.

### **5.4. Analyse de la composition de l'air en sortie**

La composition de l'air en dioxygène et en dioxyde de carbone, à l'entrée du bioréacteur et à la sortie de condenseur, est mesurée par un analyseur (Servomex®, Servoflex portables MiniMP 5200) utilisé avec la calibration faite par le fournisseur.

Les teneurs en O<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> en entrée du bioréacteur ont été mesurées en début d'expérience et supposées stable tout au long du suivi de la croissance. La composition en O<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> du gaz issu de la culture a été suivie en continu pendant la culture.

## **6. Culture en bioréacteur fed-batch**

La réhydratation et l'acclimatation ont été similaires à celles réalisées pour les fermentations batch, le bioréacteur utilisé pour la croissance des levures ainsi que celui pour le stockage du milieu d'apport étaient eux aussi identiques. Le milieu était le même que celui utilisé dans les essais batch avec un volume de départ de 1,2 litre dans lequel étaient ajoutées les levures réhydratées, ce volume est le minimum pour que le micro diffuseur et les pales d'agitation soient plongés dans le liquide. L'apport du milieu était réalisé à l'aide de la pompe péristaltique de l'unité de contrôle du bioréacteur.

Par la suite un procédé innovant a été développé à partir du procédé fed-batch (Figure 17), dont la description fera partie d'un chapitre des Résultats et Discussion.



Figure 17 : Photo des bioréacteurs isolés réalisés par la société Ceno Concept et le panneau de contrôle de marque Sartorius BIostat® B utilisés lors des expériences en fed-batch

## 7. Méthodes analytiques

Pour chaque essai batch ou fed-batch, le premier prélèvement est réalisé juste après l'inoculation et le dernier prélèvement avant l'arrêt du fermenteur ; au cours de la fermentation 3 à 6 prélèvements sont effectués par jour. Les échantillons sont prélevés de façon le plus aseptique possible pour déterminer la croissance cellulaire et effectuer toutes les analyses sur la composition du milieu de croissance.

Les fermentations ont été délibérément poursuivies après épuisement des sucres afin de connaître la réaction de la levure à ce manque de nutriments.

### 7.1. Caractérisation de la biomasse

Trois méthodes sont possibles pour caractériser la biomasse : la mesure de l'absorbance de la suspension, le comptage cellulaire et la détermination du poids sec.

Le suivi de biomasse par ces trois méthodes réalisé sur certains essais a permis d'établir des droites de corrélation entre les différentes mesures.

#### 7.1.1. Mesure de l'absorbance

La biomasse a été suivie principalement par mesure de l'absorbance à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (SHIMADZU UV-1800) en utilisant une cuvette de 2 mm de trajet optique. Pour obtenir la linéarité entre l' $Ab_{600}$  et la concentration cellulaire, il faut que l'absorbance soit comprise entre 0,2 et 0,8 unité d'absorbance, la suspension cellulaire est donc diluée avec de l'eau distillée en conséquence. L'erreur expérimentale est au maximum de 5 % (Lange, Bavouzet, Tallandier, & Delorme, 1993).

#### 7.1.2. Comptage de la biomasse et viabilité

Le comptage est réalisé 3 à 6 fois par jour par le compteur de particules Beckmann Coulter (multisizer 4) qui a la particularité de donner un nombre et une répartition de la taille des cellules dans le milieu. L'échantillon est préalablement dilué dans une solution d'électrolyte (Isoton II,

Beckman® Coulter) afin d'atteindre une concentration comprise entre  $1 \times 10^6$  et  $6 \times 10^6$  cellules/mL. Les solutions diluées sont traitées aux ultrasons (VWR® Bains à ultrasons-série USC T) pendant 5 minutes afin de séparer les agrégats avant la mesure.

Les cellules en suspension dans l'électrolyte sont convoyées vers la zone de détection en passant par l'orifice de la sonde d'un diamètre de  $30 \mu\text{m}$  puis entre deux électrodes ; le compteur de particules mesure une différence de potentiel électrique (une résistance électrique) provoquée par la membrane des cellules qui est chargée. Le volume d'électrolyte déplacé par chaque cellule est mesurable sous forme d'une impulsion électrique dont l'amplitude est proportionnelle à la taille de la cellule. Avec cet appareil on peut donc mesurer avec une bonne précision le nombre de levures et leur taille.

Le comptage par microscope est réalisé 1 à 2 fois par jour afin de s'assurer de la mesure réalisée par le compteur de particules.

La viabilité cellulaire est un critère important pour évaluer la qualité de la biomasse produite lors d'un procédé. La microscopie et le comptage réalisé à l'aide du compteur de particules ne permettent pas de discerner les cellules mortes des vivantes, seule une coloration sélective d'une des catégories de cellule le permet. Pour cela, une coloration au bleu de méthylène des cellules mortes est réalisée sur les échantillons.

Pour le comptage des cellules totales et vivantes sous le microscope (Lange *et al.*, 1993), la cellule de Fuchs & Rosenthal est utilisée (Figure 18). L'échantillon est dilué dans de l'eau distillée, puis mélangé volume à volume avec une solution de bleu de méthylène (0,1 g de bleu de méthylène dans un litre de solution de citrate de sodium à 2 %) pendant 10 min avant d'être compté sous le microscope (Figure 19).

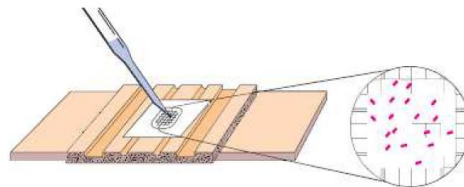


Figure 18: Schéma d'une cellule de Fuchs Rosenthal

Les cellules viables apparaissent incolores alors que les mortes sont colorées en bleu. D'après Lange *et al.* l'erreur expérimentale est inférieure à 8 %. Chaque comptage est réalisé à partir d'un minimum de 5 grands carrés de volume  $10^{-4}$  mL, eux-mêmes divisés en 16 carreaux. Pour obtenir un pourcentage d'erreur inférieur à 10 %, 150 cellules au minimum doivent être comptées. Si le comptage donne un nombre inférieur à 150 levures, les 16 grands carrés sont comptés. Si au contraire plus de 300 cellules sont visibles l'échantillon est dilué.

Le résultat est donné par la formule suivante où D est le facteur de dilution :

$$X \left( \frac{\text{levures}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Nombre de levures comptées}}{\text{Nombre de grands carrés comptés}} \times D \times 10^4$$



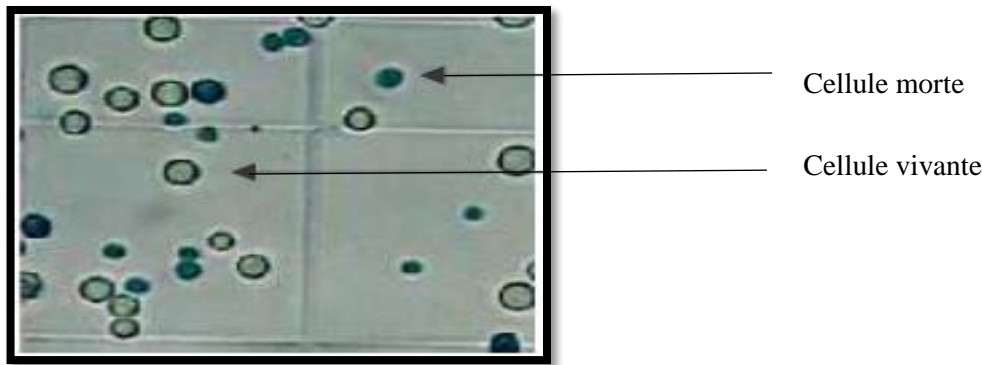


Figure 19 : Photo prise à l'aide de la caméra du microscope sur la lame de Fuchs & Rosenthal pour le dénombrement montrant les cellules mortes colorées par le bleu de méthylène et les cellules vivantes non colorées.

### 7.1.3. Mesure du poids sec des levures

Pour le mesurer, un volume de culture a été pesé sur une balance de précision (Mettler Toledo New Classic MS304S), puis centrifugé (5763g ; 20 min ; 2°C). Le culot des levures obtenu après la centrifugation de chaque échantillon est re-suspendu dans un même volume d'eau distillée que l'échantillon de départ pour éliminer les composés résiduels et ensuite centrifugé dans les mêmes conditions que précédemment. Le nouveau culot obtenu est remis en suspension dans de l'eau distillée et transféré dans une coupelle de pesée en aluminium préalablement séchée et tarée ; la coupelle est ensuite placée dans un four Pasteur (Memmert model 400) à 105°C pendant 1 semaine afin d'évaporer l'eau de l'échantillon. Les coupelles sont refroidies à température ambiante dans un dessiccateur et le poids sec mesuré. L'erreur expérimentale est au maximum de 5 % (Lange *et al.*, 1993).

### 7.1.4. Composition élémentaire CHNS de la biomasse

La détermination de la composition élémentaire de la biomasse est réalisée à partir d'un volume de biomasse centrifugé (5763 g ; 20min ; 2°C) dans un flacon de type Falcon de 15 mL. Le culot est re-suspendu dans un volume d'eau distillée identique à celui de l'échantillon de départ, puis re-centrifugé pour être lavé et est ensuite déposé dans un four à 105°C pendant 1 semaine. L'analyse élémentaire CHNS de la biomasse se fait à l'aide d'un analyseur CHNS FLASH 2000 de ThermoFisherScientific.

La pesée des standards et des échantillons s'effectue à l'aide d'une balance Mettler XP6 avec une précision de pesée de 1µg. L'analyse consiste à effectuer une combustion dynamique « Flash » de l'échantillon dans un réacteur maintenu à 930°C. Les produits gazeux de la combustion sont séparés sur la colonne chromatographique et détectés avec le catharomètre. L'azote, le carbone, l'hydrogène et le soufre sont détectés respectivement sous forme de : N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O et SO<sub>2</sub>. La détection des produits gazeux est basée sur les variations de la conductivité thermique du mélange gazeux entourant le capteur. La réponse du détecteur est proportionnelle à la concentration de l'espèce gazeuse analysée.

Les pesées des standards et des échantillons sont effectuées dans les nacelles en étain. Les masses pesées doivent être comprises entre 1 et 2 mg. Lorsque les échantillons à analyser

contiennent des concentrations élevées de carbone (ou soufre), on leur ajoute 1 mg d'oxyde de vanadium ( $V_2O_5$ ) pour assurer une combustion complète.

La méthodologie pour réaliser l'analyse consiste en la préparation de la droite d'étalonnage (5 pesées pour la droite) avec différents standards. Le choix des standards et les masses pesées sont adaptés à des concentrations présumées dans les échantillons. Ensuite, deux standards différents sont pesés en tant qu'inconnu pour valider la droite d'étalonnage. Et enfin, les échantillons destinés à l'analyse sont pesés en duplicats.

On obtient ainsi la teneur en C, H, N et S ; la teneur en oxygène est calculée par soustraction en admettant l'hypothèse qu'il représente la proportion restante.

## 7.2. Dosage des sucres, de l'éthanol et du glycérol

Le dosage est réalisé par chromatographie liquide haute pression (CLHP) couplée à un réfractomètre (Shodex RI 101, photo de l'appareil Figure 20) ; la phase stationnaire est une colonne cationique forte Aminex HPX-87H (Bio-Rad), fonctionnant en mode isocratique avec un éluant acide  $H_2SO_4$  2 mM dégazé, à un débit de 0,5 mL/min et une température de 45°C. Le réfractomètre en sortie de la colonne de la CLHP détecte les produits contenus dans l'échantillon sous forme de pics séparés. Suivant leur temps de rétention sur la colonne, les pics sont identifiés et le calcul de la surface sous tendue par les pics détectés est réalisé par le logiciel (Chroméléon 6.8) à partir des gammes étalons des différents produits.

Le volume d'injection est de 10  $\mu$ L et le temps d'analyse par échantillon de 30 min. Les gammes d'étalonnage des métabolites ont été réalisées sur 5 à 6 points compris entre 0,2 et 10 g/kg en mélangeant les différents composés (glucose, glycérol, éthanol, mais aussi malate et acétate). Les concentrations ont donc été exprimées en g/kg. Les coefficients de corrélation  $r^2$  des droites d'étalonnage étaient supérieurs à 0,99 et les gammes d'étalonnage ont été répétées toutes les deux semaines environ.

Une mesure préalable est effectuée sur les échantillons bruts à l'aide d'un réfractomètre pour mesurer l'indice Brix et prévoir les dilutions à effectuer pour rester dans la gamme de mesure des étalons CLHP (10 g/kg maximum) et éviter la saturation de la colonne CLHP.

Les échantillons ont été préparés immédiatement après les prélèvements et la mesure du Brix. L'échantillon brut a été dilué avec de l'eau milliQ en dilution masse-masse: l'échantillon brut, puis l'échantillon dilué ont été pesés et le facteur de dilution a été calculé à partir de ces mesures.

Une fois les échantillons dilués du facteur approprié, ils sont filtrés avec un filtre 0,2  $\mu\text{m}$ , puis sur une cartouche C18 pour retirer toute trace de protéine ; la cartouche a été préalablement activée avec 10 mL de méthanol, puis rincée avec 10 mL d'eau et déposée dans une fiole ou Vial de 2 mL.

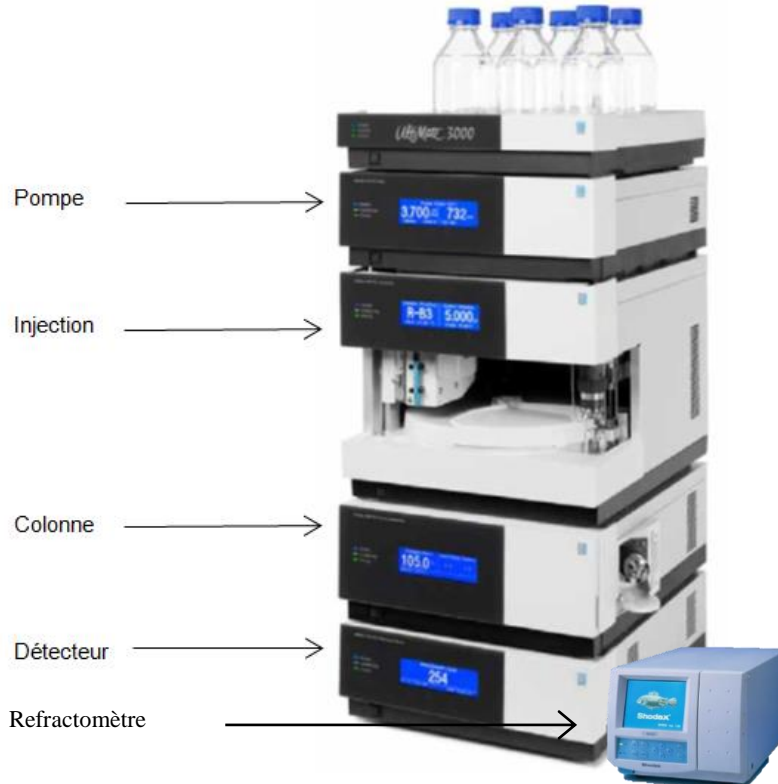


Figure 20 : Photo de l'appareil CLHP Ultimate 3000 avec les différents compartiments servant à l'analyse.

### 7.3. Dosage des ions

Le dosage des ions est réalisé par chromatographie ionique, pour des concentrations de 0,05 à 50 ppm, avec l'appareil Thermo Scientific Dionex ICS-5000+ HPCI System (Figure 21) muni des dispositifs suivants (Bio-Rad) : pré colonne IONPAC AG11-HC (2x50mm) + colonne anionique IONPAC AS11-HC (2X250mm) pour les anions ou pré colonne IONPAC CG16 (3x50mm) + colonne cationique IONPAC CS16 (3X250mm) pour les cations.

L'analyse est réalisée à 35°C avec une détection par un conductimètre. L'élution est réalisée respectivement avec de l'hydroxyde de potassium (30 mM) à un débit de 0,3 mL/min pour les anions et de l'acide méthane sulfonique (30 mM) à un débit de 0,36 mL/min pour les cations.

Le volume d'injection est de 2,5  $\mu\text{L}$  pour les anions et 10  $\mu\text{L}$  pour les cations ; le temps d'analyse par échantillon est de 50 min.

Pour éliminer le bruit parasite de la ligne de base un surpresseur est utilisé à une intensité 23 mA pour les anions et 32 mA pour les cations. Les coefficients de corrélation  $r^2$  des droites d'étalonnage étaient supérieurs à 0,99. Les échantillons ont été préparés de la même façon que les échantillons CLHP.

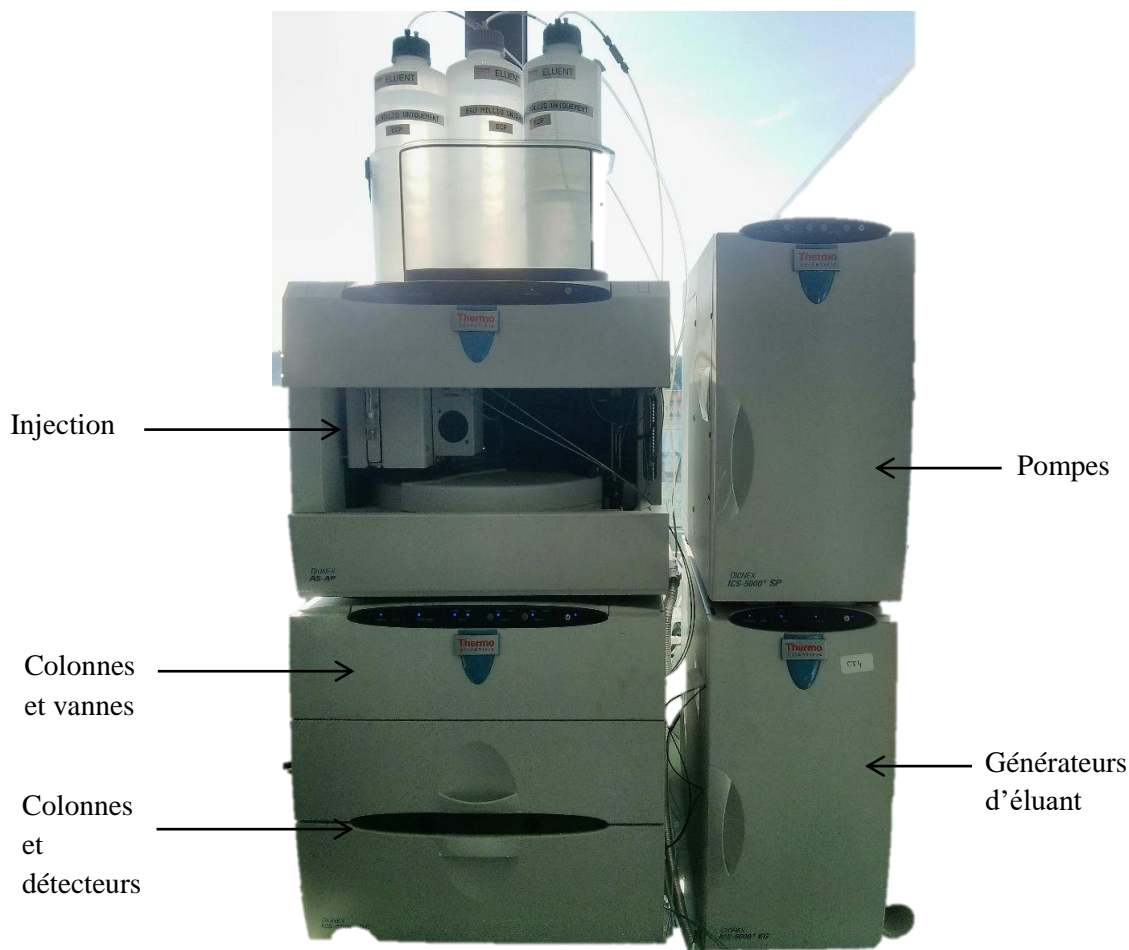


Figure 21 : Photo de l'appareil de chromatographie ionique avec les différents compartiments servant à l'analyse des ions

Comme précédemment, l'intégration de l'aire sous les pics (donnés par le logiciel Chroméleon 7.2) donne les concentrations des ions correspondant à chaque ion, grâce aux gammes étalons. Les principaux ions sont identifiés par leur temps de rétention.

## 7.4. Méthodes d'analyse des cinétiques

### 7.4.1. Calcul des vitesses de production de $\text{CO}_2$ et de consommation d' $\text{O}_2$

#### $\text{CO}_2$ :

Pour ces mesures les fermentations des levures *S. cerevisiae* ont été réalisées en fioles Erlenmeyers de 250 mL. Les échantillons de 1 mL sont prélevés toutes les 12 à 24 heures au cours de la croissance. Les fioles sont pesées avant [ $m_{\text{avant}}$ ] et après [ $m_{\text{après}}$ ] chaque prélèvement.

$$m_{\text{CO}_2}(t) = m_{\text{CO}_2}(t-1) + m_{\text{après}}(t-1) - m_{\text{avant}}(t)$$

avec  $m_{\text{CO}_2}(t)$  la masse de  $\text{CO}_2$  produite entre 0 et t.

Le volume de culture entre le prélèvement à t-1 et celui à t est égal à  $V_0 - n v_p$  avec  $V_0$  (0,05 L) volume initial,  $v_p$  le volume d'un prélèvement et le nombre de prélèvement avant le temps t.

En exprimant la masse de  $\text{CO}_2$  produite par unité de volume de culture entre 0 et t, soit  $\text{CO}_2(t)$  il vient :

$$\text{CO}_2(t) = \text{CO}_2(t-1) \frac{V(t-1)}{V(t)} + \frac{m_{\text{après}}(t-1) - m_{\text{avant}}(t)}{V(t)},$$

On obtient ainsi la quantité de  $\text{CO}_2$  dégagé en g/L depuis le début de la croissance en estimant que la perte de poids est entièrement due à la production de  $\text{CO}_2$ .

On a en effet montré par un blanc sans cellule que l'évaporation ne représentait qu'une perte de poids négligeable.

### $\text{O}_2$ :

Pour le dioxygène dissous,  $\text{O}_{2d}$  est mesuré lors de culture en bioréacteur uniquement, par la sonde  $\text{pO}_{2d}$  lors des études en bioréacteur et exprimé en pourcentage de saturation.

## **7.4.2. Calcul des rendements de production des produits de fermentation suivis**

Les rendements globaux ont été calculés de la façon suivante (avec les masses m en g et les concentrations en g/kg):

$$Y_{X/S} = \frac{[X]_{\text{finale}} \times m_{\text{milieu, finale}} - [X]_{\text{initiale}} \times m_{\text{milieu, initiale}}}{[S]_{\text{finale}} \times m_{\text{milieu, finale}} - [S]_{\text{initiale}} \times m_{\text{milieu, initiale}}},$$

avec X le métabolite pour lequel le rendement est calculé et S le substrat considéré ; les grandeurs entre crochets sont les concentrations.

Dans le cas de l'étude de la production d'éthanol, le rapport des concentrations d'éthanol et de glycérol à la fin de la fermentation a également été calculé.

## **7.5. Régulation de l'ajout de substrat au cours de la culture fed-batch**

La sensibilité de *Saccharomyces cerevisiae* à l'effet Crabtree implique un apport progressif du glucose dans le réacteur afin de ne pas dépasser la valeur seuil au-dessus de laquelle la levure commence à effectuer un métabolisme privilégiant la fermentation. La pompe ajoutant le substrat dans le réacteur est régulée indirectement par la mesure de la température dans le milieu de culture. Durant la phase batch préliminaire au démarrage de l'alimentation, l'unité de contrôle est raccordée à la double enveloppe et le liquide caloporteur y circule afin de garder la culture à la température de consigne. Durant cette période, les cellules oxydent le glucose jusqu'à épuisement grâce au dioxygène provenant de l'aération continue. Cette phase est marquée par une diminution de la concentration en oxygène dissous jusqu'à un minimum. Après le signe d'un début de croissance, mesuré par augmentation de l'absorbance, la double enveloppe est déconnectée de

l'unité de contrôle et vidée de son liquide. Le signal électrique servant auparavant à déclencher l'ouverture de l'électrovanne permettant la circulation de l'eau dans la double enveloppe est dévié afin de faire fonctionner la pompe péristaltique qui enverra le milieu froid en remplacement du refroidissement par la double enveloppe pour refroidir la culture.

L'alimentation est stockée à une température proche de zéro degré Celsius. La régulation fed-batch commence lorsque la température dans le réacteur augmente de 0,2°C (précision de la sonde PT 100 utilisée pour la régulation). Cette augmentation de la température active une pompe qui ajoute le milieu froid pour refroidir la culture, tout en apportant les nutriments nécessaire.

Nous allons maintenant exposer les résultats obtenus lors de ce projet, tout d'abord en petits contenants de 250 millilitres puis en bioréacteur de cinq litres.



# Chapitre 3 :

Résultats et  
discussion :

Production de levure  
en milieu hydro-  
alcoolique





## Table des matières

Chapitre 3 : Résultats et discussion : Production de levure en milieu hydro-alcoolique ...	67
1. Introduction .....	71
2. Etude et optimisation des cultures en fioles Erlenmeyer.....	72
2.1. Réhydratation et inoculation des levures .....	72
2.1.1. Effet du taux d'ensemencement .....	72
2.1.2. Optimisation du temps de réhydratation avant inoculation .....	74
2.2. Effet de la concentration en glucose et effet Crabtree .....	77
2.2.1. Effet de la concentration initiale en glucose dans le milieu .....	77
2.2.2. Optimisation de la concentration initiale en glucose pour une production de biomasse maximale .....	81
2.2.3. Conclusion de l'effet glucose .....	83
2.3. Influence de la concentration en azote.....	83
2.4. Influence de la nature de la source carbonée .....	85
2.5. Effet du pH .....	87
2.6. Essai de fermentation avec les levures produites par le procédé .....	89
2.7. Conclusion de la partie fioles Erlenmeyer .....	90
3. Etude en bioréacteur batch .....	91
3.1. Corrélations entre poids sec, absorbance et concentration cellulaire .....	92
3.2. Détermination de la distribution des temps de séjour .....	94
3.3. Influence de l'aération sur l'oxygénation du milieu .....	96
3.4. Calcul des $k_L a$ .....	98
3.5. Influence de l'aération sur les temps de doublement.....	100
3.6. Influence de l'aération sur la production de biomasse et consommation de glucose .....	102
3.6.1. Condition balayage de la tête de cuve (0,2 VVm ; 500 rpm) .....	102
3.6.2. Condition diffuseur annulaire (0,1 VVm ; 500 rpm).....	103
3.6.3. Condition micro diffuseur (0,1 ; 0,05 ; 0,01 VVm; 500 rpm) .....	104
3.6.4. Condition micro diffuseur (0,02 VVm ; 295rpm) .....	105
3.6.5. Condition micro diffuseur (0,1 VVm ; 295rpm faible concentration de glucose).....	106
3.6.6. Condition micro diffuseur sur moût (0,02 VVm ; 295rpm) .....	107
3.6.7. Récapitulatif .....	109
3.7. Influence de l'aération sur les produits de fermentation.....	113
3.7.1. Evaporation de l'éthanol .....	113
3.7.2. Condition balayage de la tête de cuve (0,2 VVm ; 500 rpm) .....	114
3.7.3. Condition diffuseur annulaire (0,1 VVm ; 500 rpm).....	116

3.7.4. Condition micro diffuseur (0,1 ; 0,05 ; 0,01 VVm; 500 rpm) .....	117
3.7.5. Condition micro diffuseur (0,02 VVm ; 295rpm) .....	118
3.7.6. Condition micro diffuseur (0,1 VVm ; 295rpm faible concentration de glucose) .....	120
3.7.7. Condition micro diffuseur sur moût (0,02 VVm ; 295rpm) .....	121
3.7.1. Récapitulatif .....	122
3.8. Vitesse spécifique de croissance.....	123
3.9. Détermination de la part de respiration et de fermentation dans les essais batch entre l'instant initial et celui où le glucose est épuisé .....	124
3.10. Conclusion .....	125
4. Production de levure en bioréacteur alimenté (fed-batch).....	126
4.1. Optimisation de la phase de démarrage .....	126
4.2. Procédé mis en œuvre pour la production de micro-organismes .....	126
4.3. Nouveau procédé de culture .....	127
4.3.1. Description de la stratégie développée .....	127
4.3.2. Etude de la chaleur dégagée par l'agitation mécanique .....	130
4.3.3. Corrélations entre poids sec, absorbance et concentration cellulaire ....	131
4.3.4. Exemples de résultats d'essais en fed-batch alimenté par un milieu refroidi .....	132
4.3.4.1. Fed-batch à une concentration en glucose initiale de 10 g/L et apport de 50 g/L .....	132
4.3.4.2. Fed-batch à une concentration en glucose initiale de 5 g/L et apport de 10 g/L .....	134
4.3.4.3. Fed-batch à une concentration en glucose initiale de 5 g/L et apport de 25 g/L, puis différents essais de vidanges et remises en fonctionnement du procédé	135
4.3.5. Récapitulatif des divers essais .....	137
4.4. Conclusion des essais fed-batch .....	140
5. Fed-batch pilote .....	141
5.1. Caractérisation rhéologique du milieu de culture .....	141
5.2. Schéma de procédé .....	143

## 1. Introduction

Durant ce projet de recherche doctoral, nos essais se feront dans un milieu hydro-alcoolique dont la concentration en éthanol à l'instant initial est d'environ 50 g/L. Les levures utilisées sont issues d'une souche *Saccharomyces cerevisiae* commercialisée par l'Institut Œnologique de Champagne sous la dénomination IOC Fizz+ et sous forme de Levures Sèches Actives (LSA). Nous avons choisi cette souche car elle est vendue comme ayant une bonne résistance à l'alcool, jusqu'à 14% vol. (110 g/L d'éthanol environ).

Dans un premier temps, les manipulations ont été consacrées à l'amélioration du protocole de réhydratation des levures, principalement pour un gain de temps des essais futurs. Dans un deuxième temps, les essais se sont concentrés sur les cultures en fiole Erlenmeyer afin d'optimiser les concentrations en nutriments ajoutés dans le milieu avant l'inoculation. Une fois les concentrations optimales en nutriments déterminées, des cultures en batch ont été conduites dans des conditions physico-chimiques similaires à celles pratiquées en cave dans le milieu vinicole. Elles ont permis d'atteindre des concentrations en biomasse 15 fois supérieures à celles obtenues habituellement en cave. Toutefois la poursuite du mode batch ne permet pas d'augmenter encore ces concentrations ; c'est pour cette raison que dans un troisième temps nous avons adopté le mode de culture fed-batch avec le développement d'un nouveau procédé de contrôle de l'alimentation en nutriments.

Afin d'étudier la physiologie cellulaire des levures au cours des cultures, différents paramètres sont déterminés, ils sont suivis en continu ou mesurés par analyse sur des prélèvements périodiques :

- pourcentage de saturation en oxygène du liquide, température et pH
- biomasse sèche, absorbance de la solution, concentration en levure (comptage en cellule par microscopie et utilisation d'un compteur de particules).
- concentrations des différents substrats et produits de fermentations
- composition du gaz en entrée et sortie de bioréacteur

Toutes les informations relatives au mode opératoire et conditions précises sont données dans le chapitre Matériel et Méthodes.

Dans ces cultures où la concentration de glucose est assez élevée, on observe l'effet Crabtree, phénomène dans lequel le glucose est principalement dégradé par la voie fermentaire en raison de la répression du système respiratoire (De Deken, 1966; Swanson & Clifton, 1948). La voie fermentaire conduit à une augmentation de la production d'éthanol dans le milieu, molécule dont la présence à concentration élevée, inhibe la croissance de la levure. La fermentation du glucose en éthanol et dioxyde de carbone produit moins d'ATP (2 molécules d'ATP) que la respiration du glucose en eau et en dioxyde de carbone (36 molécules d'ATP). Par conséquent, un rendement en biomasse moindre devrait être observé. De plus la fermentation ne produit que deux moles de CO<sub>2</sub> par mole de glucose consommé alors que la respiration en produit six ; on a donc une différence sur la quantité de CO<sub>2</sub> produite. Par contre la consommation du glucose par la fermentation est plus rapide que par respiration. Nous supposons que dans nos essais se superposent les deux mécanismes de fermentation et de respiration à une proportion variable selon les conditions (notamment la concentration de glucose).

Lors de nos essais, les variations des conditions de culture étudiées, ayant une incidence sur les deux métabolismes (fermentation et respiration), il s'en suit une production d'énergie et de biomasse variables au cours de l'étude.

## **2. Etude et optimisation des cultures en fioles Erlenmeyer**

Lors des cultures en fioles on ne peut maîtriser ni l'aération, ni le pH ; les mesures de poids sec sont faites après des périodes plus ou moins longues après l'épuisement du glucose. C'est pour ces raisons que les résultats de croissances effectuées en Erlenmeyer sont parfois un peu différents selon les séries d'expériences, mais ils sont très reproductibles à l'intérieur d'une même série.

Nous supposons cependant que le transfert d'oxygène vers la culture est satisfaisant pour deux raisons : (i) une importante phase gazeuse existe au-dessus de la culture (80 % du volume total de la fiole) ; (ii) le bouchon en mousse permet un échange de gaz avec l'extérieur dans les deux sens. Au moment de l'inoculation le milieu est saturé en oxygène ; par la suite le transfert d'oxygène peut se faire à l'interface entre l'air ambiant et la culture ; il est facilité par l'agitation qui assure une bonne aire de contact entre les deux phases. Même s'il est difficile de quantifier les apports d'oxygène dans ce cas, ils peuvent être considérés comme assez bons, supérieurs en tous cas à ce qu'un vin clair ou un moût de raisin reçoit en vinification (Sumino, 1992; Sumino, Sonoï, & Akiyama, 1992), mais peut-être pas suffisants pour un bon rendement en biomasse.

La perte de masse du milieu de culture a été suivie au cours du temps. Elle est due à deux phénomènes : évaporation du milieu et dégagement de CO<sub>2</sub> lié à la consommation de glucose par l'activité biologique. La perte de masse spécifique à l'activité biologique a été calculée à partir de la perte de masse totale à laquelle a été soustraite la masse évaporée ; cette dernière a été estimée grâce à des essais témoins, sans encemensement. Nous avons vérifié par ailleurs que la quantité de carbone inorganique dissous était négligeable (cf. Matériel et méthodes 4.3 Perte de masse et quantité de CO<sub>2</sub> produit ; page 54). Dans tous les cas, sauf l'étude de l'influence du pH, le pH initial a été fixé à 4,5.

### **2.1. Réhydratation et inoculation des levures**

Les réhydratations sont réalisées à 37°C dans une solution isotonique de saccharose à 54,4 g/L, pendant 100 minutes, sous une agitation de 80 rpm.

#### **2.1.1. Effet du taux d'ensemencement**

Les levures utilisées dans le milieu vinicole étant disponibles sous forme sèche, il faut d'abord les réhydrater et étudier la quantité d'inoculum à introduire pour un développement satisfaisant des micro-organismes. Les fournisseurs de levures sèches actives (LSA) préconisent une inoculation de 0,2 g de LSA par litre de moût à vinifier. Nous avons dans cette partie étudié différents taux d'inoculation des levures après réhydratation dans le but de minimiser le temps de latence lors de nos futurs essais de croissance en bioréacteur de cinq litres, sans pour autant trop nous éloigner des conditions pratiquées en caves.

Différentes concentrations de levures activées ont été testées: 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 ou 0,5 g LSA par litre. Ces teneurs correspondent à des ajouts croissants d'une solution mère de LSA à 100 g/L, préalablement réhydratée. Une acclimatation des levures au vin est ensuite réalisée

(30°C ; 80 rpm ; 75 min) ; le volume nécessaire de vin à 95 g/L d'éthanol est ajouté afin d'avoir une concentration finale en éthanol de 50 g/L.

Les cultures ont été réalisées en duplicats dans des fioles de 250 mL dans le milieu vin dilué, contenant du glucose (78 g/L), du phosphate diammonique (0,2 g/L), de l'extrait de levure (0,5 g/L) et du sulfate de zinc (0,2 g/L), à une température de 28°C et sous une agitation de 110 rpm. Les Erlenmeyer ont été pesés deux fois par jour durant 3 jours afin de suivre la perte de masse (Figure 22).

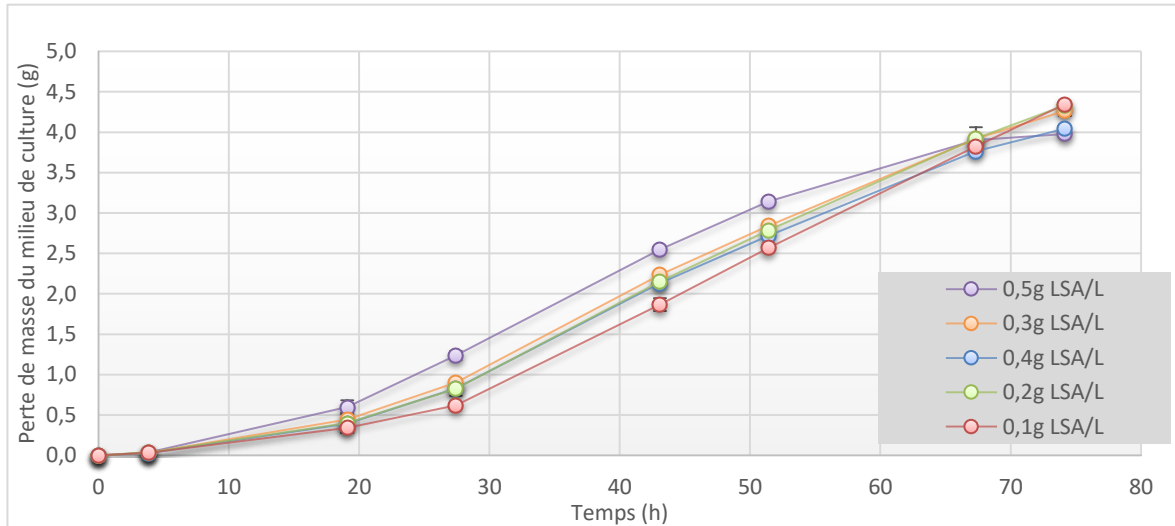


Figure 22 : Perte de masse des cultures en fonction du temps, pour différentes concentrations en LSA inoculées dans le milieu de croissance (mode discontinu, 28°C).

Entre 0,2 et 0,4 g LSA/L les courbes sont très proches les unes des autres. La courbe correspondant à la conditionensemencée à 0,1 g LSA/L montre une activité biologique inférieure. La courbe correspondant à 0,5 g LSA/L quant à elle, montre une activité biologique plus importante, elle démarre plus rapidement mais cette différence tend à s'estomper après 70 h de culture. Nous pouvons supposer à cet instant un épuisement du milieu en nutriment, certainement le glucose, bien que nous n'ayons pas d'analyse à ce temps de culture pour le prouver. Par contre des analyses à 75 h montrent que le glucose est épuisé dans tous les cas, la concentration d'éthanol est de l'ordre de 60 g/L et le pH de 2,9.

En fin d'étude, soit après 75 heures de culture, le volume de milieu restant dans chacune des fioles a été récupéré et traité pour mesurer le poids sec de levure obtenu. Les poids de levure en fonction des conditions testées sont représentés sur la Figure 23.

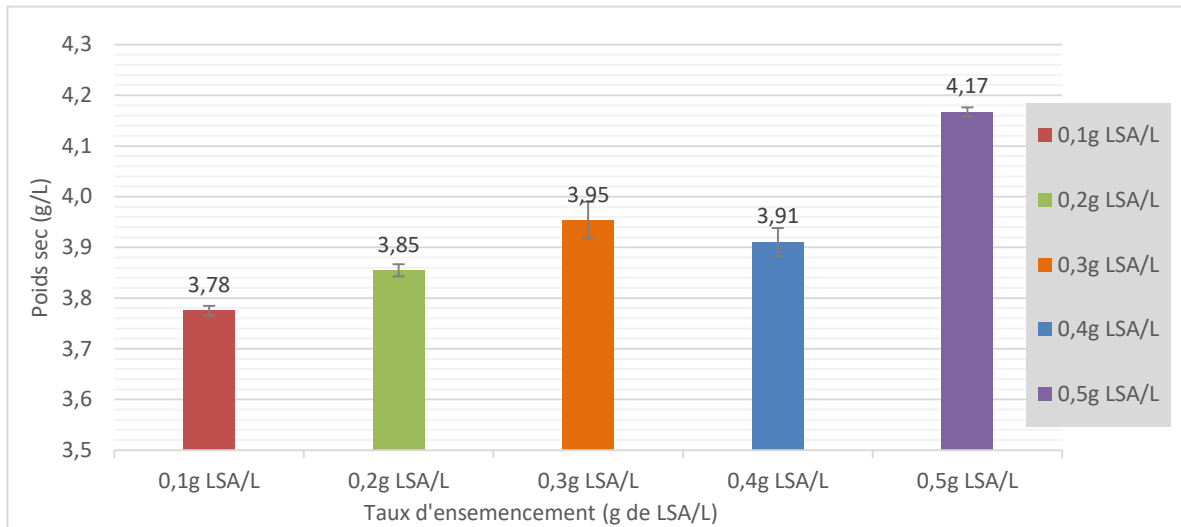


Figure 23 : Représentation de la biomasse totale (en gramme par litre de poids sec) en fonction du taux d'ensemencement en LSA du milieu de croissance pour une culture en mode discontinu à 28°C après 75 heures de culture.

Les histogrammes représentant les poids secs révèlent un poids sec maximal de 4,17 g/L après 75 heures de culture pour un taux d'inoculation de 0,5 g LSA/L.

Pour cette concentration, on obtient une bonne productivité proche de 0,05 g/L/h. Toutefois ce chiffre est certainement imprécis ; il est calculé en effet pour 75 h de culture, mais l'épuisement du glucose s'est probablement produit avant. Par ailleurs, entre le moment où le glucose s'est épuisé et la fin de la culture, la levure a dû reconsommer certains produits de fermentation, produisant de la biomasse, lors d'une seconde phase de croissance, notamment le glycérol donnant des concentrations de 4,17 ; 4,16 ; 3,98 ; 4 et 3,58 g/L pour respectivement 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 et 0,5 g LSA/L.

Avec un taux d'inoculation de 0,5 g/L, nous obtenons une biomasse plus importante et une vitesse de croissance supérieure à celles obtenues avec le taux d'inoculation de 0,2 g/L, préconisé par le fournisseur lors d'ensemencement de cuves à vinifier ; nous avons donc décidé d'utiliser la concentration initiale de 0,5 g LSA/L lors des futurs essais en bioréacteur. Pour certaines cultures en fioles Erlenmeyer nous avons préféré 1 g LSA/L pour des questions de facilité de pesée.

### 2.1.2. Optimisation du temps de réhydratation avant inoculation

Nous avons ensuite testé différents temps de réhydratation de 100, 50 et 0 minutes avant inoculation avec un taux identique de 0,5 g LSA/L.

Deux concentrations en glucose de 10 et 100 g/L ont été testées en triplicats, avec pour chacune : 0,2 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 0,5 g/L d'extrait de levure et 0,2 g/L de sulfate de zinc, à une température de 28°C et sous une agitation de 110 rpm ; les résultats sont représentés sur le même graphique (Figure 24).

Le taux de production global de CO<sub>2</sub> sur la durée de la culture est d'environ 0,06 g de CO<sub>2</sub> perdu par heure pour les deux concentrations de glucose. Ce taux est inférieur d'un facteur dix à ceux observés dans la littérature (Tracey & Simpson, 1986) à partir de milieux de croissance ne contenant pas d'éthanol. L'effet inhibiteur de l'éthanol qui apparaît ici et qui est très souvent décrit dans la littérature sera un des principaux facteurs à prendre en compte pour un futur développement optimal de la levure dans le milieu hydro-alcoolique (Ansanay-galeote, Blondin, Dequin, & Sablayrolles, 2001; Moulin *et al.*, 1984).

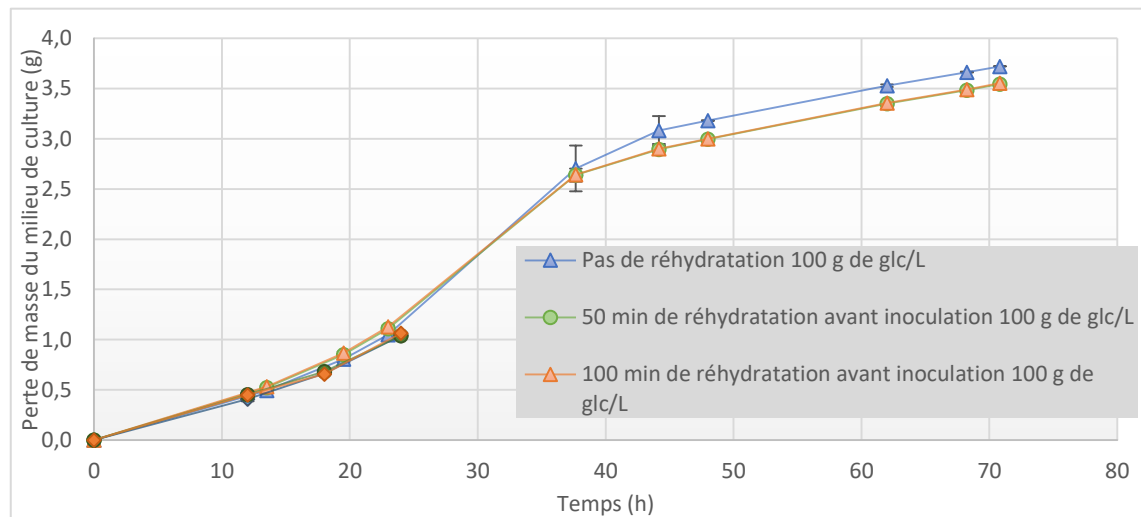


Figure 24 : Représentation graphique de la perte de masse en fonction du temps, suivant différents temps de réhydratation des LSA inoculées dans le milieu de croissance pour une culture de la levure en mode discontinu à 28°C durant 24 ou 70 heures suivant 2 concentrations en glucose initiales différentes.

Les cultures réalisées à 10 et 100 g/L de glucose initial ont été arrêtées au moment estimé de l'épuisement du glucose : 24 h pour 10 g/L et 70 h pour 100 g/L.

Les courbes obtenues pour la perte de masse sont proches les unes des autres, quelles que soient la concentration de glucose et la durée de réhydratation (y compris sans réhydratation). Le fait d'utiliser les LSA sans réhydratation préalable ne semble pas avoir d'incidence sur leur vitesse de croissance.

Sur les vingt premières heures les courbes représentant les conditions à 10 g/L de glucose sont superposables avec celles à 100 g/L. Ces pertes de masse comparables laissent supposer une activité biologique des levures similaire pour les deux concentrations de glucose. Comme il est certain que l'effet Crabtree existe pour 100 g/L à cause de cette forte concentration de glucose, il en est de même pour la concentration initiale de 10 g/L. La répression caractérisée par l'effet Crabtree semble donc activée dès une concentration initiale en glucose de 10 g/L.

Les produits de fermentation ont été analysés ; les résultats ne sont pas présentés ici, mais donnent des concentrations similaires d'éthanol et de glycérol, ce qui tend à confirmer que le développement de la levure est proche pour les différentes modalités.

Par conséquent, la réhydratation préalable ne semble pas nécessaire au vu des résultats obtenus, pour 10 g/L de glucose comme pour 100 g/L. Certains auteurs reportent cependant que lorsque le temps de réhydratation est supérieur à 30 minutes, la viabilité des levures est augmentée, mais nous ne l'observons pas. Nos résultats concordent avec ceux d'auteurs tels que



## Résultats et discussion

Soubeyrand *et al.* (2005), qui n'ont pas trouvé d'amélioration de la viabilité des LSA après réhydratation.

En fin de culture, soit après 24 ou 70 heures, un volume important de milieu a été prélevé dans chacune des fioles afin de déterminer le poids sec obtenu, mesure de la biomasse produite (Figure 25).

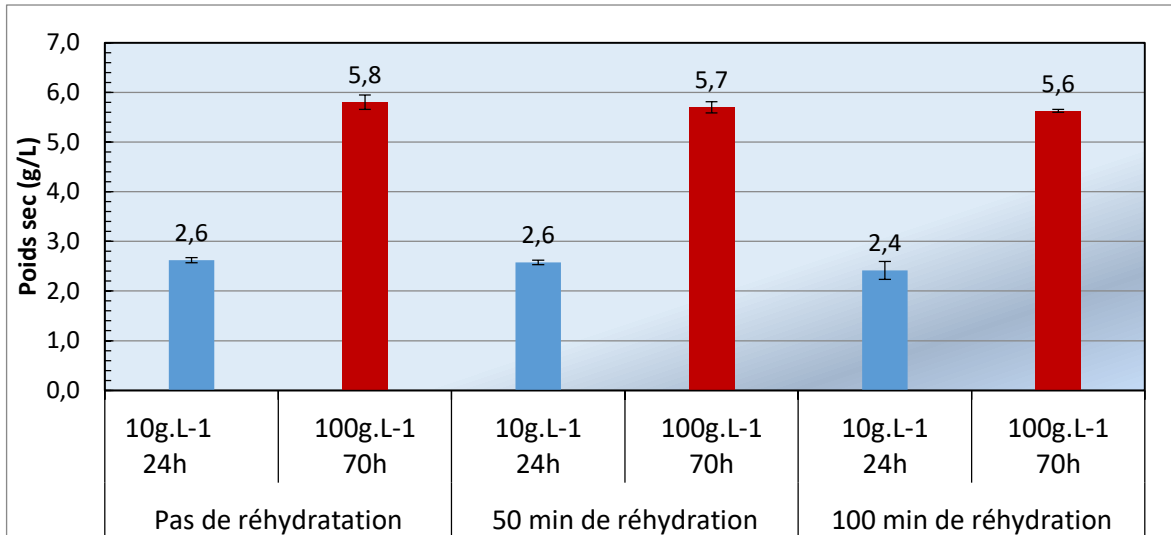


Figure 25 : Représentation de la biomasse totale (en gramme par litre de poids sec) en fonction de différents temps de réhydratation des LSA inoculées dans le milieu de croissance pour une culture en mode discontinu à 28°C durant 24 ou 70 heures suivant 2 concentrations en glucose initiales différentes.

Les histogrammes représentant les poids secs ne montrent pas de différence pour une même concentration en glucose, quelles que soient les conditions de réhydratation. On obtient un poids sec d'environ 5,7 g/L après 70 heures de croissance dans un milieu contenant 100 g/L de glucose et environ 2,6 g/L après 24 heures de croissance dans un milieu contenant 10 g/L de glucose.

Le rendement de biomasse à partir du glucose global est très différent entre les deux cultures ; il est de 0,057 g de biomasse par g de glucose pour la condition à 100 g/L contre 0,26 pour 10 g/L de glucose, mais il faut noter qu'il n'est pas calculé sur le même temps de culture (24 h pour 10 g/L et 70 h pour 100 g/L) et que la proportion respiration/fermentation varie certainement le long de la culture par suite de la variation de la concentration du glucose.

Pour les deux conditions on obtient des productivités de biomasse proches, entre 0,08 et 0,1 g/L/h, là encore certainement mésestimées du fait de la méconnaissance précise du moment où le glucose est épuisé et d'une croissance supplémentaire après par consommation des produits de fermentation. A noter que cette productivité est deux fois plus élevée que la productivité obtenue lors des essais de concentrations d'inoculation avec une concentration initiale en glucose de 78 g/L, productivité cette fois aussi, sous-estimée, ce qui montre l'imprécision de cette détermination.

Lors de la réalisation de la réhydratation, le temps de réhydratation n'a pas d'influence sur l'activité des levures.

## 2.2. Effet de la concentration en glucose et effet Crabtree

### 2.2.1. Effet de la concentration initiale en glucose dans le milieu

Au vu de la littérature, l'hypothèse qui a été faite est que le rendement spécifique de conversion en biomasse dans des conditions respiratoires serait plus élevé que celui obtenu par croissance fermentaire. Il est donc important de privilégier la respiration pour obtenir une bonne productivité de biomasse ; cela dépend fortement de la concentration de glucose dans la culture, paramètre clef dans l'apparition de l'effet Crabtree.

Les études réalisées par la suite ont donc servi à optimiser la concentration de glucose pour laquelle on a une croissance maximale, ce qui revient à avoir du glucose en quantité suffisante car c'est la source carbonée privilégiée de la levure, mais sans excès pour éviter l'effet Crabtree. Pour ces essais, les fioles ont étéensemencées à une concentration de 1 g LSA/L sans réhydratation préalable.

Trois concentrations initiales en glucose de 10, 50 et 100 g/L ont été testées en triplicats, avec pour chaque condition : 0,2 g/L de  $((\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4)$ , 0,5 g/L d'extrait de levure et 0,2 g/L de sulfate de zinc, à une température de 28°C et sous une agitation de 110 rpm avec un suivi sur 139 heures. Les pertes de masse, sont présentées pour les trois conditions sur la Figure 26.

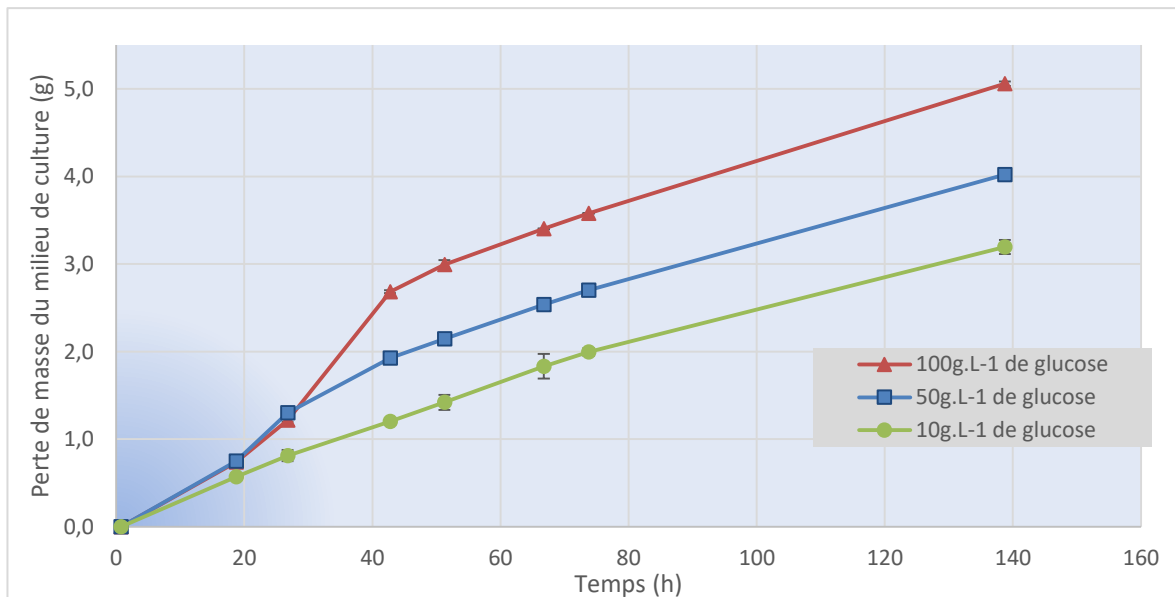


Figure 26 : Représentation graphique de la perte de masse du milieu de culture en fonction du temps, suivant différentes concentrations en glucose initiales (10, 50, 100 g/L) pour une culture de la levure en mode discontinu à 28°C durant 139 heures.

Durant les vingt premières heures les résultats obtenus pour les trois conditions sont proches avec une perte moyenne de  $0,685 \pm 0,100$  g/L. Entre 20 et 27 heures de croissance, la perte de masse commence à différer pour les trois conditions ; pour la concentration de 10 g/L elle est de seulement  $0,244 \pm 0,062$  g/L contre en moyenne  $0,517 \pm 0,052$  g/L pour les concentrations de 50 et 100 g/L, soit une différence d'un facteur supérieur à 2. C'est probablement dû à une

## Résultats et discussion

prédominance de la respiration pour la culture à 10 g/L, dans cette zone où les concentrations de glucose sont plus faibles, ce qui donne une vitesse plus réduite.

Par la suite, les trois courbes sont bien séparées donnant après 40 heures des pertes de masse très différentes.

Pour des raisons pratiques, nous n'avons pas de points expérimentaux entre 74 et 139 h ; c'est aux alentours de 70 h que le glucose s'épuise dans les deux conditions 50 et 100 g/L de glucose. On devrait donc peut-être observer un plateau de quelques heures, dû à un ralentissement de la croissance lié à l'épuisement du glucose, suivi d'une seconde phase de croissance, correspondant à l'utilisation d'un autre substrat carboné dont la vitesse de consommation est moins importante ; ce phénomène, appelé diauxie, sera observé dans de futurs essais.

Pour plus de clarté, la Figure 27 représente les vitesses de perte de masse tout au long de la culture, donc au fur et à mesure de l'utilisation du glucose. Cette vitesse est estimée en calculant le rapport entre la perte de masse entre deux temps d'analyse successifs et l'intervalle de temps correspondant.

C'est en comparant ces vitesses de perte de masse que les différences entre les conditions initiales ressortent, laissant supposer l'existence de différents métabolismes vis-à-vis de la dégradation du glucose.

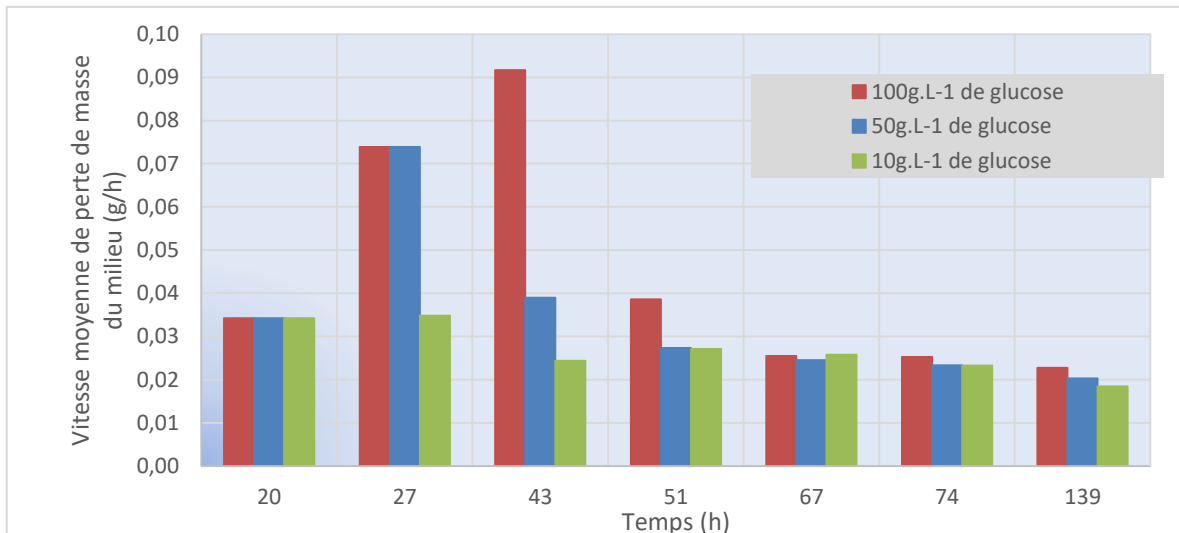


Figure 27 : Représentation graphique de la vitesse de perte de masse du milieu de culture en fonction du temps, suivant différentes concentrations en glucose initiales dans le milieu de croissance (10, 50, 100g/L) pour une culture de la levure en mode discontinu à 28°C durant 139 heures.

Les vitesses de perte de masse sont identiques les vingt premières heures pour les trois conditions. Le métabolisme est donc certainement le même ; en effet à 20 heures de culture, les milieux correspondant aux trois conditions contiennent encore du glucose en quantité suffisante pour déclencher l'effet Crabtree. On a donc certainement la même proportion de respiration et fermentation dans les trois cas.

A partir de 27 heures, les comportements diffèrent. La vitesse décroît légèrement à partir de 43 h et reste à peu près stable ensuite à une valeur assez faible (25 mg/h) pour la condition à 10 g/L ; le milieu est donc épuisé en glucose entre 27 et 43 h.

A 27 heures les vitesses dans les milieux contenant initialement 50 et 100 g/L augmentent fortement par rapport au moment d'analyse précédent, on peut supposer que les levures se sont mieux acclimatées au milieu de culture entre les temps 20 et 27 heures.

Entre 27 et 43 heures de culture l'épuisement progressif en glucose du milieu contenant initialement 50 g/L conduit à une diminution de la vitesse de perte de masse ; par contre pour la concentration de 100 g/L de glucose une augmentation de la vitesse de perte de masse est observée indiquant encore la présence de glucose en quantité significative dans le milieu.

C'est entre 43 et 51 heures de croissance que la vitesse diminue pour la condition à 100 g/L de glucose. Les analyses faites à 67 heures confirment en effet l'épuisement du milieu en glucose dans ce milieu.

On remarque à partir de 67 heures une stabilisation des taux de perte massique aux alentours de 25 mg/h pour les trois conditions.

Plus la concentration en glucose initiale est élevée, plus le taux de perte massique est élevé, allant jusque 92 mg/h pour la concentration maximale de glucose sur la période de 27 à 43 heures. Ces tendances pourraient s'expliquer en considérant la consommation du glucose. Il est probable que plus la concentration de glucose diminue, plus on favorise la respiration au détriment de la fermentation, augmentant ainsi la quantité de CO<sub>2</sub> produite par mole de glucose consommé, mais diminuant beaucoup plus la vitesse de consommation du glucose. Le passage de la fermentation à la respiration devrait donc donner une baisse de perte de masse au cours du temps. Ensuite quand le glucose est épuisé, la perte de masse ralentit encore; la vitesse se stabilise à une valeur constante, correspondant à la production de CO<sub>2</sub> liée à la consommation des produits de fermentation.

La biomasse a été déterminée pour les trois conditions à la fin de la culture (Figure 28).

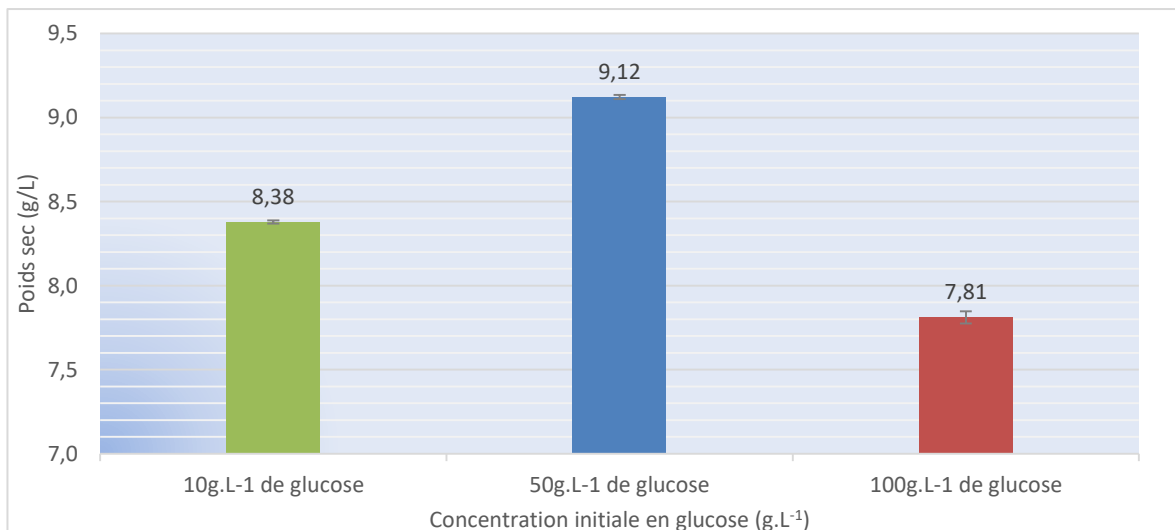


Figure 28 : Représentation de la biomasse totale (en gramme par litre de poids sec) en fonction de différentes concentration en glucose initiales dans le milieu de croissance (10, 50, 100g/L) pour une culture de la levure en mode discontinu à 28°C durant 139 heures.

On trouve des valeurs assez peu différentes (à 15% près), mais il est difficile de les comparer. En effet, les moments où le glucose est épuisé sont très différents. Les levures n'ont donc pas utilisé le même métabolisme en même temps durant l'étude et il aurait fallu comparer

## Résultats et discussion

plutôt les biomasses obtenues au temps d'épuisement du glucose, ramenées au g de glucose consommé. Au-delà de ces temps, la levure consomme les produits de fermentation pour produire de la biomasse, mais à un rendement et une vitesse différents.

A partir du poids sec, de la concentration en glucose initiale et de l'estimation de l'instant où le milieu est épuisé, nous pouvons calculer plusieurs vitesses : la vitesse apparente de consommation du glucose qui est le rapport de la quantité de sucre consommé par le temps correspondant ; la vitesse spécifique de consommation du glucose qui est la vitesse précédente divisée par la quantité de biomasse correspondante (vitesse ramenée à la cellule) ; la vitesse spécifique de croissance qui est la dérivée de la concentration de biomasse en fonction du temps divisée par la concentration de biomasse. On calcule également le rendement global qui est la quantité de biomasse produite divisée par la quantité de glucose consommée. Les résultats sont portés sur le Tableau 2.

On constate que plus la concentration initiale en glucose est élevée, plus la quantité de glucose consommé par heure est élevée, 0,02 ; 0,07 ; 0,11 g/h pour les concentrations initiales en glucose de 10 ; 50 et 100 g/L. Il en va de même pour les vitesses spécifiques de consommation du glucose et les vitesses spécifiques de croissance. Ceci est en adéquation avec les observations de la littérature qui décrivent l'effet Crabtree comme favorisant la voie fermentaire donc entraînant un rendement de conversion en biomasse plus faible et une vitesse de consommation du glucose élevée.

Concentration initiale en glucose (g/L)	Temps de culture lors de l'épuisement du glucose (h)	Vitesse apparente de consommation du glucose (g <sub>glc</sub> /h)	Vitesse spécifique de consommation du glucose (g <sub>glc</sub> /g MS/h)	Rendement (g MS/g glc)	Vitesse spécifique de croissance (/h)
10	Entre 20 et 27	0,021	0,003	0,838	0,0426
50	Entre 27 et 43	0,071	0,008	0,182	0,0286
100	Entre 43 et 51	0,106	0,014	0,078	0,0213

Tableau 2 : Récapitulatif des résultats obtenus suivant différentes concentrations en glucose initiales dans le milieu de croissance (10, 50, 100 g/L) pour une culture de la levure en mode discontinu à 28°C durant 139 heures.

Un point sur les rendements ; ils correspondent à l'effet conjugué de la production de biomasse par consommation du glucose, puis consommation de l'éthanol et du glycérol ; ceci est beaucoup plus marqué pour la culture à 10 g/L où le glucose est épuisé très vite, expliquant une valeur du rendement élevée.

Ces résultats peuvent s'expliquer pour la plus faible concentration en glucose (10 g/L) car le métabolisme respiratoire était dominant mais la culture a épuisé rapidement le glucose, ce qui correspond au phénomène observé entre les points 27 et 43 heures de la Figure 27 où la courbe représentant le taux de fermentation passe de 35 à 24 mg/h.

Pour la concentration moyenne en glucose, la respiration est moindre, mais quand même significative une bonne partie du temps de culture et il y a encore assez de carbone pour une bonne croissance jusque 51 heures de culture. Cependant le rendement est inférieur.

Enfin pour la condition avec la concentration en glucose la plus élevée, le métabolisme fermentaire est certainement dominant à cause de la répression métabolique du glucose sur la respiration, conduisant à un rendement de production de biomasse inférieur malgré une grande quantité de glucose. Cette observation est le principal problème rencontré pour la production de levure à grande échelle, en grande quantité, il faut une quantité de nutriments suffisamment importante pour permettre une croissance continue des levures, mais pas trop élevée afin que le métabolisme respiratoire soit privilégié.

### 2.2.2. Optimisation de la concentration initiale en glucose pour une production de biomasse maximale

Pour compléter les résultats obtenus avec trois concentrations en glucose différentes, laissant supposer que plus la quantité de glucose initial est élevée, plus il y a production de biomasse dans la culture, ceci jusqu'à une concentration limite, mais avec un moins bon rendement, nous avons cherché la concentration en glucose donnant la meilleure productivité, exprimée en g de biomasse produite par g de glucose consommé et par heure.

Pour ces essais, l'inoculum préalablement réhydraté (37°C ; 80 rpm ; 100 min) dans une solution d'eau distillée (2 g/L de phosphate diammonique ; 54,4 g/L de saccharose ; 50 g/L d'éthanol) a ensuite été ajouté à 18 milieux de cultureensemencés à 0,5 g LSA/L à différentes concentrations de glucose et le taux de croissance spécifique des cellules par rapport au glucose a été déterminé.

On représente l'évolution de la productivité mesurée à 40 et 174 h de culture, en fonction de différentes concentrations initiales en glucose (0,5 ; 1 ; 2 ; 4 ; 8 ; 10 ; 15 ; 20 ; 25 grammes de glucose par litre) testées en duplicats, avec pour chaque condition, 0,2 g/L de ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 0,5 g/L d'extrait de levure et 0,2 g/L de sulfate de zinc, à une température de 28°C et une agitation de 200 rpm (Figure 29).

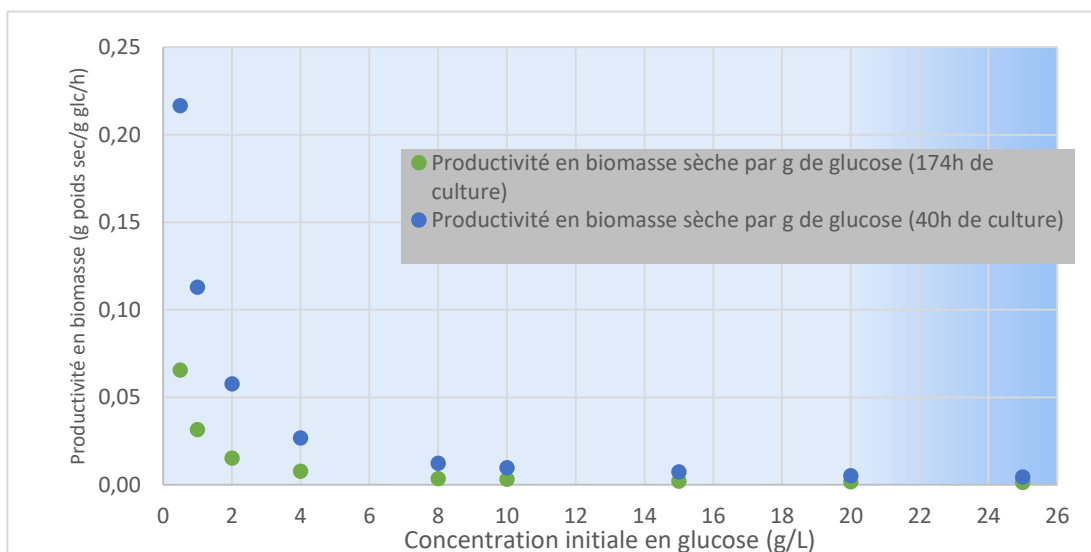


Figure 29 : Représentation graphique de la productivité de la levure en fonction de la concentration initiale en glucose.

## Résultats et discussion

Sur ces courbes, nous pouvons tout d'abord observer l'effet des temps de culture sur la productivité ( $\text{g poids sec/g}_{\text{glc}}/\text{h}$ ) entre les courbes arrêtées à 40 heures (points bleus) et celles arrêtées à 174 heures (points verts). Cette fois encore, nous pouvons remarquer l'effet conjugué de la production de biomasse par la consommation du glucose, puis par la consommation de l'éthanol et du glycérol. Cela entraîne une différence de productivité d'un facteur 3,5 entre les deux temps de mesure, notamment pour les faibles concentrations en glucose dont les différences de productivités sont d'autant plus visibles entre ces deux temps d'analyse.

Pour chaque étude, les concentrations initiales en glucose de 1 g/L et supérieures ont fait fortement chuter la productivité ; à partir de la concentration initiale en glucose de 8 g/L et pour toutes les concentrations supérieures, une productivité très faible est observée ( $0,01 \text{ g poids sec/g}_{\text{glc}}/\text{h}$ ). Dans le but d'obtenir une productivité maximale l'objectif serait donc de ne pas dépasser 8 g/L dans le milieu, avec certainement un optimum aux alentours de 0,5 g/L, mais pour cela il faudrait un apport continu de glucose afin de compenser la consommation des levures au fur et mesure du temps, c'est à dire opérer en mode fed-batch.

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, le glucose est utilisé dans le métabolisme anaérobie pour des concentrations élevées de glucose, par l'intermédiaire de la voie de la fermentation, conséquence de la répression catabolique appelé effet Crabtree. Comme on l'a vu, la fermentation du glucose en éthanol et en dioxyde de carbone produit en effet moins d'ATP (2 molécules) que la respiration du glucose en eau et en dioxyde de carbone (36 molécules). Par conséquent, un mauvais rendement de biomasse est observé pour des concentrations élevées en glucose. Nous pouvons donc affiner les conclusions du paragraphe 2.1.2, et dire que pour la souche utilisée, l'effet Crabtree semble se déclencher très tôt et la fermentation apparaît pour des concentrations d'environ 1 g/L de glucose.

Suite aux croissances réalisées en Erlenmeyer avec les différentes concentrations initiales en glucose de 0,5 ; 1 ; 4 ; 8 et 10 g/L des analyses de la composition C, H, N et S des levures ont été réalisées.

On constate que la composition CHNS des levures varie légèrement en fonction des conditions initiales de concentration en glucose des cultures (Tableau 3). La proportion en oxygène a été calculée par différence.

Pour les croissances avec des concentrations en glucose élevées, en fin de fermentation, les fractions massiques d'azote, d'hydrogène et de carbone sont plus importantes à 10 g/L de glucose qu'à 0,5 ; de ce fait la proportion en oxygène est plus faible. Ces analyses CHNS montrent que plus la concentration en glucose dans le milieu est importante, plus il y a de carbone dans la levure, ce qui est logique, mais également les fractions d'azote et d'hydrogène augmentent. L'oxygène est moins incorporé dans la levure, ce qui est en cohérence avec une proportion de respiration moins importante par rapport à la fermentation.

Concentration initiale en glucose dans le milieu (g/L)	Carbone (%)	Hydrogène (%)	Azote (%)	Sulfure (%)	Oxygène calculé (%)
0,5	42,2	6,3	6,2	0,6	44,7
1	44,9	6,8	5,7	0,6	42,0
4	44,1	6,5	6,6	0,7	42,2
8	44,9	6,8	6,4	0,7	41,2
10	45,9	7,1	7,1	0,7	39,2

Tableau 3 : Composition de la levure par méthode CHNS précision à 0,1 % près.

Pour les croissances avec peu d'agitation, donc une aération moindre, on observe une augmentation de la fraction d'azote au détriment de la fraction en dioxygène plutôt que de la fraction en carbone (résultats non présentés ici).

### 2.2.3. Conclusion de l'effet glucose

Plus la concentration en glucose est élevée, plus la biomasse finale produite sera importante, mais dans une certaine limite, l'apport du glucose en concentration élevée entraînant une répression catabolique, il diminue le rendement de production de la biomasse par rapport à ce substrat.

Les taux de croissance que nous avons observés sont inférieurs à ceux décrits dans la littérature pour des propagations sur un milieu complet (YPD), il semblerait que l'éthanol ait un effet inhibiteur sur la croissance de la levure. De plus, notre levure semble fermenter même en présence d'aération pour des concentrations en glucose supérieures à 1 g/L. Cette baisse de multiplication et de rendement ne serait pas seulement la conséquence de la présence de l'éthanol dans le milieu, mais proviendrait de changements bien plus majeurs au niveau physiologique (Dombek & Ingram, 1987), y compris d'éventuels dommages directs sur les membranes par l'éthanol (Stanley, Bandara, Fraser, Chambers, & Stanley, 2010). La levure met donc en jeu un métabolisme et des voies supplémentaires pour contrer cet effet de l'éthanol, ce qui, dans un premier temps, baisse les rendements observés mais lui permettra, lors de son inoculation future dans un milieu hydro-alcoolique, d'être rapidement efficace et d'avoir une viabilité optimale.

## 2.3. Influence de la concentration en azote

Des essais en fiole Erlenmeyer avec différentes concentrations d'azote minéral obtenues par ajout de phosphate diammonique ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) de 0,2 à 5 g/L ont été réalisés en duplicats, à une température de 28°C et une agitation de 200 rpm, en présence de 78 g/L de glucose, 0,5 g/L d'extrait de levure et 0,2 g/L de sulfate de zinc. Pour ces essais, les fioles ont été directementensemencées à 1 g LSA/L.



## Résultats et discussion

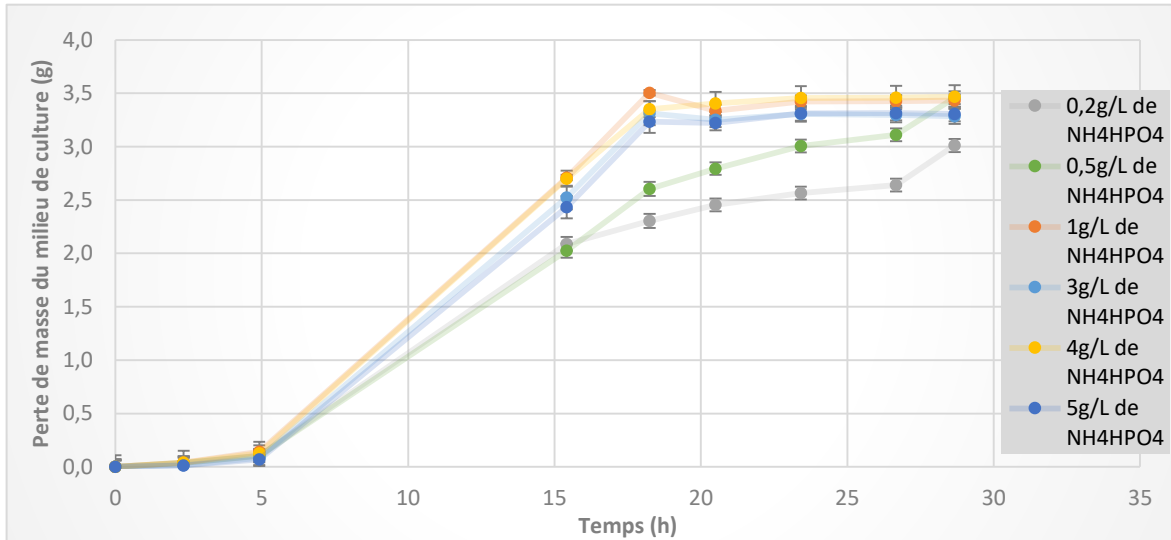


Figure 30 : Représentation graphique de la perte de masse en fonction du temps, suivant différentes concentrations en  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  dans le milieu de croissance pour une culture de la levure en mode discontinu à 28°C sur 30 heures de culture.

L'évolution des courbes de perte de masse (Figure 30) montre un temps de latence similaire d'environ 5 heures pour les 6 conditions de 0,2 à 5 g/L de phosphate diammonique. La phase stationnaire est atteinte à 20 heures pour les cultures avec des concentrations en  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  allant de 1 à 5 g/L, la concentration de 1 g/L est donc un minimum pour une croissance rapide.

*A contrario*, les cultures correspondant aux deux concentrations les plus faibles en  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  de 0,2 et 0,5 g/L, semblent mettre plus de temps à atteindre la phase stationnaire. Les travaux effectués par Morris (1958) confirment que l'ajout d'azote est essentiel pour la production de biomasse et l'azote sous forme d'ion ammonium est plus facilement assimilable (Sanchez Gonzalez, 2008).

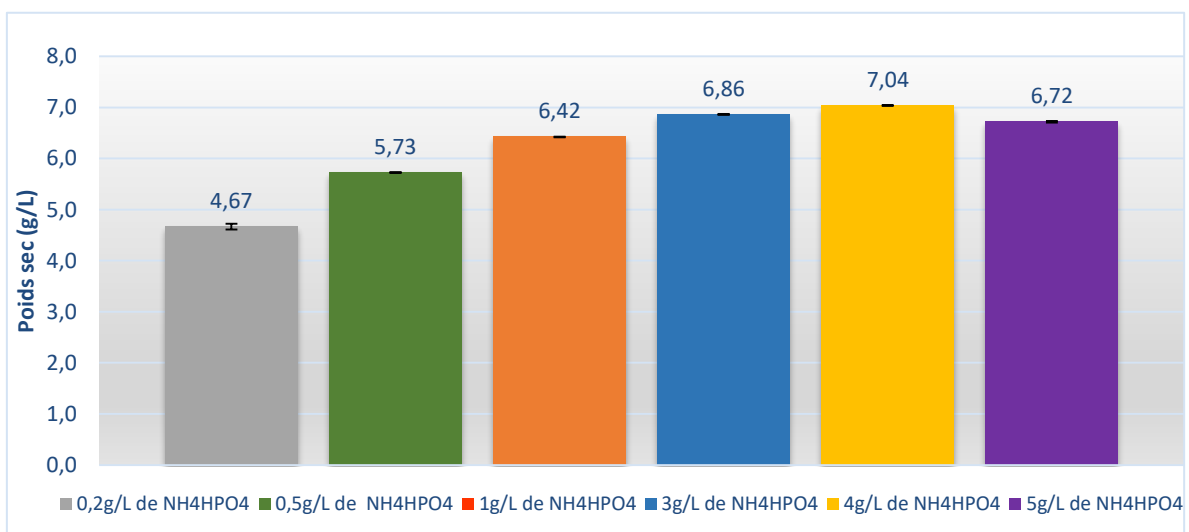


Figure 31 : Représentation de la biomasse totale (en gramme par litre de poids sec) en fonction de la concentration en phosphate diammonique dans le milieu de croissance en mode discontinu à 28°C après 30 heures de culture.

Au vu des poids secs obtenus (Figure 31) avec les différentes concentrations en phosphate diammonique, les résultats de croissance sont similaires à partir de 3 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  avec un poids sec moyen de  $6,87 \pm 0,16$  g/L après les trente heures de culture. Les poids secs sont inférieurs pour les autres conditions, surtout les deux plus faibles concentrations, où la croissance n'est pas terminée à 30 h.

L'apport d'une quantité plus élevée de phosphate diammonique ne semble pas indispensable car même avec la plus faible concentration (0,2 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ), tout le glucose est consommé, ce qui montre bien que l'azote n'est pas limitant. Toutefois la consommation de glucose semble plus rapide et la production de levure plus importante, ce phénomène étant déjà décrit dans la littérature (Bely, Salmon, & Barre, 1994; Julien, Théodore, Specht, Dumont, & Brung, 2014, pp. 6–7).

La consommation de glucose plus rapide a certainement entraîné une perte de masse plus importante pour les concentrations élevées en phosphate diammonique (Figure 30), dès l'épuisement du glucose, une croissance s'est faite par la consommation des produits de fermentation (glycérol et éthanol principalement ainsi que acétate et acétaldéhyde en concentration plus faible). La biomasse mesurée résulte des croissances sur les différents substrats, la quantité de biomasse produite à partir du glucose est identique dans tous les essais (concentration initiale en glucose identique), les différences observées sur les poids secs sont donc liées à la croissance sur éthanol et glycérol qui intervient d'autant plus tôt que la consommation du glucose est rapide donc pour les plus fortes concentrations en phosphate diammonique.

## 2.4. Influence de la nature de la source carbonée

Nous avons réalisé des essais comparatifs en présence de glucose ou de saccharose afin de choisir le sucre à ajouter dans nos futures cultures. Le saccharose est en effet utilisé plus généralement dans le milieu vinicole. C'est un diholoside, il est hydrolysé par une invertase externe (réprimée par le glucose) qui conduit donc à la formation d'une molécule de glucose métabolisée préférentiellement et d'une molécule de fructose qui sera convertie en glucose par une isomérase ou incorporé sous forme de fructose-6-P et entrera dans la glycolyse.

Cette étude en fiole Erlenmeyer a été réalisée à partir de quatre répliqués, avec pour chaque condition : 0,2 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 0,5 g/L d'extrait de levure et 0,2 g/L de sulfate de zinc, à une température de 28°C et une agitation de 200 rpm, des prélèvements ont été faits à 18, 42, 60, 90 et 114 heures de culture. Dans chaque fiole les concentrations initiales étaient de 10 g/L de glucose ou de saccharose donnant respectivement 55,6 et 29,2 mmol/L, donc environ la même quantité de molécules de glucose au final. La Figure 32 représente la variation de la concentration des levures en fonction du temps. Les fioles ont été directementensemencées à 1 g LSA/L.

## Résultats et discussion

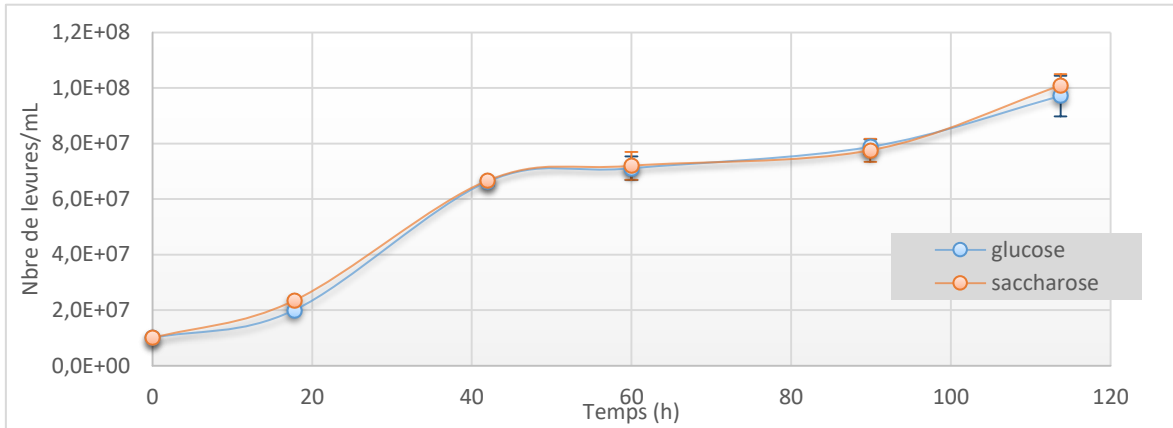




Figure 32 : Evolution du nombre de cellules par millilitre au cours du temps, la courbe avec le symbole  représente l'évolution du nombre de cellules ayant poussées avec le saccharose comme substrat carboné et  représente l'évolution du nombre de cellules ayant poussées avec le glucose, pour une culture de la levure en mode discontinu à 28°C durant 120 heures.

Ces courbes sont similaires pour les deux substrats de culture laissant supposer une rapide adaptation métabolique au saccharose comme au glucose ; la levure possède certainement dès sa réhydratation un pool d'enzymes lui ayant servi à cataboliser ces substrats jusqu'à 40 heures de culture. Puis entre 50 et 90 heures environ on peut observer une phase stationnaire ; cette phase a peut-être démarré plus tôt, à 30-35 heures de culture mais nous n'avons pas de points pour le confirmer. Pour ce qui est de la fin de cette phase, le point à 90 heures semble traduire une nouvelle augmentation de la population mais de la même façon avec les incertitudes de mesure, cette phase a pu se poursuivre quelques heures après 90 heures.

Ces deux courbes mettent en évidence le phénomène de diauxie bien décrit dans la littérature qui se traduit par une seconde phase de stabilité apparente, assez longue sur cette étude, durant laquelle la machinerie de la levure se réorganise afin de pouvoir utiliser un nouveau substrat, l'éthanol ou le glycérol, ce qui est confirmé par les analyses de ces composants (Figure 33).

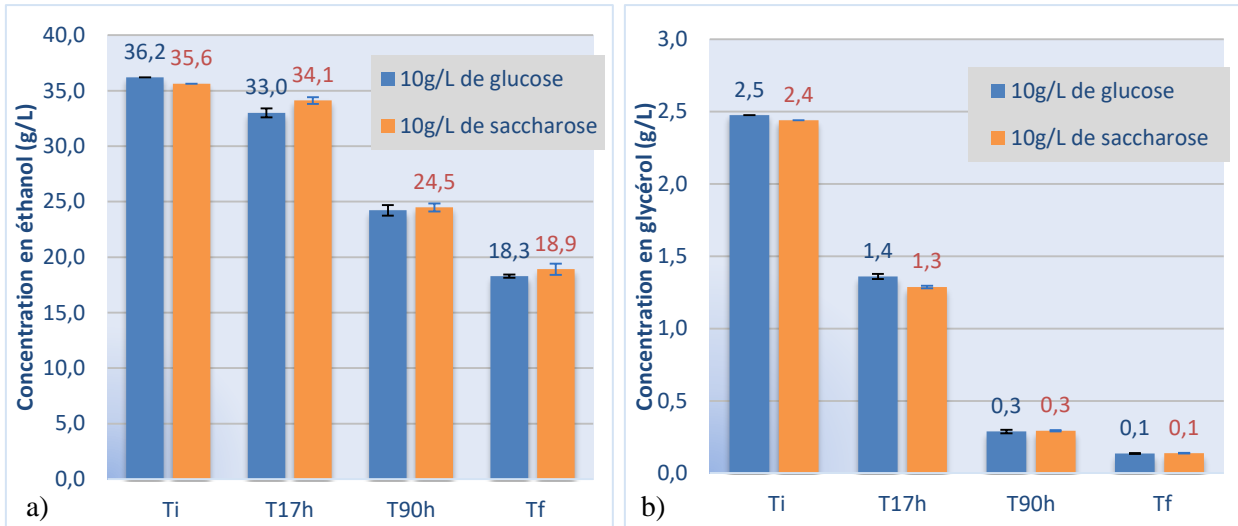


Figure 33 : Représentation graphique des concentrations dans le milieu de culture en fonction du temps a) en éthanol, b) en glycérol, suivant les deux conditions de concentrations en glucose ou saccharose initiales (10 g/L) pour une culture de la levure en mode discontinu à 28°C durant 120 heures.

On observe en effet une diminution franche des produits de fermentation, à partir de 90 heures de culture pour l'éthanol et dès 17 heures pour le glycérol. On peut émettre l'hypothèse que les levures ont commencé à stocker le glycérol dès l'épuisement du glucose dans le milieu pendant qu'elles produisaient leurs enzymes (glycérol kinase et glycérol 3-phosphate déshydrogénase) servant au catabolisme du glycérol ; ceci entraînerait une diminution de sa concentration au moment supposé de l'épuisement du glucose ; les cellules ont ensuite métabolisé les stocks de glycérol à partir de 90 heures entraînant une nouvelle phase de croissance.

Au vu de ces résultats nous avons donc décidé de n'utiliser que le glucose comme source de carbone pour les essais de développement de la levure en bioréacteur afin de simplifier les possibilités d'utilisation des sources carbonées utilisées.

## 2.5. Effet du pH

Les études étant réalisées dans le but de préparer un levain qui sera incorporé dans des cuves contenant du vin, la croissance est réalisée dans un milieu de culture à un pH similaire à celui du vin ; ce pH n'est certes pas optimal pour la croissance de la levure mais il permet d'acclimater cette dernière aux conditions difficiles du vin et d'éviter une mortalité trop élevée par la suite lors de la mise en contact. Les essais ont été réalisés en triplicats, avec pour chaque condition, 130 g/L de glucose, 0,2 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 0,5 g/L d'extrait de levure et 0,2 g/L de sulfate de zinc, à une température de 28°C et une agitation de 200 rpm. Les résultats représentés ci-dessous (Figure 34 et Figure 35) montrent la perte de masse du milieu de culture en fonction du temps ainsi que le poids sec en fin d'expérience après épuisement du glucose dans le milieu de culture. L'inoculation est de 0,5 g LSA/L.

## Résultats et discussion

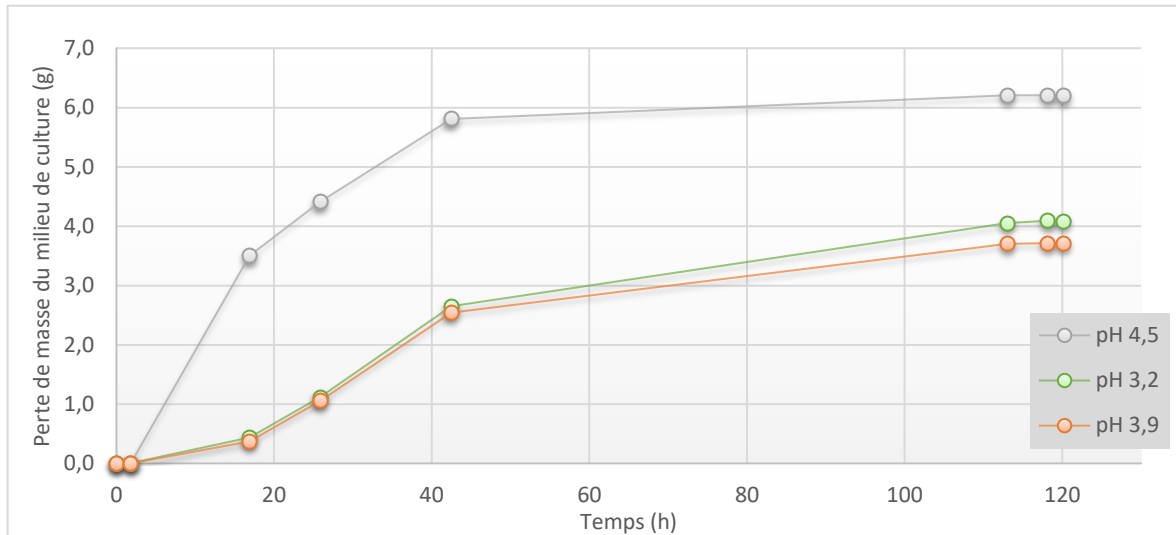


Figure 34 : Représentation graphique de la perte de masse en fonction du temps, suivant différentes conditions de pH du milieu de croissance pour une culture de la levure en mode discontinu à 28°C durant 120 heures de culture.

Sur les courbes de la Figure 34, les deux conditions dont le pH est en dessous de 4 (pH 3,2 et 3,9) montrent une réelle baisse de la perte de masse par rapport à la condition à pH 4,5. Les temps de latence notamment sont différents, 17h pour les plus faibles pH contre beaucoup moins pour pH 4,5. Les temps d'activité biologique semblent assez proches, la partie horizontale correspondant à l'épuisement du glucose démarrait pour les deux cultures entre 45 et 60 heures.

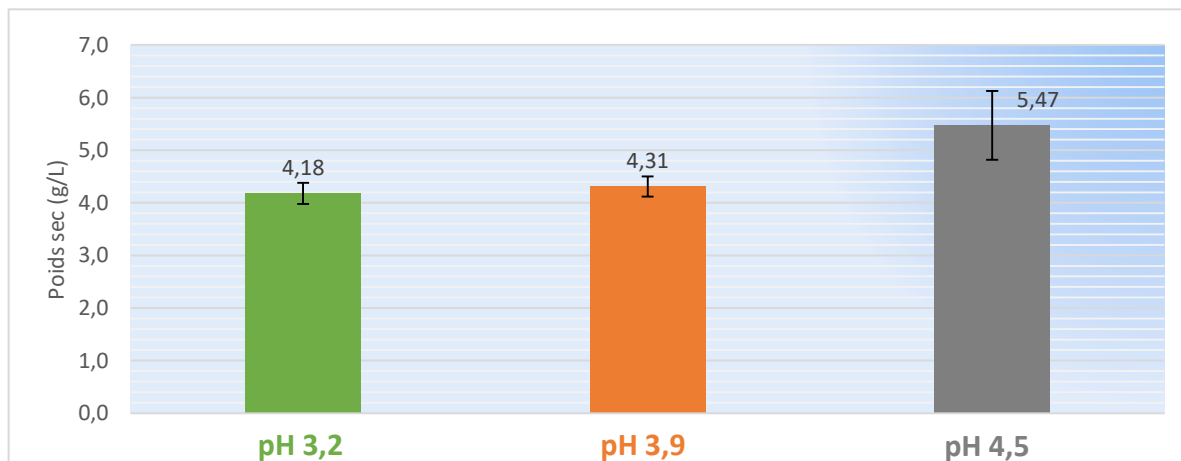


Figure 35 : Représentation de la biomasse totale (en gramme par litre de poids sec) en fonction du pH du milieu de croissance pour une culture de la levure en mode discontinu à 28°C après 120 heures de culture.

La Figure 35 montre les quantités de biomasse produites après 120 heures de cultures. Les cultures dont le pH initial était de 3,2 et 3,9 ont donné des concentrations similaires, respectivement 4,18 et 4,31 g/L. La culture au pH le plus élevé (pH à 4,5) a donné une concentration environ 25% supérieure, soit 5,47 g/L. La viabilité de la levure en fin d'expérience aux pH 3,2 ; 3,9 et 4,5 était respectivement de 79%, 81% et 87%.

Lors de ces essais, la productivité était très faible même pour un épuisement supposé du glucose à 45 heures : 0,0007 gramme de poids sec par gramme de glucose consommé et par heure

pour les conditions à pH 3,2 et 3,9 et 0,0009 pour la condition à pH 4,5 ; la concentration initiale en glucose très élevée a certainement grandement participé à la diminution du rendement.

Nous avons mesuré les concentrations d'éthanol et de glycérol à la fin de la culture et les avons comparées avec celles du milieu d'origine (non inoculé) ; les résultats sont présentés sur la Figure 36.

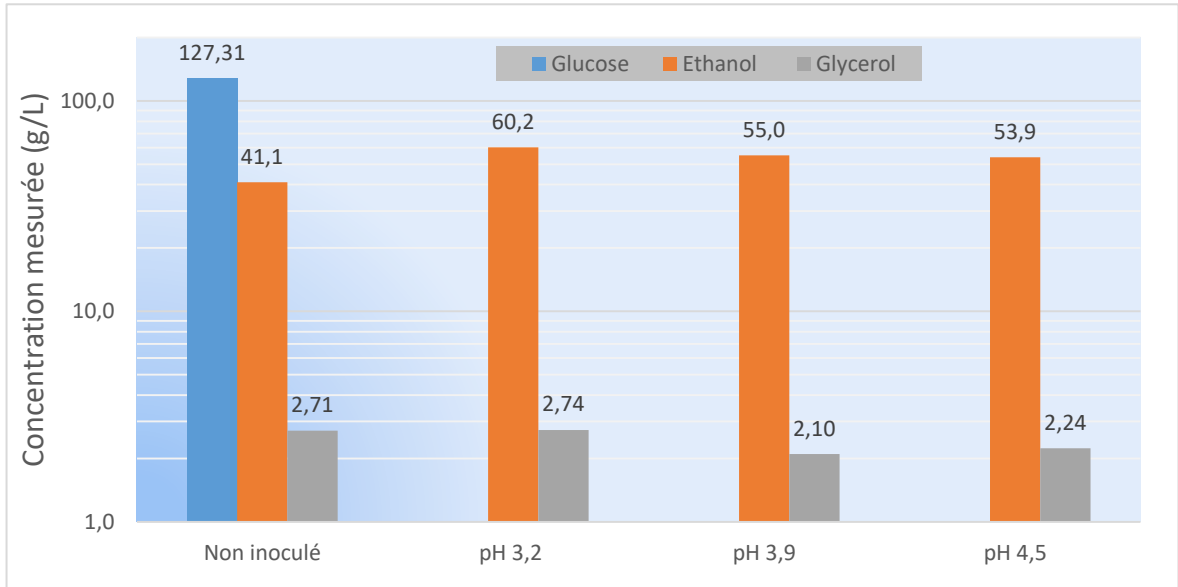


Figure 36 : Concentration des produits de fermentation, suivant différentes conditions de pH du milieu de croissance pour une culture de la levure en mode discontinu à 28°C après 120 heures de culture.

Le glycérol semble légèrement consommé en fin d'expérience en accord avec les résultats de fermentations que nous exposerons plus tard, notamment en bioréacteur. La concentration d'éthanol augmente assez peu, moins de 20 g/L, il s'agit de l'effet conjugué de sa production (importante car la concentration de glucose est élevée) et de sa consommation après l'épuisement du glucose, donc sur une longue période entre 45 h environ et 120 h.

Il ressort donc un effet du pH sur la croissance de levure très marqué. Nous avons choisi un compromis de pH à 4,5 afin d'obtenir une bonne activité biologique et une bonne production de biomasse, et en même temps acclimater la levure à un pH proche de celui du vin.

## 2.6. Essai de fermentation avec les levures produites par le procédé

A la suite de la croissance avec le procédé développé, les levures ont été mises en culture à une température de 30°C sans agitation afin de vérifier leur viabilité et aptitude à réaliser la fermentation dans un milieu hydro-alcoolique contenant une concentration initiale de 52 g/L de glucose.

## Résultats et discussion

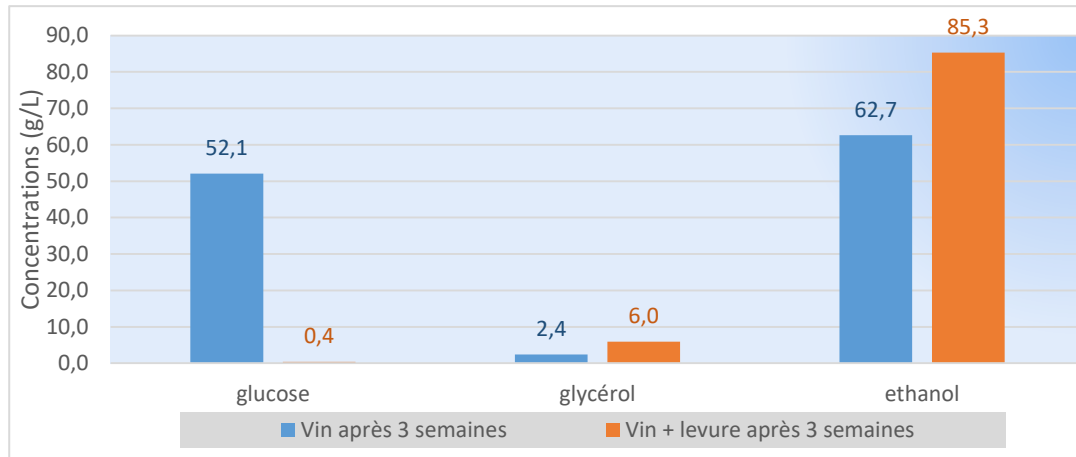


Figure 37 : Concentration des produits de fermentation lors de l'inoculation et après trois semaines de culture en vase clos, à 30°C, de la levure issue du procédé développé en mode Fed-batch.

Après une croissance de trois semaines en bouteilles Schott pas totalement fermées pour des risques de surpression, les concentrations en produits de fermentations ont augmenté en présence des levures, comparées aux concentrations du vin témoin ayant servi de milieu de culture (Figure 37).

La quasi-totalité du glucose a été consommée, ce qui était attendu compte tenu du temps de culture, le 0,4 g/L résiduel doit certainement provenir d'une contamination de l'échantillon passé en CLHP, mais ayant réalisé cette étude sans duplicats nous ne pouvons pas l'affirmer. Une production de glycérol et d'éthanol a eu lieu. Ceci montre donc une parfaite aptitude de la levure à réaliser la fermentation à la suite du procédé développé durant ce projet de recherche.

### 2.7. Conclusion de la partie fioles Erlenmeyer

Dans cette partie regroupant les études de différents paramètres physico-chimiques en Erlenmeyer, nous avons tout d'abord montré que le temps de la réhydratation de la levure sèche active ne semblait pas si important que décrit dans la littérature, mais c'est peut-être dû aux contraintes engendrées par un milieu hydro-alcoolique. De manière générale, lors de ces études en fioles, les différences observées sur les poids secs sont liées à la croissance en utilisant l'éthanol et le glycérol comme substrats. Pour notre souche Fizz+, les concentrations en glucose supérieures à 1 g/L semblent entraîner la répression du métabolisme respiratoire même lors de l'agitation importante des fioles censée apporter suffisamment d'oxygène, ce qui conduit à une diminution du rendement de bioconversion en biomasse. Pour ce qui est de la concentration en azote assimilable, en plus de l'extrait de levure qui apporte de l'azote, nous avons estimé la concentration en phosphate diammonique optimale à 3 g/L, bien que des apports moindres (0,2 g/L de phosphate diammonique) permettent de terminer la fermentation (consommer tout le glucose disponible). Toutefois la consommation de glucose semble plus rapide et la production de levure plus importante, ce phénomène étant déjà décrit dans la littérature (Bely *et al.*, 1994; Julien *et al.*, 2014, pp. 6–7). On peut supposer que la quantité de phosphate diammonique a une influence, non pas sur la croissance à partir de glucose mais sur la deuxième partie de la culture où les produits de fermentation sont consommés.

Peu de différences sont observées entre un milieu dont le pH est de 3,2 ou 3,9 d'après notre étude et comme le décrivent Charoenchai *et al.* (1998) ; toutefois le compromis de pH 4,5

entre la valeur optimale pour la croissance de la levure ( $\text{pH} > 5$ ) et son acclimatation au milieu vin ( $\text{pH} 3$ ) semble apporter de bons résultats (Media & Culture, 1982; Russell, 2003).

### 3. Etude en bioréacteur batch

Dans la partie précédente, nous avons cherché à identifier et optimiser les paramètres du milieu influençant la croissance de la levure afin d'obtenir un développement maximal par la suite, lors de la mise en culture pour une seconde fermentation.

Cette deuxième partie vise maintenant à présenter les suivis des propagations de *Saccharomyces cerevisiae* pure qui ont été menées en bioréacteur batch de cinq litres, pour déterminer les conditions optimales dans lesquelles seront réalisées les propagations industrielles, notamment concernant l'aération et l'agitation.

Dans un premier temps, nous avons mis en œuvre les bioréacteurs dans des conditions de propagation proches de celles utilisées en cave ; ceci permettra de comparer nos avancées avec les résultats actuels de certains producteurs de champagne ayant accepté de nous les communiquer. Ceux-ci ont déjà bien développé de façon empirique la première étape de propagation de la levure dans des bioréacteurs de 16 hectolitres vendus par la société Ceno Concept ; la deuxième étape consiste, à partir de ces cultures, à ensemer en cascade différentes cuves de plusieurs milliers d'hectolitres dont les productions seront ensuite mises en bouteilles.

Toutefois, les cultures réalisées en cave n'étant pas totalement optimisées, certaines concentrations en nutriments et débits d'aération utilisés n'ont pas été reproduits dans nos études car nous pouvions prévoir au vu de la littérature que les résultats ne seraient pas concluants.

Ces études en bioréacteur ont donc permis d'obtenir de nombreux jeux de données concernant les cinétiques de croissance de la levure, qui serviront pour la détermination des conditions optimales et seront comparées avec les résultats des propagations réalisées actuellement en cave.

La comparaison des divers types d'aération et d'agitation et de leur influence sur la propagation de la levure est décrite dans ce chapitre. Nous concluons en résumant les conditions optimales qui ont été trouvées pour le mode batch et qui seront utilisées dans les essais ultérieurs en mode Fed batch.

Afin de ne pas trop s'éloigner des conditions d'utilisation des bioréacteurs (16 hL) que la société Ceno Concept préconisait d'utiliser en cave, nous nous sommes basés sur la même vitesse du fluide en bout de pale en considérant en première approximation que l'agitation serait similaire. Nous ne détaillerons pas plus car nous nous sommes basés sur les conditions fournies par les partenaires de l'entreprise.

La température des différentes cultures a été maintenue constante à 28°C grâce à une double enveloppe permettant de faire circuler un liquide à la température nécessaire pour tenir cette consigne.



### 3.1. Corrélations entre poids sec, absorbance et concentration cellulaire

Lors des essais batch nous avons réalisé trois types de mesure de biomasse: la concentration de poids sec (g/L), l'absorbance à 600 nm de la suspension et la concentration cellulaire (cell/L).

Les résultats permettent d'établir des corrélations de poids sec et concentration cellulaire en fonction de l'absorbance ( $Abs_{600}$ ). Cela a été fait pour tous les essais et les corrélations sont bonnes comme le montrent à titre d'exemple les Figure 38 et Figure 39, établies pour deux modes d'aération et d'agitation différents. Les autres résultats sont présentés dans le Tableau 4 en fin de paragraphe.

Les corrélations de la concentration cellulaire en fonction de l'absorbance sont semblables pour les deux essais et donnent des droites qui passent par l'origine, ce qui montre que l'absorbance peut être utilisée comme mesure de la concentration de biomasse. Par contre les corrélations poids sec en fonction de l'absorbance, semblables elles aussi pour les deux essais, donnent des fonctions affines avec une ordonnée à l'origine proche de 1 g/L. Ceci peut être attribué à une interférence liée au glucose présent en forte concentration dans les premiers prélèvements et qui se retrouve dans la mesure du poids sec malgré le double lavage de l'échantillon. La mesure de poids sec est donc relativement imprécise durant les premiers instants de culture, lorsque la concentration en glucose dans le milieu est encore élevée. Toutefois, pour ces points on peut affirmer que la concentration de poids sec est faible, compte tenu des valeurs d'absorbance proches de l'absorbance initiale. Le poids sec mesuré après les premiers instants de culture représente donc bien la concentration de biomasse produite.

Pour la condition d'aération minimale, à savoir un simple balayage de la tête de cuve à un débit correspondant à 0,2 VVM et une agitation de 500 rpm, les corrélations sont représentées sur la Figure 38.

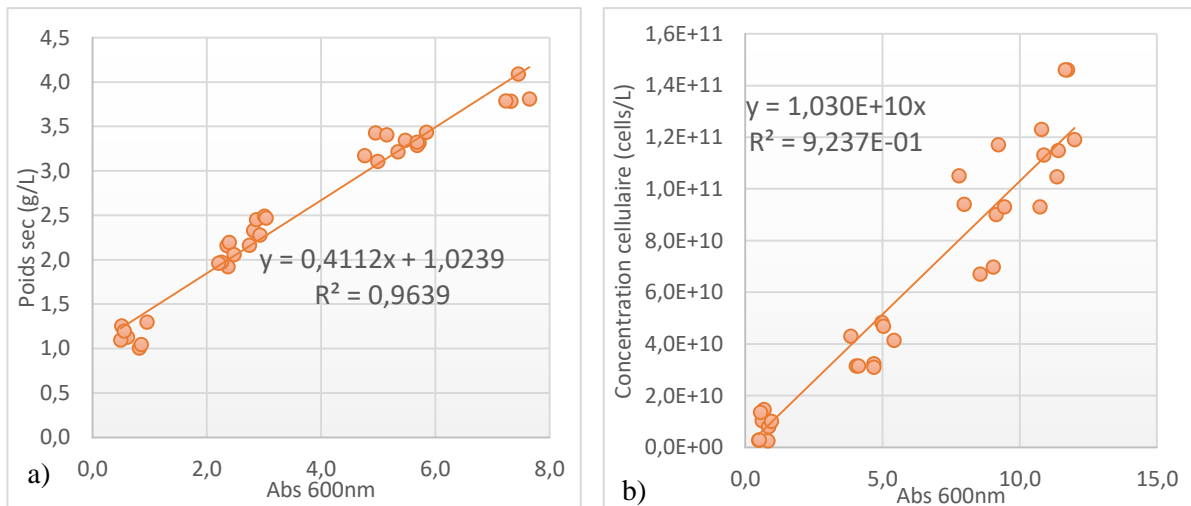


Figure 38 : Corrélation entre (a) l'Absorbance à 600nm et le poids sec ; entre (b) l'Absorbance à 600nm et la concentration cellulaire en condition aérée à 0,2VVM par balayage de la tête de cuve.

Pour une aération par micro diffusion (fritté) à un débit correspondant à 0,02 VVm et sous une agitation de 295 rpm, les corrélations sont présentées sur la Figure 39.

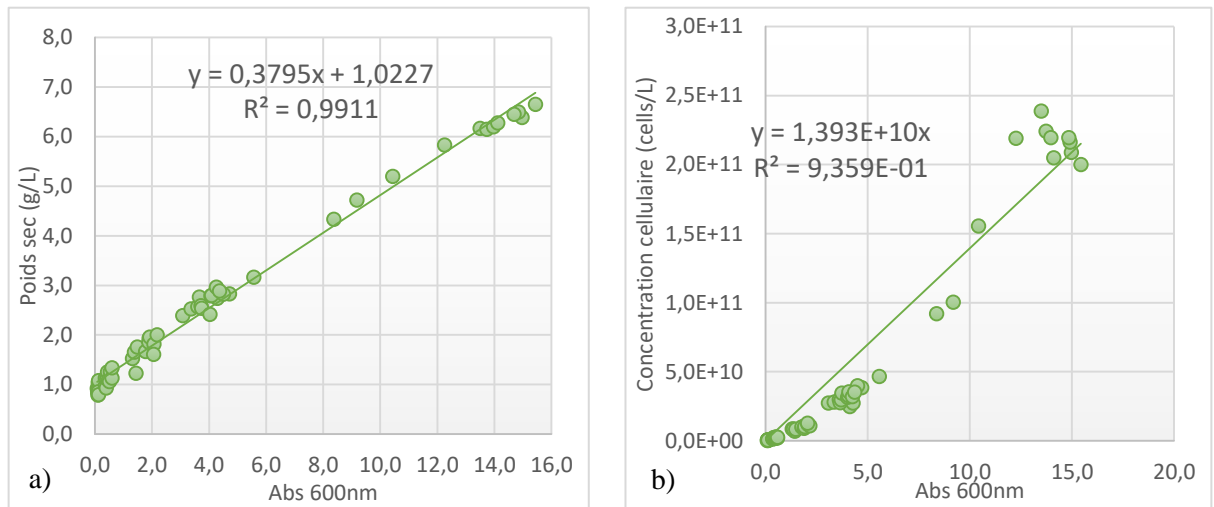


Figure 39 : Corrélation entre (a) l’Absorbance à 600nm et le poids sec ; entre (b) l’Absorbance à 600nm et la concentration cellulaire en condition aérée à 0,02VMM par micro diffuseur sous une agitation de 295 rpm à une concentration en phosphate diammonique de 3,2g/L.

Le poids d’une cellule est calculé par le rapport de la pente de la courbe du poids sec en fonction de l’absorbance à 600 nm sur celle de la courbe de la concentration cellulaire en fonction de l’absorbance à 600 nm (Figure 39), on obtient les résultats suivants :

	Concentrations initiales en glucose / éthanol (g/L)	Corrélations poids sec (g/L) vs abs	Corrélations concentrations cellulaires (cell/L) vs abs	Poids d’une cellule (pg)
<b>Balayage 0,2VVm</b>	78,7 / 44,8	= 0,41 Abs + 1,02	= 1,03 10 <sup>10</sup> Abs	40,2
<b>Diffuseur anneau 0,1VVm</b>	78,0 / 40,7	= 0,38 Abs + 1,00	= 3,61 10 <sup>10</sup> Abs	10,5
<b>Micro diffuseur 0,1VVm</b>	71,5 / 38,6	= 0,37 Abs + 1,00	= 9,25 10 <sup>9</sup> Abs	41,0
<b>Micro diffuseur 0,05VVm</b>	77,4 / 44,1	= 0,36 Abs + 1,00	= 8,28 10 <sup>9</sup> Abs	43,5
<b>Micro diffuseur 0,02VVm</b>	75,1 / 42,9	= 0,38 Abs + 1,02	= 1,39 10 <sup>10</sup> Abs	27,0
<b>Micro diffuseur 0,01VVm</b>	74,0 / 39,3	= 0,37 Abs + 0,82	= 4,75 10 <sup>10</sup> Abs	7,8
<b>Micro diffuseur 0,1VVm</b>	20,1 / 44,6	= 0,39 Abs + 0,53	= 1,52 10 <sup>10</sup> Abs	25,5

Tableau 4 : Récapitulatif des corrélations lors des différentes conditions de cultures, entre les différentes mesures et masses d’une cellule.

Les corrélations étant bonnes malgré les conditions très différentes nous pouvons conclure que l'absorbance donne une mesure simple et rapide du poids sec durant nos essais, malgré notre milieu fortement coloré. Au niveau de la concentration cellulaire les résultats sont aussi cohérents sauf pour deux essais (diffuseur annulaire 0,1 VVm et micro diffuseur 0,01 VVm) où la pente de la corrélation est beaucoup plus importante.

Il faut noter que les mesures de poids sec et d'absorbance comptabilisent les cellules vivantes et les cellules mortes, ce qui n'est pas le cas pour le comptage cellulaire. Les corrélations différentes citées précédemment peuvent peut-être s'expliquer par le fait que la proportion de cellules vivantes y serait plus importante car ces cultures ont été arrêtées plus tôt que les autres.

Les valeurs de poids cellulaire sont assez dispersées. Cette dispersion résulte de plusieurs approximations et erreurs : hypothèse que toutes les cellules ont le même poids, prise en compte des cellules mortes dans le poids sec et imprécisions des mesures. L'erreur sur le poids cellulaire est estimée à 20%. Toutefois les valeurs ont le même ordre de grandeur.

### **3.2. Détermination de la distribution des temps de séjour**

Cette étude préliminaire visant à caractériser la distribution des temps de séjour a été réalisée pour modéliser le type d'écoulement du bioréacteur, afin de connaître le temps de séjour d'un élément dans le réacteur en mode continu. Il permet de fournir des informations sur le temps de séjour, la qualité du mélange et la présence de zones stagnantes (Cassagnau, Mijangos, & Michel, 1991). Nous avons adopté un modèle parfaitement agité et vérifié sa validité par des essais en présence de traceur.

Le principal objectif de cet essai réside dans la comparaison du comportement hydrodynamique de ce bioréacteur par rapport à un réacteur idéal continu parfaitement agité. Durant cet essai, une méthode de suivi par conductivité a été utilisée, en utilisant le chlorure de sodium comme traceur. Le traceur est un élément qui doit être inerte, de concentration facilement mesurable et qui ne doit pas changer les propriétés du fluide.

Pour chaque essai, il s'agit de partir d'une conductivité stable élevée et connue dans le bioréacteur (cuve pleine d'une solution de NaCl), puis d'injecter en continu grâce à une pompe péristaltique à double tête, de l'eau distillée à partir du temps zéro et de suivre l'évolution de la conductivité du liquide à la sortie du réacteur (Figure 40).

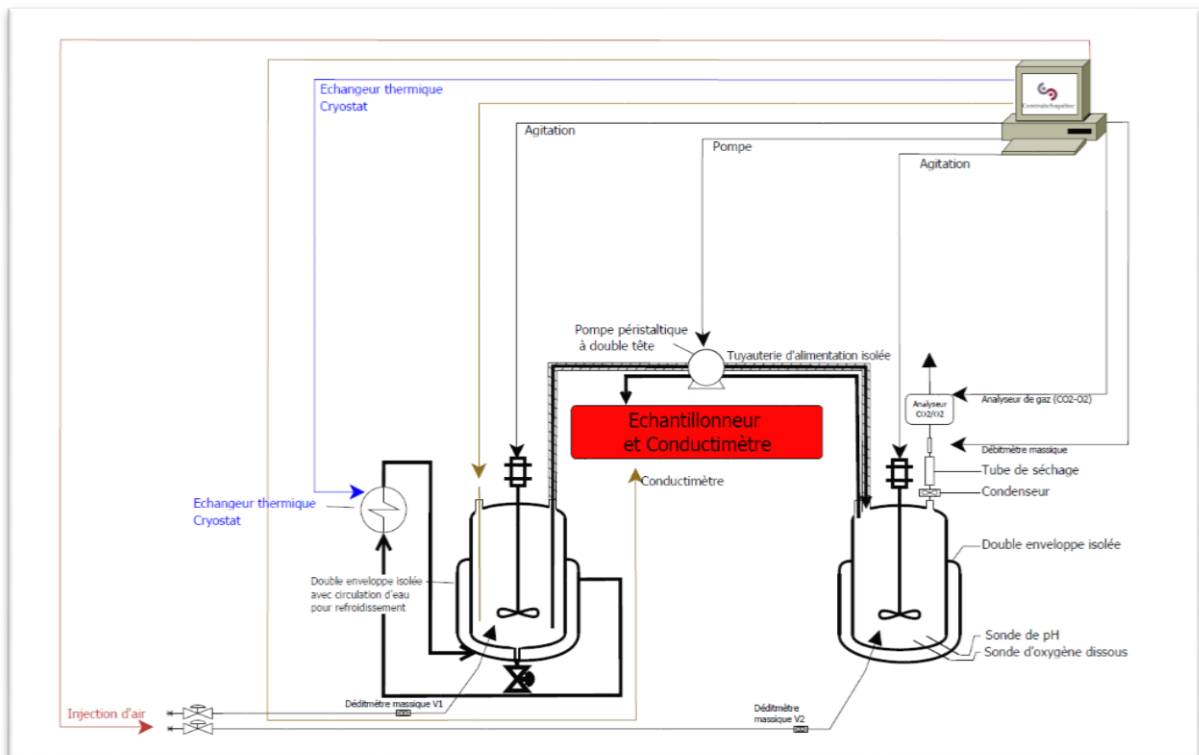


Figure 40 : Schéma du dispositif pour le suivi de la conductivité du milieu afin de déterminer le temps de séjour.

Le milieu en sortie passe ainsi d'une conductivité élevée, correspondant à la concentration initiale du traceur, à une conductivité plus réduite, qui diminue au fur et à mesure de l'ajout d'eau distillée. Ce suivi de la conductivité en sortie est effectué grâce à un échantillonneur qui prélève des fractions de 10 mL, puis la conductivité est mesurée par un conductimètre (Consort C 3010) et une sonde de conductivité (Fisher Bioblock Scientific).

La concentration du traceur à la sortie du réacteur est normalisée par rapport à sa concentration initiale en vue de déterminer l'évolution d'une fonction adimensionnelle notée «  $F_t$  », caractérisant la distribution des temps de séjour et définie par la relation suivante :

$$F_t = \frac{c}{c_0},$$

où  $C_0$  et  $C$  représentent respectivement la concentration initiale et de sortie du traceur (dépendant du temps). Ici, nous suivons la conductivité qui est proportionnelle à la concentration, donc la fonction  $F_t$  sera le rapport des conductivités.

Sachant que dans le cas d'un réacteur parfaitement agité et en réponse à une injection d'eau, cette fonction «  $F_t$  » est définie par l'expression suivante :

$$F_t = \exp\left(\frac{-t}{\tau}\right),$$

où  $\tau$  représente le temps de résidence moyen, défini comme le rapport entre le volume utile du bioréacteur et le débit d'alimentation.

Le temps de séjour expérimental est déterminé en traçant la courbe du logarithme népérien de la fonction «  $F_t$  » en fonction du temps (Figure 41). Le fait qu'on obtienne une droite

montre que le modèle parfaitement agité est valide. L'inverse de la pente de la droite obtenue correspond au temps de séjour moyen.

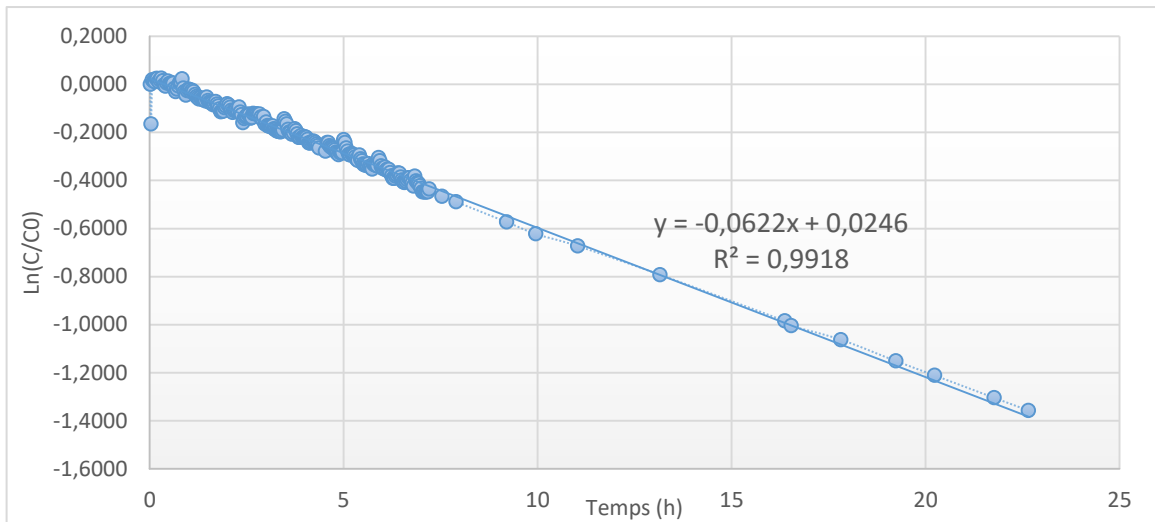


Figure 41 : Représentation graphique du suivi de la conductivité (n=228 points de mesure) réalisé à l'aide d'un conductimètre.

De ces résultats, il est possible de calculer le temps de séjour moyen expérimental, égal ici à 16,1 heures. Le temps de séjour théorique du réacteur est égal à 15,1 heures (rapport entre son volume 5 litres et le débit d'alimentation utilisé durant cette étude, égal à 0,33 L/h). Ces deux temps de séjour sont égaux à 6% près. On peut donc valider le caractère parfaitement agité du bioréacteur utilisé durant les fermentations.

### 3.3. Influence de l'aération sur l'oxygénation du milieu

Pour produire des grandes quantités de micro-organismes ayant un métabolisme aérobique ou aérobique facultatif, différents dispositifs d'aération sont utilisés. Dans cette étude l'aération a été faite soit par un diffuseur d'air annulaire (spargeur), soit par un micro diffuseur (fritté) avec des micropores (10 $\mu$ m), soit par un simple balayage de la tête de cuve avec de l'air tout au long de la culture.

Afin de déterminer l'effet de l'oxygénation sur le métabolisme de *S. cerevisiae*, des essais batch ont été menés sur un milieu hydro-alcoolique à différents débits d'air et systèmes d'aération. Les caractéristiques cinétiques et biochimiques de la croissance de *S. cerevisiae* dans les différentes conditions d'aération sont donc décrites dans cette partie, les résultats présentés étant les moyennes de duplicats, excepté pour les essais avec micro aération à 0,02 et 0,05 VVm pour lesquels une seule culture a été réalisée. VVm correspond à un débit exprimé en volume de gaz par unité de volume de liquide et par minute (Bioengineering, 2016).

Le protocole consistait donc à faire buller ou non de l'air dans le milieu à différents débits de 0 à 500 mL/min (0 à 0,1 VVm, le volume de culture étant 5 L). L'évolution de la concentration en oxygène dissous (exprimée en pourcentage par rapport à la saturation avec l'air) pour ces cultures de *S. cerevisiae* est présentée sur la Figure 42 ainsi que pour un milieu témoin ne contenant pas de levures.

Sauf précision contraire, la concentration de glucose initiale est de l'ordre de 80 g/L, celle de phosphate diammonique de 0,2 g/L et celle d'inoculation de 0,5 g/L de LSA. Le détail est donné dans le chapitre matériel et méthodes.

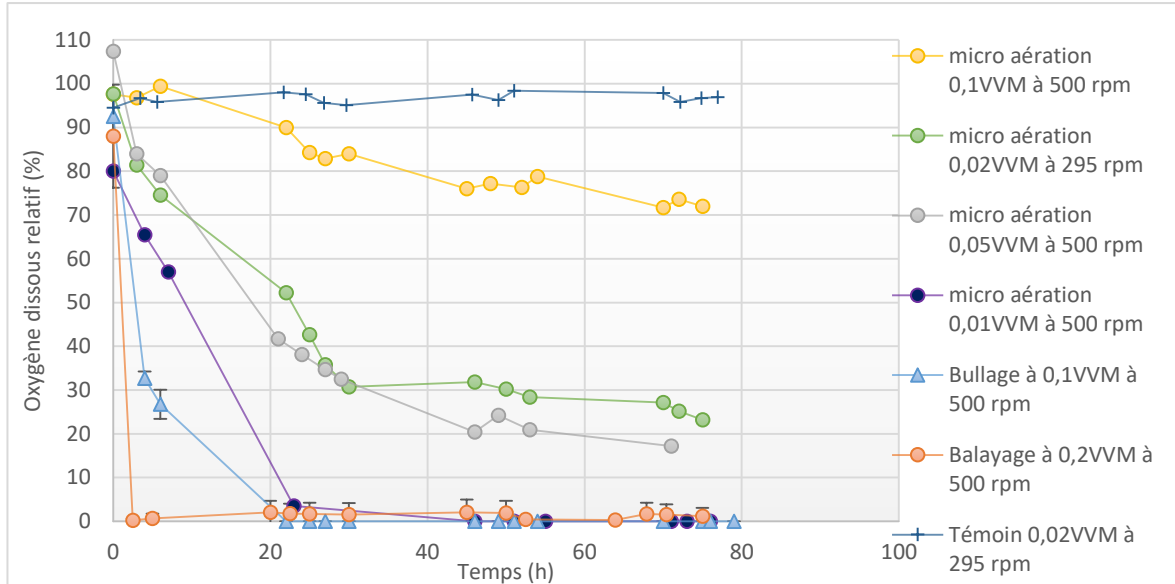


Figure 42 : Evolution de la concentration d'oxygène dissous au cours du temps lors des développements de levure sur milieu hydro-alcoolique en fonction des différents débits d'aération du milieu de culture. Les cultures nommées micro aération, sont réalisées avec un micro diffuseur et celles nommées bullage avec un diffuseur d'air annulaire. Le balayage est quant à lui réalisé par simple envoi d'air à travers une entrée sur le haut de la cuve, au-dessus du liquide.

La calibration initiale de la sonde à 100% d'oxygène dissous a toujours été faite sur le milieu bien aéré, donc saturé, avant inoculation. Sur la Figure 42 on peut toutefois remarquer une différence au niveau des points initiaux qui varient entre 88 et 107% par suite de l'inoculation. La sonde permet ensuite de suivre la variation de la concentration en dioxygène dissous dans le milieu de culture.

Le 100% correspond à la saturation du milieu avec une pression partielle en dioxygène de 21% (v/v) de la pression totale, égale à la pression atmosphérique. La loi de Henry permet de calculer la concentration d'O<sub>2</sub> dissous (dO<sub>2</sub>) :

$$dO_2 = P_{O_2} \times k_{HO_2}$$

avec  $k_{HO_2}$  la constante de Henry du dioxygène, égale à  $1,24 \cdot 10^{-3}$  mol/L/bar à 28°C (Sander, 2015), ce qui équivaut à  $2,64 \cdot 10^{-4}$  mole de dioxygène par litre, soit 8,44 mg/L pour une pression totale d'une atmosphère. On peut remarquer que la concentration en oxygène dissous est proportionnelle à sa pression partielle dans la phase gazeuse.

Le témoin, sans inoculation de levure permet de montrer que le taux en dioxygène dissous reste constant en absence d'activité biologique, le milieu reste saturé en oxygène. La concentration d'oxygène dissous mesurée lors des essais biologiques résulte de l'effet conjoint de la consommation d'oxygène et de son apport par transfert de la phase gazeuse.

La concentration en oxygène dissous diminue très rapidement dès l'ensemencement pour l'aération par micro aération pour les plus faibles débits et pour l'aération par balayage, montrant que le transfert d'oxygène n'est pas suffisant pour compenser sa consommation. Par contre, pour

les débits les plus importants, le transfert est plus efficace et le pourcentage d'oxygène diminue plus lentement. De plus l'aération par micro diffuseur semble plus efficace que le bullage par diffuseur d'air annulaire pour un bon transfert de l'oxygène, comme on peut le voir en comparant les deux courbes à un même débit d'air (micro aération et bullage à 0,1 VVm). L'effet de l'agitation semble assez réduit.

A noter que la courbe grise se trouve au-dessous de la courbe verte, malgré des conditions d'aération et d'agitation plus favorables (respectivement 0,05/0,02 VVm et 500/295 rpm) ; la concentration en dioxygène dissous est légèrement inférieure contrairement à ce que l'on pourrait attendre en première approche. Cependant les levures se sont beaucoup mieux développées dans les conditions les plus favorables d'agitation et d'aération : à 70 h on mesure une absorbance de 8 contre 4,2 pour l'autre cas. Les levures ont donc consommé plus d'oxygène dans les conditions les plus favorables, ce qui peut expliquer la concentration en dioxygène dissous plus faible.

### 3.4. Calcul des $k_L a$

Les valeurs des coefficients de transfert volumiques  $k_L a$  (voir formule de calcul de  $k_L a$  ci-après) sont données dans le Tableau 5.

Débit G (VVm)	Agitation N (rpm)	$k_L a$ (h <sup>-1</sup> )
0,01	500	3,5
0,02	295	2,9
0,05	500	8,9
0,10	500	13,0

Tableau 5 :  $k_L a$  obtenus en fonction des débits et des agitations appliqués au milieu de culture.

Pour une même vitesse d'agitation (500 rpm), le coefficient  $k_L a$  augmente en même temps que le débit d'air introduit dans le bioréacteur par le micro diffuseur. C'est logique ; en effet lorsque le débit d'air augmente, le hold-up du gaz augmente aussi, accroissant ainsi l'aire interfaciale  $a$  à diamètre de bulle équivalent.

Quant au coefficient de transfert  $k_L$ , il dépend bien évidemment aussi de l'aération et de l'agitation par l'intermédiaire du nombre de Reynolds. Celui-ci augmente en effet avec la vitesse du gaz, donc le débit d'aération, mais surtout avec la vitesse de rotation de l'agitateur, accroissant ainsi le coefficient  $k_L$ .

L'augmentation du débit d'aération à vitesse de rotation constante induit donc une augmentation des deux paramètres  $a$  et  $k_L$ .

Les valeurs de  $k_L a$  trouvées dans ces essais sont assez faibles par rapport à ce qui est préconisé dans la littérature pour un bon transfert, plutôt de l'ordre de 60 à 80 h<sup>-1</sup>. Ceci peut-être dû à plusieurs facteurs : débit de gaz trop faible ; agitation trop limitée, taille de bulles trop importante et devra donc être étudié plus précisément lors de l'étude de scale up.

Pour une agitation moins élevée de 295 rpm et un débit 0,02 VVm,  $k_L a$  est plus faible que celui trouvé pour la condition : 500 rpm et 0,01 VVm. On constate bien ici l'importance de la vitesse de rotation.

Les corrélations de la littérature pour les dispersions gaz-liquide en réacteur agité sont souvent présentées sous la forme suivante pour des propriétés physicochimiques du système constantes :

$$k_L a = \text{cte} \cdot \left( \frac{P}{V_L} \right)^b \cdot v^c$$

avec  $P$  puissance d'agitation,  $V_L$  volume du liquide et  $v$  la vitesse du gaz. La puissance étant proportionnelle à  $N^3$ , il vient :

$$k_L a = \text{cte} \cdot N^{3b} \cdot Q_g^c$$

$Q_g$  étant le débit volumique gazeux.

Dans un premier temps en examinant les résultats à 500 rpm, on trouve une première corrélation :

$$k_L a = 48,9 \cdot Q_g^{0,57}$$

avec  $Q_g$  le débit de gaz en VVm et  $k_L a$  en  $h^{-1}$ .

C'est très cohérent avec la bibliographie qui donne pour  $c$  des valeurs comprises entre 0,4 et 0,7.

Atteindre la valeur de  $b$  est plus difficile car il n'y a qu'un seul point à une valeur différente de 500 rpm. Toutefois il est possible d'estimer une valeur approximative de  $b$  de 0,37, assez cohérente avec la bibliographie (valeurs comprises entre 0,4 et 0,7). Il faudrait bien sûr d'autres essais à différentes vitesses de rotation pour conforter ce résultat.

On trouve finalement :

$$k_L a = 0,048 \cdot Q_g^{0,57} \cdot N^{1,11}$$

avec  $Q_g$  en VVm,  $N$  en rpm et  $k_L a$  en  $h^{-1}$ .

Nous avons ensuite calculé, à partir des valeurs de  $k_L a$  mesurées, la quantité d'oxygène transférée par unité de temps et unité de volume liquide (QT) par l'équation suivante :

$$QT = k_L a \cdot 100 \cdot (\%O_2^* - \%O_2) C_{O_2eq}$$

avec  $\%O_2$  est le pourcentage d'oxygène dissous par rapport à l'équilibre avec l'air et  $C_{O_2eq}$  est la concentration de  $O_2$  dissous en équilibre avec l'air à la température considérée ( $2,64 \cdot 10^{-4}$  mol/L).  $\%O_2^*$  est le pourcentage à l'équilibre, soit 100%.

La valeur de QT pour les conditions 500 rpm et 0,02 VVM a été calculée à partir de la corrélation qui a donné la valeur de  $4,8 h^{-1}$  pour  $k_L a$ . Le pourcentage d'oxygène dissous dans



## Résultats et discussion

l'eau à l'état stationnaire doit être compris entre 0 et 20% (valeurs obtenues pour les essais à 0,01 et 0,05 VVm). On a donc une quantité transférée comprise entre 1 et 1,3 mmol/L/h.

Les valeurs obtenues sont données dans le Tableau 6.

Débit gaz (VVm)	Agitation N (rpm)	$k_L a$ ( $h^{-1}$ )	Concentration dioxygène dissous en régime stationnaire (% par rapport eq)	Quantité transférée par unité de temps et de volume de liquide (mmol/L/h)
0,01	500	3,5	0	0,9
0,02	295	2,9	0	0,8
0,02	500	2,9	$0 < \% < 20$	$1 < QT < 1,3$
0,05	500	8,9	20	1,9
0,10	500	13,0	70	1,0

Tableau 6 : Quantité de dioxygène transféré par unité de temps et volume en fonction des débits et agitation. En jaune sont représentées les valeurs calculées à partir de la corrélation obtenue.

Les quatre premières valeurs semblent logiques ; en effet quand on augmente le débit d'air la quantité transférée augmente. L'effet de la vitesse de rotation est manifeste sur l'essai à 295 rpm et 0,02 VVm.

Par contre, la quantité transférée pour la condition 0,10 VVm est plus faible que celles relatives aux débits 0,02 et 0,05 VVm, le tout pour 500 rpm. Ceci vient probablement d'une imprécision sur la détermination du pourcentage d' $O_2$  en régime stationnaire (Figure 42, page 97). En effet il n'est pas sûr que le régime stationnaire soit atteint et donc la valeur du pourcentage d'oxygène à l'équilibre est probablement inférieure à 70%. On sous-estime donc certainement la quantité transférée.

Quoi qu'il en soit, les quantités transférées sont du même ordre de grandeur, ce qui peut expliquer que la production de biomasse est assez similaire d'une condition à l'autre, comme nous le verrons plus loin.

### 3.5. Influence de l'aération sur les temps de doublement

Le temps de doublement d'une culture est égal à  $\frac{\ln(2)}{\mu}$  avec  $\mu$ , la vitesse spécifique de croissance ; ces dernières ont été calculées durant la phase exponentielle de croissance (Annexe 3 : Détermination des vitesses spécifiques de croissance en réacteur batch), donc en présence de glucose ; les temps de doublement correspondants sont représentés sur la Figure 43, avec les proportions de cellules viables.

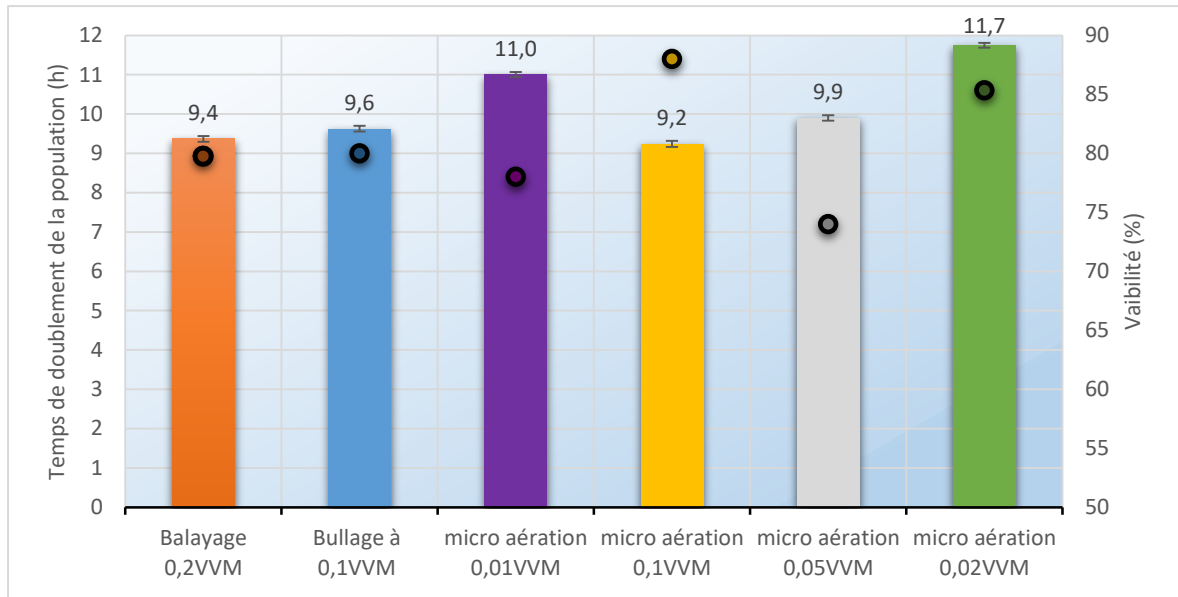


Figure 43 : Représentation du temps de doublement de la biomasse totale (en heure) en fonction de l'aération du milieu de croissance pour une culture en mode discontinu à 28°C. Les barres d'erreurs présentées ici sont issues du calcul de l'écart type réalisé sur les conditions de culture identiques (réplicats). Les symboles  $\odot$  représentent le pourcentage de viabilité.

Les temps de doublement sont en gros du même ordre de grandeur ; il semble cependant y avoir une légère incidence du mode d'aération. En effet, on observe que plus il y a d'air et plus le temps de doublement semble diminuer, ce qui correspond à un accroissement de la vitesse de croissance.

Nous avons mesuré la viabilité des cellules (bleu de méthylène). Nous obtenons les valeurs suivantes : 80 % pour le balayage, 80 % pour le bullage, 78 % pour la micro aération 0,01VVM, 85 % pour micro aération 0,02VVM, 74 % pour la micro aération 0,05VVM et 88 % pour la micro aération 0,1VVM.

La molécule colorante (bleu de méthylène) s'adsorbe aussi bien sur les membranes des cellules vivantes que des cellules mortes, mais certaines enzymes, actives chez les levures vivantes, vont réduire le colorant et le rendre incolore. Les cellules colorées sont donc les cellules mortes. Plusieurs problèmes se posent avec cette dégradation du colorant : certaines cellules bien que mortes ont en effet encore assez d'enzymes actives pour réduire le colorant et ainsi être comptées comme de faux positifs (White, Richardson, Schiewe, & White, 2003) ; *a contrario* le colorant peut bloquer certains processus intracellulaires et entraîner l'échec de sa dégradation par les cellules vivantes ; enfin en dessous de pH 4,6, l'adsorption du colorant augmente et beaucoup de cellules vivantes se colorent et sont comptées à tort comme mortes. Malgré ses défauts, le bleu de méthylène reste un colorant pour la mesure de la viabilité fréquemment utilisé en raison de sa disponibilité et de son faible coût (BKYeast - wordpress, 2013).

Compte tenu des imprécisions liées à la méthode et expliquées ci-dessus, nous pouvons considérer que la viabilité est la même pour tous les essais. Par la suite nous allons regrouper les conditions d'aération similaires pour les traiter ensemble et comparer ces ensembles les uns aux autres.

### 3.6. Influence de l'aération sur la production de biomasse et consommation de glucose

Suite aux résultats précédents qui nous ont permis de mettre en avant les différences de concentrations d'oxygène dissous dans le milieu en fonction des moyens et débits d'aération, nous allons examiner l'effet de l'aération sur la consommation du glucose et la production de biomasse.

L'absorbance du milieu à 600 nm a été suivie pour estimer la production de biomasse ; elle a été normalisée (ramenée à l'absorbance initiale, qui n'était pas exactement identique lors de chaque inoculation) afin de pouvoir comparer les essais entre eux.

#### 3.6.1. Condition balayage de la tête de cuve (0,2 VVm ; 500 rpm)

Les cinétiques de consommation du glucose par *S. cerevisiae* et de production de biomasse pour les conditions d'aération par simple balayage de l'air en tête de cuve ont été utilisées comme base pour juger de l'amélioration potentielle à la suite d'un changement de paramètre et pour s'assurer de la reproductibilité des trois lots de LSA utilisés lors de cette thèse ; cinq essais ont été réalisés, avec des taux d'ensemencement différents.



Figure 44 : Représentations cinétiques de a) l'absorbance normalisée et b) la concentration du glucose dans le milieu en fonction du temps, obtenues lors des 5 fermentations, suite à un simple balayage de l'air de la tête de cuve à un débit correspondant à 0,2 VVm et une agitation du milieu à 500 rpm. La concentration en phosphate diammonique est de 0,2 g/L.

La Figure 44 (a) représentant l'absorbance normalisée montre le même profil de croissance de *S. cerevisiae* quels que soient les lots utilisés. On peut distinguer trois phases : une courte phase de latence durant environ 5 à 7 heures ; une phase de croissance exponentielle durant 27 heures environ et une phase stationnaire permettant d'atteindre vers 70 heures de culture, une concentration en biomasse de 3,8 g/L de poids sec.

Pour le suivi de la concentration en glucose (Figure 44 (b)), les courbes sont toutes semblables. Elles montrent une période de 5 à 6 heures durant laquelle le glucose n'est pas consommé (phase de latence des levures), puis la phase de consommation commence à une vitesse de 5,8 g de glucose par heure (calculée par division de la masse de glucose par le temps d'épuisement du glucose), correspondant à 0,28 g de glucose par g MS et par heure (calculée par division de la vitesse de consommation du glucose par la biomasse mesurée lors de l'épuisement du glucose), jusqu'à l'épuisement du glucose à 73 heures de culture.

### 3.6.2. Condition diffuseur annulaire (0,1 VVm ; 500 rpm)

Les évolutions de la concentration du glucose et de l'absorbance du milieu à 600 nm normalisée en fonction du temps sont représentées sur la Figure 45.

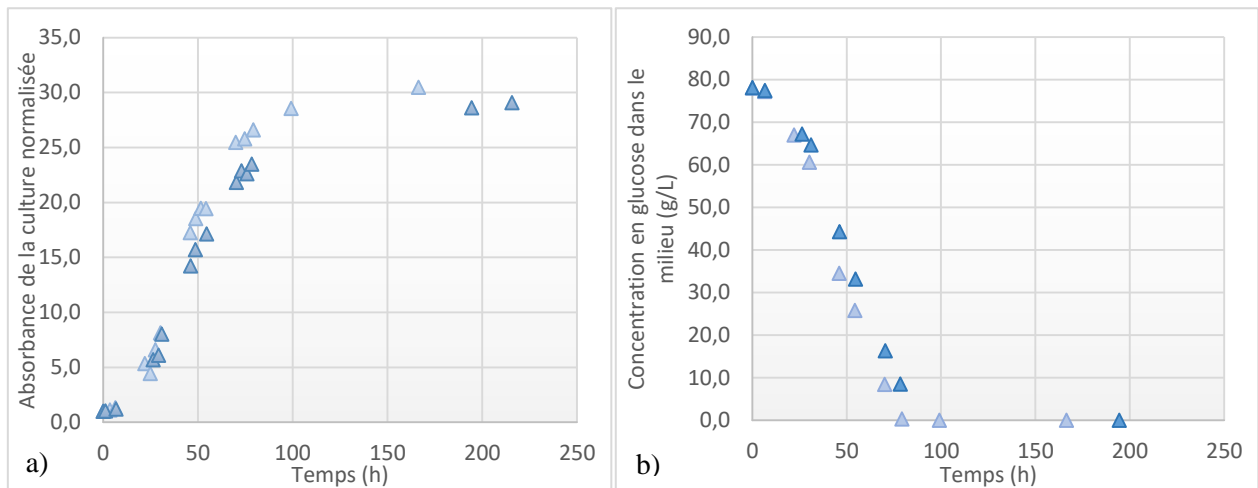


Figure 45 : Représentations cinétiques de a) l'absorbance normalisée et b) la concentration du glucose dans le milieu en fonction du temps, obtenues lors des 2 fermentations, suite à un bullage à l'aide d'un diffuseur annulaire à un débit correspondant à 0,1VVm et une agitation du milieu à 500 rpm. La concentration en phosphate diammonique est de 0,2 g/L.

La Figure 45 (a) montre deux profils de croissance de *S. cerevisiae* similaires pour cette même condition réalisée en duplicats. On peut distinguer les trois phases observées précédemment : une phase de latence durant environ 5 à 7 heures, comme pour la condition témoin ; une phase de croissance exponentielle durant 43 heures environ et une phase stationnaire démarrant à 100 heures de culture, où l'absorbance est stable et maximale à une valeur de 14, correspondant à un poids sec de 5,4 g/L.

Le suivi de la concentration en glucose (Figure 45 (b)) montre une période de 5 à 6 heures durant laquelle le glucose n'est que très peu consommé, puis la phase de consommation commence avec une vitesse de l'ordre 5,3 g de glucose par heure (0,18 g de glucose par g MS et par heure) jusqu'à l'épuisement du glucose aux environs de 79 heures de culture.

Le fait d'avoir aéré le milieu de culture par un diffuseur annulaire a entraîné une légère baisse de la vitesse de consommation du glucose par rapport aux essais en balayage, mais surtout une production de levures bien plus élevée pour une même quantité de glucose consommé, donc un meilleur rendement. Ceci est dû au fait qu'avec une meilleure aération on favorise la

respiration au détriment de la fermentation, ce qui donne un meilleur rendement biomasse/glucose. Ceci rejoint les résultats que nous avons observés lors des différents essais en fioles Erlenmeyer et semble suggérer que les résultats décrits lors de la première partie de ce chapitre sont utilisables pour une extrapolation de l'échelle des très petits volumes (50 mL), à l'échelle de cinq litres.

### 3.6.3. Condition micro diffuseur (0,1 ; 0,05 ; 0,01 VVm; 500 rpm)

Le bullage par diffuseur annulaire ayant donné une plus forte production de levure, nous avons testé un micro diffuseur, censé apporter un meilleur transfert de l'oxygène dans le milieu, afin d'estimer l'influence de cette amélioration sur la biomasse et la consommation de glucose à une même agitation de 500 rpm (Figure 46).

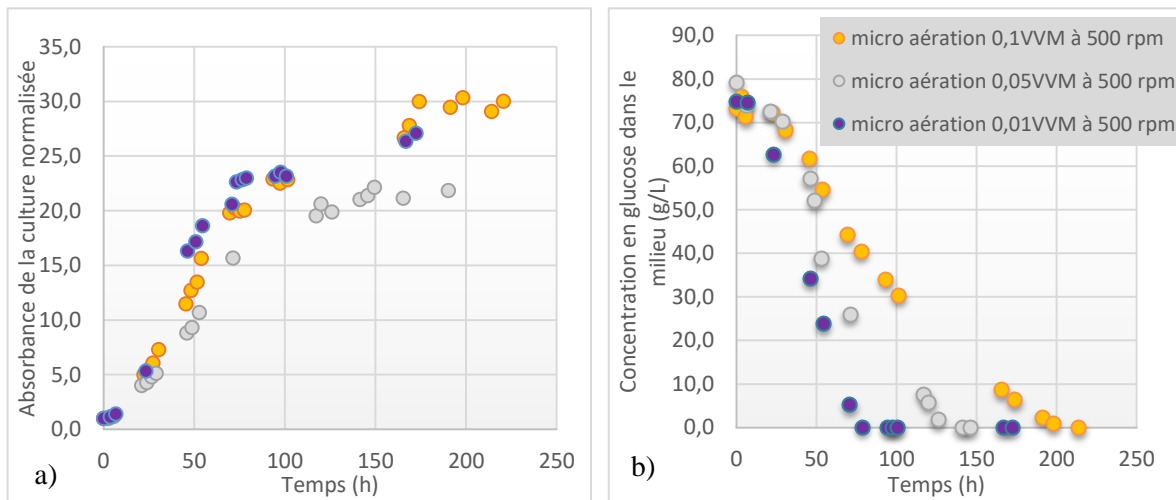


Figure 46 : Représentations cinétiques de a) l'absorbance normalisée et b) la concentration du glucose dans le milieu en fonction du temps, obtenues lors de 3 fermentations, suite à une aération par micro diffuseur à un débit correspondant à 0,1VVm pour la représentation de couleur jaune ; celle de couleur grise à 0,05VVm et enfin celle de couleur violette à 0,01VVm sous une agitation du milieu à 500 rpm. La concentration en phosphate diammonique est de 0,2 g/L.

Sur ces figures dont nous rappelons la signification des couleurs : jaune pour 0,1 VVm, grise pour 0,05 VVm et violette pour 0,01 VVm, on peut constater que les profils de croissance (Figure 46 (a)) sont à peu près semblables pour les 100 premières heures. La courbe à 0,05 VVm semble toutefois, de façon surprenante, un peu en deçà, mais n'ayant pas de points de mesure aux mêmes instants avec les autres conditions, il est difficile de conclure.

On peut distinguer plusieurs phases communes aux trois conditions : une phase de latence durant environ 5 à 7 heures, comme pour le balayage et le bullage avec diffuseur annulaire ; une phase de croissance exponentielle durant 30 heures environ ; un palier à des valeurs d'absorbance absolue entre 8 et 10 ; une recrudescence de la croissance permettant d'atteindre après 160 heures des absorbances absolues plus importantes de l'ordre de 12-13 pour deux des courbes, alors que la troisième courbe (0,05 VVm) semble stagner à une valeur de 11 et enfin une phase stationnaire. Les poids secs sont compris entre 5 et 5,5 g/L.

Le suivi de la concentration en glucose (Figure 46 (b)) montre lui aussi une période de 5 à 6 heures durant laquelle le glucose n'est que très peu consommé, puis suivant chaque niveau d'aération une vitesse de consommation du glucose différente est observée. Il ressort très clairement une diminution de la vitesse de consommation du glucose avec l'augmentation du débit d'aération.

La vitesse de consommation du glucose est ainsi pour les conditions de 0,01 ; 0,05 et 0,1 VVm, respectivement de 4,7 ; 3,1 et 1,9 g de glucose par heure (0,19 ; 0,13 et 0,07 g de glucose par g MS et par heure) jusqu'à l'épuisement du glucose aux environs de 79 ; 126 et 191 heures de culture.

Le fait d'avoir aéré le milieu de culture par un micro diffuseur à la place du diffuseur d'air annulaire a entraîné une baisse significative de la vitesse de consommation du glucose, liée à la part plus importante de la respiration par rapport à la fermentation par suite de la meilleure aération. Les vitesses de consommation de glucose sont à peu près similaires dans le cas du diffuseur annulaire à 0,1 VVm et celui du micro diffuseur à un débit 10 fois moindre ; ceci montre bien la plus grande efficacité de transfert du système de micro diffusion. Pour le même débit d'aération 0,1 VVm, la vitesse spécifique de consommation passe de 0,18 à 0,07 g de glucose par g MS et par heure en passant du diffuseur annulaire au micro diffuseur. Enfin pour le microdiffuseur, l'augmentation du débit d'air ralentit la consommation de glucose car il favorise la respiration au détriment de la fermentation.

La production de biomasse avec un même débit (0,1 VVm) semble à peu près similaire lors de l'épuisement du glucose pour le micro diffuseur et le diffuseur annulaire (5,5 et 5,4 g/L de poids sec).

#### **3.6.4. Condition micro diffuseur (0,02 VVm ; 295rpm)**

Les cinétiques de consommation du glucose par *S. cerevisiae*, ainsi que l'absorbance du milieu à 600 nm normalisée sont représentées dans la Figure 47 pour une aération par micro diffuseur à 0,02 VVm et sous une agitation de 295 rpm. Lors de ces quatre essais la concentration en glucose initiale était de 80 g/L, celle de phosphate diammonique de 3,2 g/L et l'inoculation de 0,1 g de LSA/L.

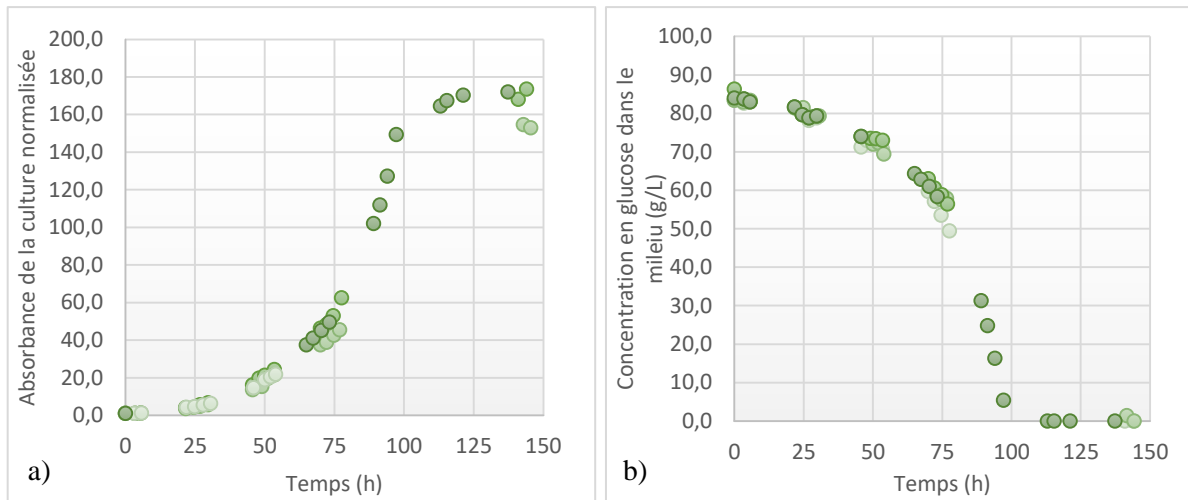


Figure 47 : Représentations cinétiques de a) l'absorbance normalisée et b) la concentration du glucose dans le milieu en fonction du temps, obtenues lors des 4 réplicats, suite à un bullage à l'aide d'un micro diffuseur à un débit correspondant à 0,02Vvm et une agitation du milieu à 295 rpm. La concentration en phosphate diammonique est de 3,2 g/L.

La Figure 47 (a) montre les profils de croissance des quatre réplicats qui se confondent, nous avons donc avec une bonne reproductibilité.

Nous pouvons là-encore observer : une phase de latence durant une dizaine d'heures, comme pour les conditions précédentes (témoin ainsi que les conditions dont l'aération a été réalisée à l'aide du diffuseur annulaire ou micro diffuseur) ; puis durant 22 heures environ, une phase de croissance exponentielle atteignant lentement une valeur d'environ 12 unités d'absorbance ; puis une absorbance maximale de 14,5 après 140 heures de culture ; et enfin une phase stationnaire où la population se maintient, correspondant à un poids sec de 6,5 g/L.

Le suivi de la concentration en glucose (Figure 47 (b)) montre elle aussi une période de 5 à 6 heures durant laquelle le glucose n'est que très peu consommé, puis la concentration chute suite à une consommation de 4,0 g de glucose par heure jusqu'à 100 heures de culture correspondant à l'épuisement du glucose et à une vitesse spécifique de 0,26 g de glucose par g MS et par heure.

### 3.6.5. Condition micro diffuseur (0,1 VVm ; 295rpm faible concentration de glucose)

Les cinétiques de consommation du glucose par *S. cerevisiae*, ainsi que l'absorbance du milieu à 600nm sont représentées dans la Figure 48 pour une aération par micro diffuseur à 0,1 VVm, sous une agitation de 295 rpm. Lors de cet essai nous avons utilisé des conditions différentes des essais précédents : la concentration en glucose initiale était de 20 g/L (contre 80 g/L auparavant), celle de phosphate diammonique de 3,0 g/L et l'inoculation de 0,1 g de LSA/L.

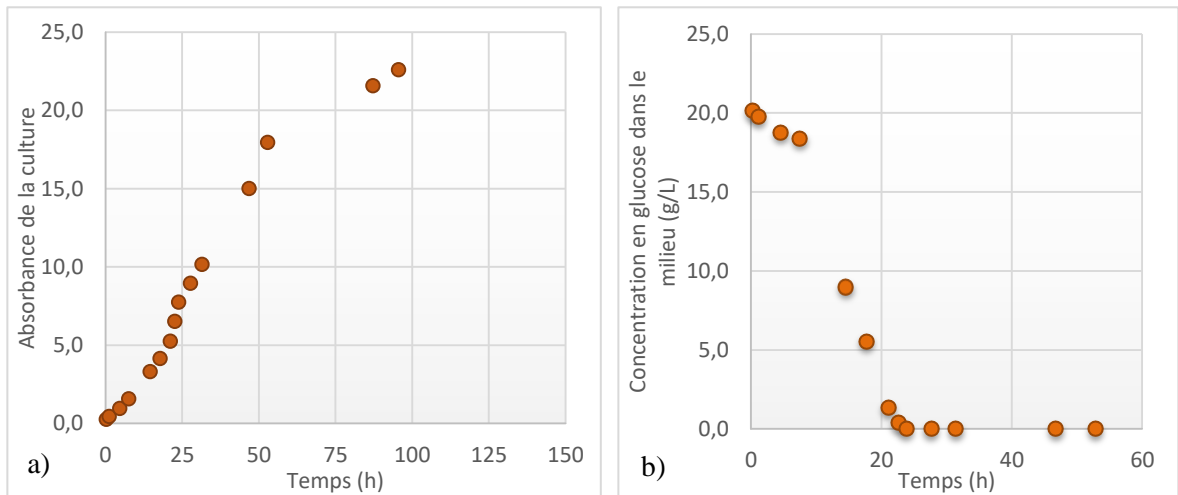


Figure 48 : Représentations cinétiques de a) l'absorbance à 600nm et b) la concentration du glucose dans le milieu en fonction du temps, obtenues lors d'une fermentation, suite à un bullage à l'aide d'un micro diffuseur à un débit correspondant à 0,1VVm et une agitation du milieu à 295 rpm. La concentration en phosphate diammonique est de 3,2 g/L.

La Figure 48 (a), montre un profil de croissance de *S. cerevisiae* dont les points des duplicats se confondent. On peut distinguer une courte phase de latence inférieure à deux heures, suivie d'une phase de croissance exponentielle durant 50 à 60 heures ; une phase stationnaire se dessinant aux alentours de 95 heures de culture, où la valeur d'absorbance est de 21, correspondant à un poids sec de 9,7 g/L.

Le suivi de la concentration en glucose (Figure 48 (b)) montre une période assez courte comme pour la Figure 48 (a), d'environ 6 à 7 heures durant laquelle le glucose n'est que très peu consommé, puis la phase de consommation commence avec une vitesse de l'ordre de 4,4 g de glucose par heure jusqu'à l'épuisement du glucose aux environs de 23 heures de culture et une vitesse spécifique de 0,19 g de glucose par g MS et par heure.

Le fait d'avoir diminué la concentration en glucose a permis de quasiment doubler la concentration de biomasse grâce à une prédominance de la respiration sur la fermentation. Nous retrouvons l'effet Crabtree décrit lors des optimisations en fioles Erlenmeyer, à savoir qu'une concentration en glucose trop élevée favorise la fermentation par rapport à la respiration, ce qui diminue le rendement biomasse/glucose. Un rendement en biomasse par gramme de glucose bien meilleur est obtenu comparé aux essais précédents réalisés sur milieu hydro-alcoolique à des concentrations en glucose plus élevée (Tableau 7 ; page 110).

### 3.6.6. Condition micro diffuseur sur moût (0,02 VVm ; 295rpm)

A titre de comparaison nous avons fait un essai de propagation sur un moût de raisin pour une aération par micro diffuseur à 0,02 VVm et sous une agitation de 295 rpm. Les cinétiques de consommation du glucose par *S. cerevisiae*, ainsi que l'absorbance du milieu à 600nm sont représentées dans la Figure 49. Lors de cet essai la concentration en sucre initiale était de 70 g/L de glucose et 70 g/L de fructose obtenue par dilution du moût et un apport en nutriments a été réalisé (0,2 g/L de ZnSO<sub>4</sub> ; 0,4 g/L d'extrait de levure ; 0,3 g/L de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). L'inoculation



## Résultats et discussion

est de 1,3 g de LSA/L contrairement aux précédents batch dont l'inoculation était de 0,5 voire 0,1 g de LSA/L. Ces conditions ont été choisies afin de reproduire l'essai réalisé en cave sur une cuve de 20 hL.

A 68 heures de culture, une vidange partielle a été réalisée et un apport en moût a été effectué afin de retrouver une concentration en glucose de 68 g/L et autant en fructose (dilution au 3/4 par apport de moût).

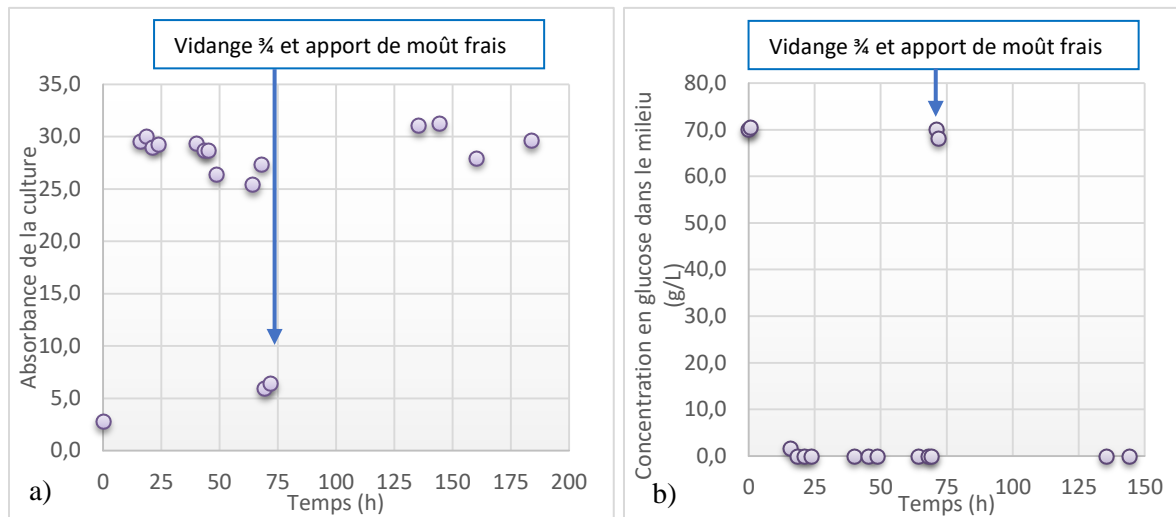


Figure 49 : Représentations cinétiques de a) l'absorbance à 600 nm et b) la concentration du glucose dans le moût en fonction du temps, obtenues lors d'une fermentation avec vidange partielle et remplissage, suite à un bullage à l'aide d'un micro diffuseur à un débit correspondant à 0,02Vvm et une agitation du milieu à 295 rpm. La concentration en phosphate diammonique est de 0,3 g/L.

Sur la Figure 49 (a), la croissance de *S. cerevisiae* est rapide. Très rapidement après l'inoculation, l'absorbance atteint son maximum (29 unités d'absorbance correspondant à un poids sec de 11,9 g/L), l'analyse n'a pu être réalisée qu'après 15 heures de culture. Cela correspond à l'épuisement total du glucose et du fructose. Puis on observe une phase stationnaire où la population se maintient. Un rendement en biomasse par gramme de sucre d'environ 9% est obtenu à peu près identique à celui des essais précédents réalisés sur milieu hydro-alcoolique. Il a été calculé en tenant compte du glucose et du fructose consommés.

Suite à la vidange de 3/4 du milieu et à l'apport de moût frais (70 h) la croissance semble repartir aussitôt.

Nous n'avons pu faire que le suivi de la concentration en glucose (Figure 49 (b)), il montre lui aussi une consommation dès le début de l'inoculation à 18,7 g de glucose par heure, mais étant donné que la biomasse est produite à partir de glucose et de fructose, il n'est pas possible de calculer une vitesse spécifique de consommation du glucose par gramme de poids sec jusqu'à 19 heures de culture pour la première période de croissance. Dans la deuxième période de croissance, la vitesse de consommation de glucose est difficilement calculable car on ne connaît pas l'instant précis d'épuisement du glucose. On peut cependant constater que la vitesse de consommation du glucose est supérieure à celle des essais sur vin, même si le rendement est du même ordre de grandeur. A noter que le fructose est également consommé pour produire de la biomasse. La vitesse de consommation des sucres est donc très importante.

Un essai a été réalisé simultanément en cave à la coopérative de La Chablisienne, dans les mêmes conditions de croissance, mais à partir de LSA dénommée Excellence B2, sélectionnée pour leurs bonnes propriétés de fermentation sur moût. Il s'agit d'une souche *Saccharomyces cerevisiae* dont la dose d'emploi recommandée est identique à notre souche (20 à 40 g LSA/hL de milieu à vinifier). La phase stationnaire a débuté à 17 h et semble s'achever vers 29 h avec une concentration cellulaire de 400 millions de levures viables par millilitre (la viabilité mesurée par étalement sur milieu gélosé YPD sur boîte de Pétri était de 85%). Ceci correspondrait à un poids sec d'environ 15 g/L en 29 h à comparer avec notre valeur de 11,9 g/L en 15 h.

Cela montre une bonne reproductibilité entre l'échelle laboratoire et industrielle malgré une cuve industrielle dont l'instrumentation était encore perfectible (notamment l'agitation et l'aération). Par contre, on observe une réelle différence de croissance sur ce milieu ne contenant pas d'éthanol, les vitesses de consommation du glucose sont plus fortes et le temps de latence est très réduit. Mais ce dernier point peut être lié au fort taux d'inoculation utilisé sur décision de l'œnologue de la coopérative par crainte de contaminations, les essais ayant été réalisés avec du moût non filtré.

### 3.6.7. Récapitulatif

Tous les essais batch sauf un ont quasiment les mêmes concentrations en glucose, éthanol et glycérol à l'instant initial.

Le Tableau 7 ci-après regroupe les résultats obtenus.

Résultats et discussion

	Concentrations initiales (g/L)		Temps (h)		Poids sec (g/L)		Vitesses spécifiques de consommation du glucose (g glc/g MS/h)	Vitesses de production de biomasse (gMS/L/h)		Rendements (g MS/g glc)	Concentrations cellulaires au temps final (cell/mL)	Masses d'une cellule à l'instant final (pg)
	glucose	éthanol	à épuisement	final	à épuisement	final		à épuisement	entre temps épuisement et final			
<b>Balayage 0,2VVm</b>	78,7	44,8	73	75	3,80	4,00	0,28	0,052	0,100	0,048	7,49E+07	53,4
<b>Diffuseur anneau 0,1VVm</b>	78,0	40,7	79	215	5,40	6,49	0,18	0,068	0,008	0,069	5,20E+08	12,5
<b>Micro diffuseur 0,1VVm</b>	71,5	38,6	198	220	5,50	5,50	0,07	0,028	0,000	0,077	1,13E+08	48,6
<b>Micro diffuseur 0,05VVm</b>	77,4	44,1	126	190	4,80	4,84	0,13	0,038	0,001	0,062	8,83E+07	54,8
<b>Micro diffuseur 0,02VVm</b>	75,1	42,9	100	144	2,90	6,70*	0,26	0,029	0,086	0,039	2,09E+08	32,1
<b>Micro diffuseur 0,01VVm</b>	74,0	39,3	79	172	5,00	5,02	0,19	0,063	0,000	0,068	5,39E+08	9,3
<b>Micro diffuseur 0,1VVm</b>	20,1	44,6	23	95	3,40	9,73*	0,26	0,148	0,088	0,17	3,59E+08	27,1

Tableau 7 : Récapitulatif des vitesses de consommation du glucose et production de biomasse ainsi que les rendements obtenus suivant les différents débits d'aération et concentrations initiales en glucose. \* : condition dont la concentration en  $(NH_4)_2HPO_4$  initiale était de l'ordre de 3 g/L.

Les rendements de biomasse à partir de glucose sont assez proches entre les conditions à 80 g/L de glucose (Figure 50) mais semblent dépendre de la concentration en glucose initial comme on peut le voir en comparant avec la condition à 20 g/L de glucose (non représenté ci-dessous, cf. Tableau 7). Cependant le rendement de l'essai avec micro diffuseur à 0,02 VVm sur le vin donne un rendement plus faible que les autres (d'un facteur 1 à 2 environ), car le poids sec au moment de l'épuisement du glucose est plus réduit ; toutefois à la fin de la culture le poids sec a rattrapé son retard. Cette condition tout comme celle à faible concentration en glucose dont les effets semblent similaires (non représenté ci-dessous, cf. Tableau 7), ont été réalisées avec une concentration en phosphate diammonique plus élevée (3 contre 0,2 g/L) ce qui pourrait expliquer cette différence, mais l'effet des ions ammonium n'est pas bien défini et les avis sont parfois même contradictoires. Les effets semblent varier en fonction de nombreux paramètres (concentration en glucose, température, oxygène,...(Valero, Millán, Ortega, & Mauricio, 2003)) ainsi que de la souche (Jiranek, Langridge, & Henschke, 1995). Dans notre cas, nous ne pouvons expliquer ce résultat, si ce n'est que nous pouvons émettre l'hypothèse que la levure, en contact avec les ions ammoniums, a réalisé des stocks (glycogène ? tréhalose ?) réutilisés en respiration lors de l'épuisement du glucose.

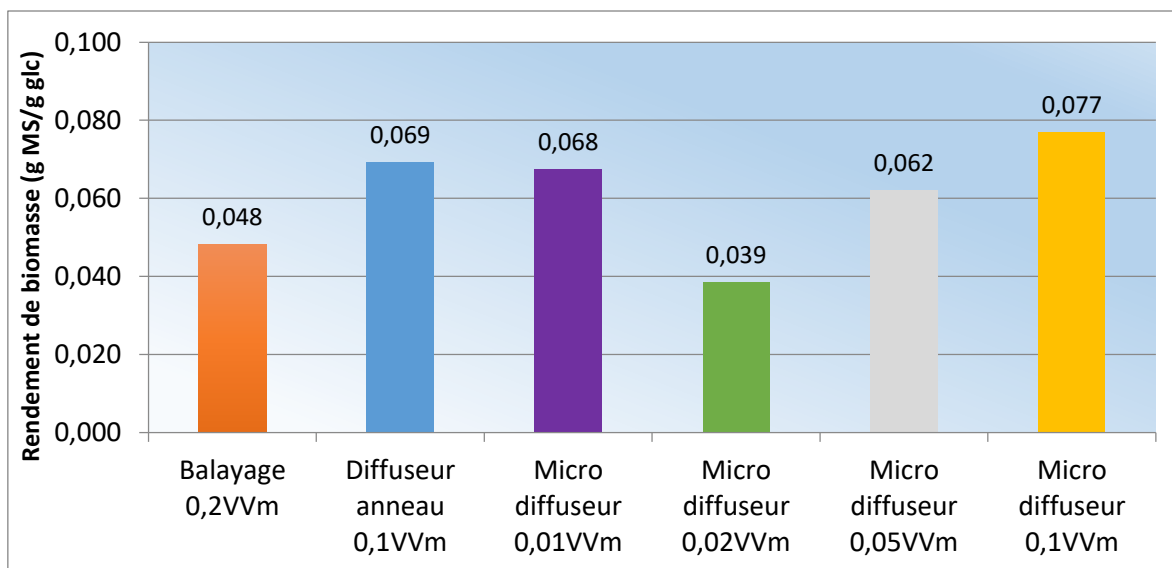


Figure 50 : Rendements de biomasse par rapport au glucose pour les essais à 80 g/L de glucose initial.

Les différents dispositifs et débits d'aération testés ont montré une bonne reproductibilité et ont permis de classer les conditions en fonction des meilleures optimisations effectuées. Tout d'abord pour les essais avec balayage en tête de cuve, diffuseur annulaire à 0,1VVm et micro diffuseur à 0,01VVm, dès 70 heures de culture, la levure a consommé tout le glucose mis à sa disposition. Ces trois conditions conduisent à des résultats très similaires, c'est-à-dire une consommation très rapide du glucose présent dans le milieu. On peut remarquer que l'aération par le micro diffuseur conduit à la même vitesse spécifique de consommation du glucose que le diffuseur d'air annulaire à un débit d'air 10 fois plus important. On peut donc penser que dans ces conditions d'aération peu efficaces, la fermentation est prépondérante, expliquant cette consommation de glucose rapide. Les taux de croissance spécifiques sont proches : 0,07 (diffuseur d'air annulaire à 0,1VVm) et 0,06 h<sup>-1</sup> (micro diffuseur à 0,01VVm) (cf. temps de doublement paragraphe 3.5 page 100).

Pour les conditions avec une aération par le micro diffuseur plus importante, la consommation du glucose est décalée dans le temps, avec, pour les aérations de 0,05 et 0,1VVm, une consommation plus progressive laissant apparaître du glucose jusque respectivement 126 et 198 heures. La comparaison des conditions d'aération montre que la disponibilité en oxygène a un impact sur consommation du glucose, par le biais de la proportion respiration/fermentation existant dans la culture. Cette observation correspond à ce qui est relaté dans la littérature lorsque la levure utilise un métabolisme oxydatif pour sa croissance (Dewey *et al.*, 1984; Larpent, 1990, p. 218).

D'autres auteurs, au contraire, ont observé que l'aération des milieux de culture a accéléré la consommation des sucres (Phong Lai, 2010), mentionnant un épuisement à 94 h en condition semi-anaérobie contre 144 h pour l'anaérobie stricte. Ceci s'explique par un rendement énergétique plus élevé lors de la respiration qui conduit à une consommation en substrat plus faible pour le même besoin en énergie par cellule. En présence suffisante de dioxygène, la consommation de chaque cellule diminue mais le rendement énergétique étant meilleur la croissance l'est aussi, entraînant une augmentation de la population totale et donc une consommation apparente en glucose total restant stable, voire même ayant tendance à diminuer. Tout ceci va dans le sens de nos résultats qui semblent confirmer que la proportion fermentation/respiration est un paramètre extrêmement influent pour le contrôle de la vitesse, ce paramètre étant lié à l'aération ainsi qu'à la concentration en glucose.

Pour mieux visualiser les résultats la vitesse de consommation de glucose et la vitesse spécifique ramenée à la biomasse sont portées sur la Figure 51. Les vitesses ont été ramenées à celles calculées lors de la croissance dans le moût, c'est-à-dire 37,45 g de sucre consommé par heure et une vitesse spécifique de 1,2 g de sucre par g MS et par heure.

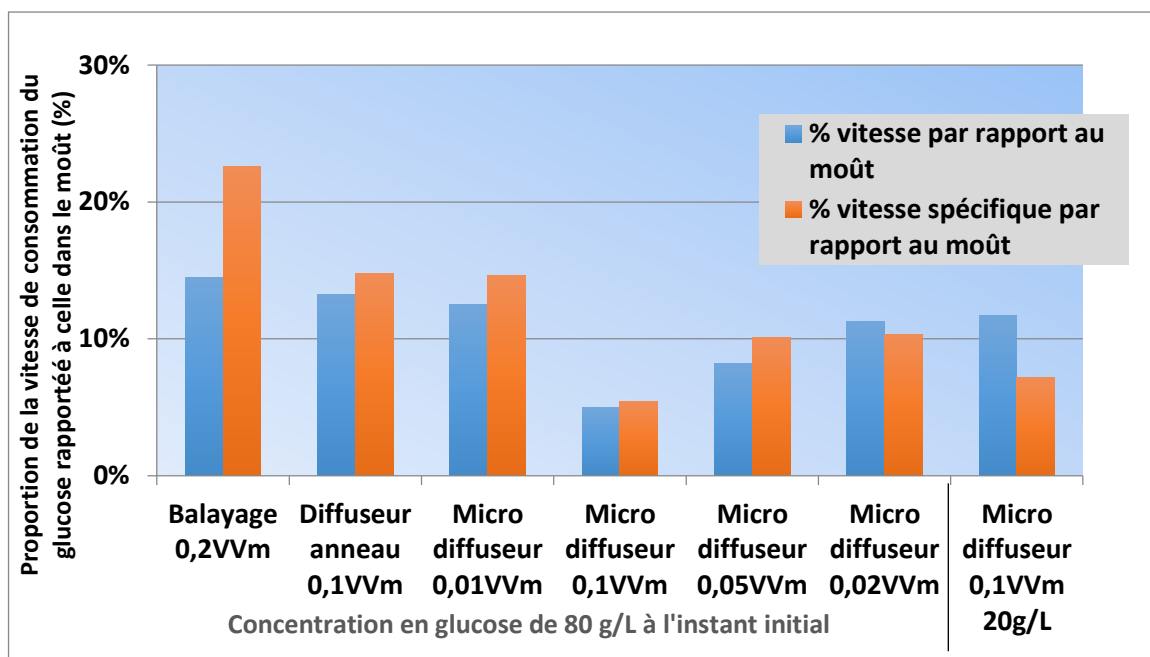


Figure 51 : Vitesses de consommation du glucose en bleu et vitesses de consommation spécifiques (rapportée à la biomasse) en orange et en fonction des conditions d'aération, rapporté aux vitesses de consommation des sucres dans le moût, condition dont la productivité était maximale.

Sur cette Figure 51, l'effet de l'aération sur la consommation du glucose est très nettement observable. La vitesse de consommation de glucose diminue lorsque l'efficacité de l'aération augmente, il en est de même pour la vitesse spécifique de consommation du glucose.

La Figure 52 montre la vitesse de production de biomasse à épuisement du glucose : si l'on excepte la condition à 0,02 VVm, déjà citée comme particulière, on peut constater que la vitesse de production de biomasse décroît lorsque l'aération augmente par suite de la part de plus en plus importante de la respiration. La vitesse pour une concentration moindre de glucose (20 g/L) est deux fois plus importante.

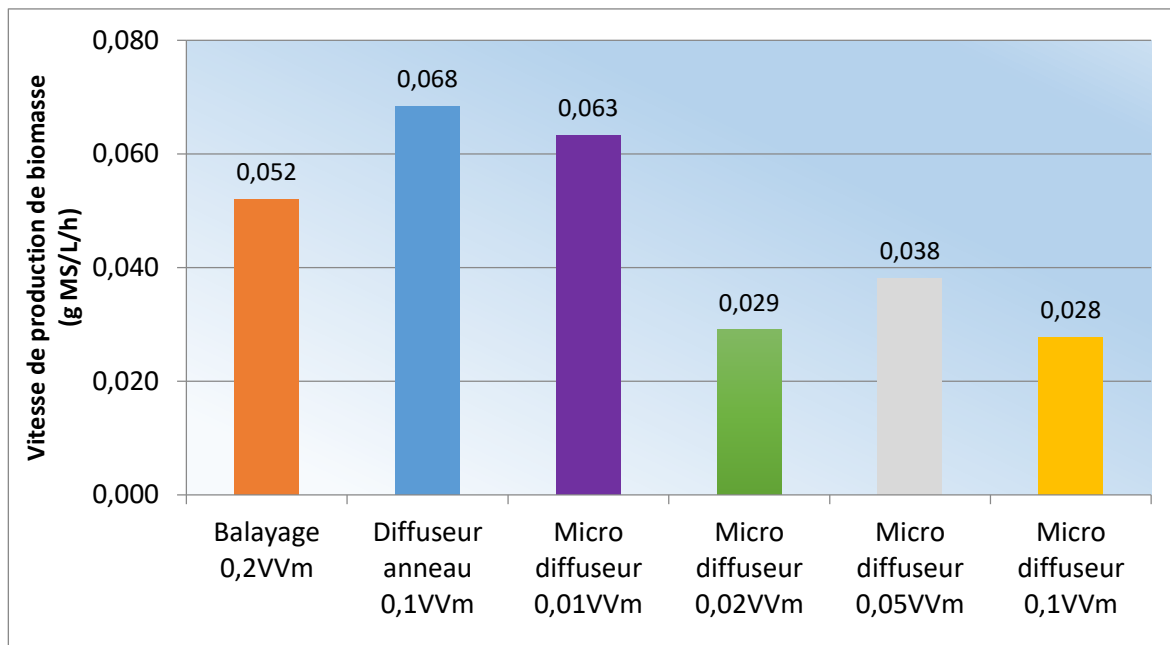


Figure 52 : Vitesse de production de biomasse à 80 g/L de glucose initial.

Comme nous l'avons montré dans le paragraphe 2.2.2 le rendement spécifique de production de levure et sa vitesse sont supérieures pour les faibles concentrations de glucose.

Ainsi pour une productivité de la levure maximale nous choisirons de maintenir la concentration de glucose à une valeur faible, par exemple 1 g/L ; nous choisirons par la suite une aération de 0,1VVm et une concentration en phosphate diammonique de 3 g/L.

### 3.7. Influence de l'aération sur les produits de fermentation

Les différents prélèvements effectués tout au long des cultures ont permis de suivre et analyser par chromatographie liquide haute pression (CLHP) les différents produits de fermentation dont les principaux représentés dans cette partie sont le glycérol et l'éthanol.

#### 3.7.1. Evaporation de l'éthanol

Nous avons d'abord vérifié que la quantité d'éthanol évaporée lors des différentes aérations était négligeable, afin de pouvoir considérer que la concentration d'éthanol mesurée était bien représentative de sa production et de sa consommation.

On peut raisonnablement supposer que l'évaporation lors du balayage sera inférieure à celle obtenue lors de la micro-aération. Nous avons donc calculé la quantité d'éthanol évaporée entre l'instant 0 et l'instant final  $t_f$ , lors de ces essais.

## Résultats et discussion

Cette quantité est égale à:  $N_g \int_0^{tf} y dt$

avec  $N_g$  le débit molaire total du gaz (supposé constant et égal au débit d'air utilisé) et  $y$  la fraction molaire d'éthanol dans le gaz qui varie en fonction du temps.

Nous avons considéré de plus que la phase gazeuse est en équilibre avec la phase liquide pour le partage de l'éthanol. Selon la loi de Henry la concentration d'éthanol dissous  $C_{etOH}$  est proportionnelle à la pression partielle en éthanol  $P_{etOH}$ . La formule suivante permet de calculer la pression partielle en éthanol dans le gaz sortant à partir des concentrations mesurées dans le milieu de croissance :

$$C_{etOH} = P_{etOH} k_{HetOH}$$

Avec  $k_{HetOH}$  la constante de Henry pour l'éthanol.

La constante de Henry étant dépendante de la température, nous avons calculé sa valeur à 28°C à l'aide de l'équation qui décrit ses variations en fonction de la température (Sander, 2015) :

$$k_{HetOH} = k_{HetOHstd} \times \exp\left(\frac{-\Delta H_{sol}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{std}}\right)\right)$$

avec :

- $k_{HetOH, std}$  la constante de Henry pour l'éthanol dans les conditions standards (25°C) qui est égale à 1,9 mol/m<sup>3</sup>/Pa
- $\Delta H_{sol}$  l'enthalpie de solubilisation
- $R$  la constante des gaz parfaits égale à 8.314 J.mol<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup>.

Nous obtenons ainsi la valeur de 157,5 mol/L/atm à 28°C.

On calcule la quantité d'éthanol évaporé dans les conditions les plus défavorables (micro diffuseur à 0,1 VVm et agitation à 500 rpm) comme suit, pour chaque essai :

$$N_g \int_0^{tf} y dt = N_g \int_0^{tf} \frac{P_{etOH}}{P_t} dt = N_g \int_0^{tf} \frac{C_{etOH}}{k_{HetOH} P_t} dt = \frac{N_g}{k_{HetOH} P_t} \int_0^{tf} C_{etOH} dt$$

On trouve la valeur de 0,047 g d'éthanol par heure pour une concentration de 80 g/L d'éthanol, c'est-à-dire moins de 2 % de la quantité totale (Annexe 4 : Calcul de l'évaporation d'éthanol dans le réacteur avec condenseur).

La quantité d'éthanol évaporée est donc négligeable, sa concentration mesurée en phase liquide est bien représentative de sa production et de sa consommation.

### 3.7.2. Condition balayage de la tête de cuve (0,2 VVm ; 500 rpm)

Nous rappelons que lors de nos études en batch, nous avons utilisé comme base ou témoin, ces conditions d'aération par simple balayage de l'air de la tête de cuve, afin de comparer et juger de

l'amélioration à la suite d'un changement de paramètre, ainsi que de s'assurer de la reproductibilité des 3 lots de LSA utilisés au cours ces différentes propagations de micro-organismes. Dans cette partie, les cinétiques de production de l'éthanol et du glycérol par *S. cerevisiae* vont être suivies et la figure 30 représente l'évolution des concentrations des cinq essais en fonction du temps qui sont bien reproductibles, quels que soient les lots de LSA utilisés au cours de ces trois années de recherche.

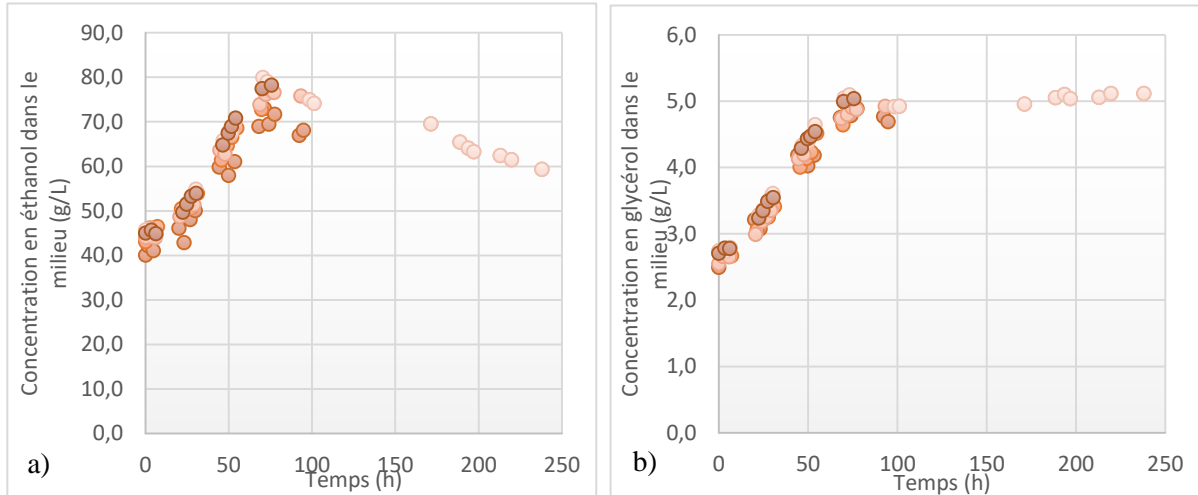


Figure 53 : Représentations cinétiques de a) la concentration de l'éthanol et b) la concentration du glycérol dans le milieu en fonction du temps, obtenues lors des 5 fermentations, suite à un simple balayage de l'air de la tête de cuve à un débit correspondant à 0,2V<sub>Vm</sub> et une agitation du milieu à 500 rpm. La concentration en phosphate diammonique est de 0,2 g/L.

Le suivi de la concentration en éthanol dans le milieu de culture représenté sur la Figure 53 (a), montre une période de 5 à 6 heures durant laquelle l'éthanol n'est pas produit, puis une phase de production élevée jusque 70 heures ; une phase de consommation est ensuite observable entre 90 heures et la fin de la culture (environ 10 jours). La productivité en éthanol obtenue entre 5 et 70 heures est de 0,006 gramme d'éthanol par gramme de glucose et par heure jusqu'à l'épuisement du glucose (rendement en éthanol de 0,40 g/g correspondant au maximum des rendements décrits dans la pratique, nous sommes donc lors de cet essai, totalement en fermentation), correspondant à une production spécifique d'éthanol de l'ordre de 0,13 g d'éthanol par g de poids sec et par heure.

Sur la Figure 53 (b) représentant la concentration de glycérol, on observe deux phases : très rapidement, après une phase de latence très réduite, une phase d'augmentation de la concentration de 2,7 à 5 g/L en 70 heures de culture puis une phase de stabilisation ou une très légère baisse semble se mettre en place.

Ce moment clef à 70 heures de culture correspond à l'arrêt de production de l'éthanol et à l'épuisement du milieu en glucose. La période de 5 à 6 heures durant laquelle l'éthanol n'est pas produit correspond elle, à la phase de latence observée lors du suivi de la croissance des levures.

La consommation de l'éthanol correspond à une deuxième période de croissance de la levure à partir de ce substrat, intervenant lorsque le glucose est épuisé. Dans ce cas le glycérol est très peu consommé pour sa part.



### 3.7.3. Condition diffuseur annulaire (0,1 VVm ; 500 rpm)

Le bullage à l'aide d'un diffuseur annulaire à un débit de 0,1 VVm a conduit à des cinétiques de production du glycérol et de l'éthanol par *S. cerevisiae* représentées sur les graphiques Figure 54 (a) et (b). Les deux essais donnent des résultats parfaitement reproductibles.

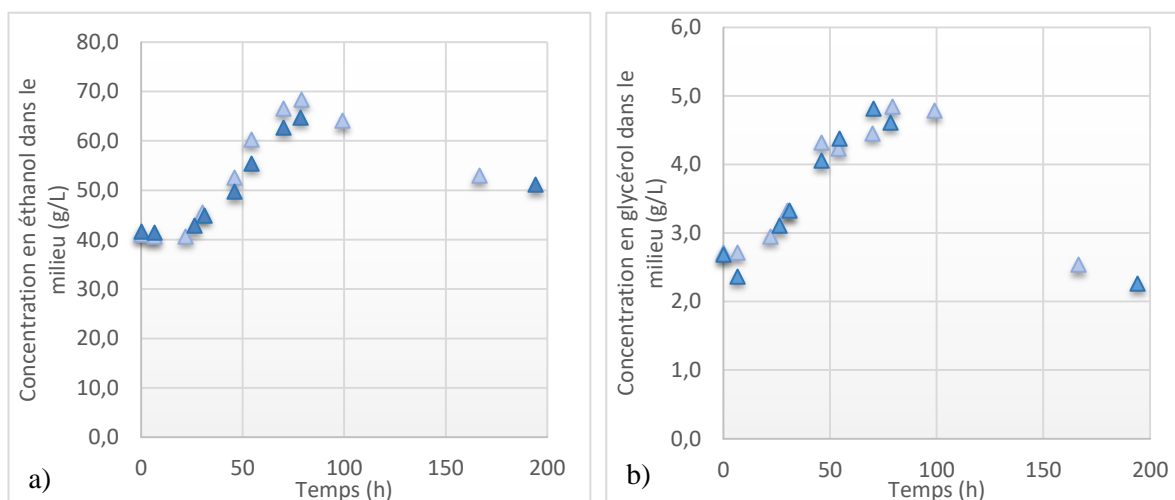


Figure 54 : Représentations cinétiques de a) la concentration de l'éthanol et b) la concentration du glycérol dans le milieu en fonction du temps, obtenues lors des 2 fermentations, suite à un bullage à l'aide d'un diffuseur annulaire à un débit correspondant à 0,1 VVm et une agitation du milieu à 500 rpm. La concentration en phosphate diammonique est de 0,2 g/L.

Le suivi de la concentration en éthanol dans le milieu de culture représenté sur la Figure 54 (a), montre une longue période de plus de 20 heures durant laquelle l'éthanol n'est pas produit, puis une production jusqu'à 80 heures (augmentation de 65% de la concentration en éthanol dans le milieu) et enfin une phase de consommation est observable de 80 heures à la fin de l'étude, aux environs de huit jours.

La productivité en éthanol obtenue est de 0,005 gramme d'éthanol par gramme de glucose et par heure jusqu'à l'épuisement du glucose (rendement en éthanol de 0,32 g/g), correspondant à une production spécifique d'éthanol de l'ordre de 0,08 g d'éthanol par g de poids sec et par heure. Le fait d'avoir aéré la culture à 0,1 VVm par le diffuseur annulaire a diminué la vitesse spécifique de production d'éthanol par rapport à la condition avec un simple balayage de l'air de la tête de cuve, ce qui est normal compte tenu de l'augmentation de la part de la respiration par rapport à la fermentation.

Sur la Figure 54 (b) représentant la concentration de glycérol, on observe successivement une phase de latence d'environ 7 à 10 heures, une augmentation de la concentration en glycérol de 2,7 à 4,6 g/L en 70 heures de culture, une stabilisation durant 30 heures environ et enfin de 100 heures à la fin de l'étude, une consommation du glycérol faisant passer sa concentration de 4,7 à 2,3 g/L.

Cet instant d'arrêt de la production du glycérol à 80 heures de culture correspond encore une fois à l'épuisement du milieu en glucose et à l'arrêt de production de l'éthanol.

La période durant laquelle l'éthanol dans le milieu n'évolue pas, correspond à peu près à la phase de latence, déjà observée lors du suivi de la croissance.

La consommation de l'éthanol et du glycérol correspond à une deuxième période de croissance de la levure à partir de ces substrats, intervenant lorsque le glucose est épuisé. Le fait que le glycérol est consommé ici contrairement aux essais avec balayage est probablement lié à la meilleure aération.

### 3.7.4. Condition micro diffuseur (0,1 ; 0,05 ; 0,01 VVm; 500 rpm)

Le micro diffuseur a montré une meilleure performance d'aération par rapport au balayage et au diffuseur annulaire. Nous allons décrire dans ce paragraphe, les résultats obtenus lors de ces trois essais à différents débits d'aération, sachant que les différences d'aération ont eu un effet sur la production de biomasse ainsi que sur la consommation du glucose et la production de biomasse. Nous supposons donc trouver aussi un effet sur la production d'éthanol et de glycérol. La Figure 55 représente l'évolution des concentrations en éthanol et glycérol en fonction du temps.

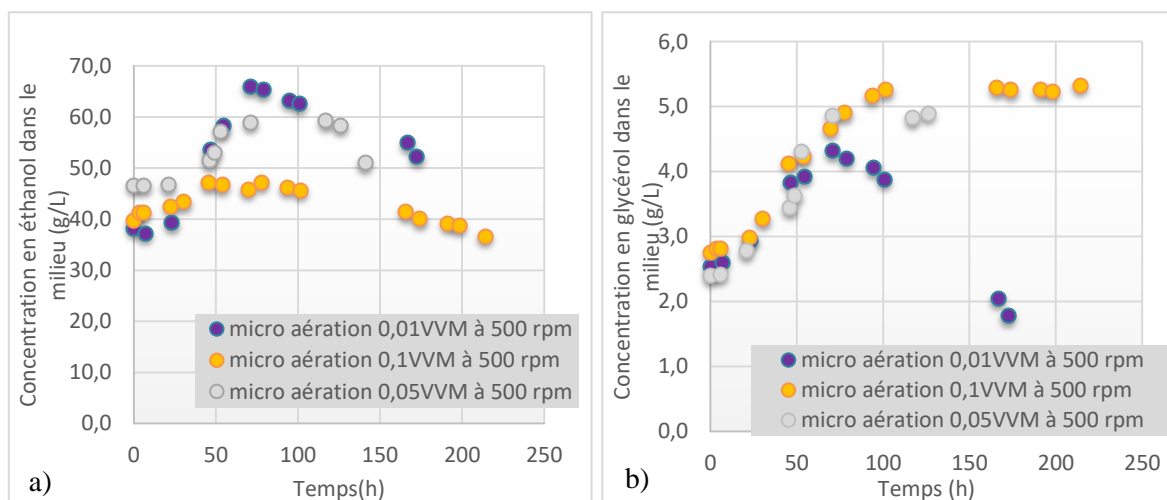


Figure 55 : Représentations cinétiques de a) la concentration de l'éthanol et b) la concentration du glycérol dans le milieu en fonction du temps, obtenues lors de 3 fermentations, suite à une aération par micro diffuseur à un débit correspondant à 0,1VVm pour la représentation de couleur jaune ; celle de couleur grise à 0,05VVm et enfin celle de couleur violette à 0,01VVm sous une agitation du milieu à 500 rpm. La concentration en phosphate diammonique est de 0,2 g/L.

Nous rappelons la signification des couleurs de ces figures : la couleur jaune correspond à 0,1VVm ; la couleur grise à 0,05VVm et la couleur violette à 0,01VVm.

Des similitudes concernant les deux débits les plus faibles (0,01 et 0,05VVm) sont observables pour les productions d'éthanol ; le débit le plus élevé, quant à lui, se démarque par une concentration dans le milieu plus faible tout au long du suivi et peu variable. Les concentrations en glycérol montrent au contraire une similitude entre les deux débits les plus élevés (0,05 et 0,1VVm), la concentration en glycérol pour le débit le plus faible chute rapidement après 80 heures de culture lors de l'épuisement du glucose.

Nous pouvons distinguer sur la Figure 55 (a), pour les deux débits les plus faibles, trois phases successives: une première phase durant laquelle la concentration en éthanol ne varie pas pendant au moins 20 heures ; une phase de production d'éthanol faisant augmenter sa concentration

de 10,5 g/L et 26,7 g/L (23 et 68% d'augmentation) pour 0,05 et 0,01 VVm ; enfin une phase de consommation de 80 heures à la fin de l'étude à un peu plus de sept jours. Concernant la courbe jaune (0,1 VVm), représentant l'aération maximale testée, l'augmentation de la concentration en éthanol, après 45 heures de culture, est de seulement 6 g/L par rapport au temps initial (15% d'augmentation contre 65% pour la condition avec diffusion par anneau sous le même débit). Après une courte période de stabilisation de la concentration dans le milieu, une diminution assez lente apparaît jusque la fin du suivi après environ neuf jours de culture. Les consommations pour les deux débits les plus faibles sont assez proches ; elle est plus lente pour 0,1 VVm.

Lors de ces essais, comme dit dans le paragraphe 3.6.3, l'apport en air par le micro diffuseur a permis un transfert du dioxygène à la levure bien meilleur que celui assuré le diffuseur annulaire pour un débit identique, conduisant ainsi à augmenter la part de respiration durant la croissance de la levure.

La productivité en éthanol obtenue est de 0,014 ; 0,004 ; 0,007 gramme d'éthanol par gramme de glucose et par heure jusqu'à l'épuisement du glucose (rendements respectifs en éthanol de 0,36 ; 0,12 ; 0,18 g/g glucose) correspondant à une production de l'éthanol de l'ordre 0,19 ; 0,07 ; 0,09 gramme d'éthanol par gramme de poids sec et par heure, pour les débits de 0,01 ; 0,05 et 0,1 VVm. Le fait d'avoir aéré la culture à ces différents débits par le micro diffuseur, a diminué la vitesse spécifique de production d'éthanol de 46 et 31 % aux débits respectifs de 0,05 et 0,1 VVm, par rapport à la condition avec un simple balayage de l'air de la tête de cuve. Par contre pour le débit de 0,01 VVm la vitesse spécifique de production d'éthanol a augmenté de 46 % pour un rendement moindre (0,32 contre 0,40 g etOH/g glc), ceci semble être dû à une vitesse de production par rapport au glucose bien plus élevée. Ces résultats sont en accord avec une augmentation de la proportion de respiration en allant du débit 0,01 au débit 0,05 VVm, les deux conditions 0,05 et 0,1 VVm donnant à peu près les mêmes chiffres.

Le suivi de la concentration en glycérol (Figure 55 (b)) montre une période de latence durant laquelle le glycérol n'est que très peu produit, identique pour les trois conditions d'aération et plus courte que celle de la production d'éthanol (6 contre 20 heures). On observe ensuite une augmentation de la concentration en glycérol d'environ 2,5 g/L à 4,32 ; 4,9 et 5,3 g/L pour 0,01 ; 0,05 et 0,1 VVm, en 65 heures de culture pour les deux plus faibles débits et 95 heures pour 0,1 VVm. Il s'en suit une stabilisation jusqu'à la fin de l'étude pour les débits les plus faibles par opposition à la consommation du glycérol observé pour le plus faible débit, faisant passer sa concentration de 4,3 à 1,8 g/L. Nous trouvons que pour les deux meilleures conditions d'aération la consommation du glycérol est négligeable, contrairement au débit 0,01 VVm où le glycérol est consommé significativement ; les résultats obtenus dans ce dernier cas sont identiques à ceux du diffuseur annulaire. Par contre il n'y a pas de consommation pour le balayage ce qui semble peu cohérent ; les différences de comportement du glycérol ne semblent donc pas liées à l'efficacité de l'aération.

### **3.7.5. Condition micro diffuseur (0,02 VVm ; 295rpm)**

Dans le paragraphe précédent, nous avons montré l'intérêt de l'utilisation du micro diffuseur par rapport au balayage de tête de cuve et au diffuseur annulaire. Pour cette condition l'aération est intermédiaire entre celles testées dans le paragraphe précédent, à savoir 0,02 VVm et l'agitation est inférieure (295 rpm). Par contre la concentration en phosphate diammonique est de 3,2g/L.

Nous allons décrire dans ce paragraphe, les résultats obtenus lors de ces quatre essais, sur la production d'éthanol et de glycérol. Les Figure 56 (a) et (b) représentent respectivement les concentrations en éthanol et glycérol.

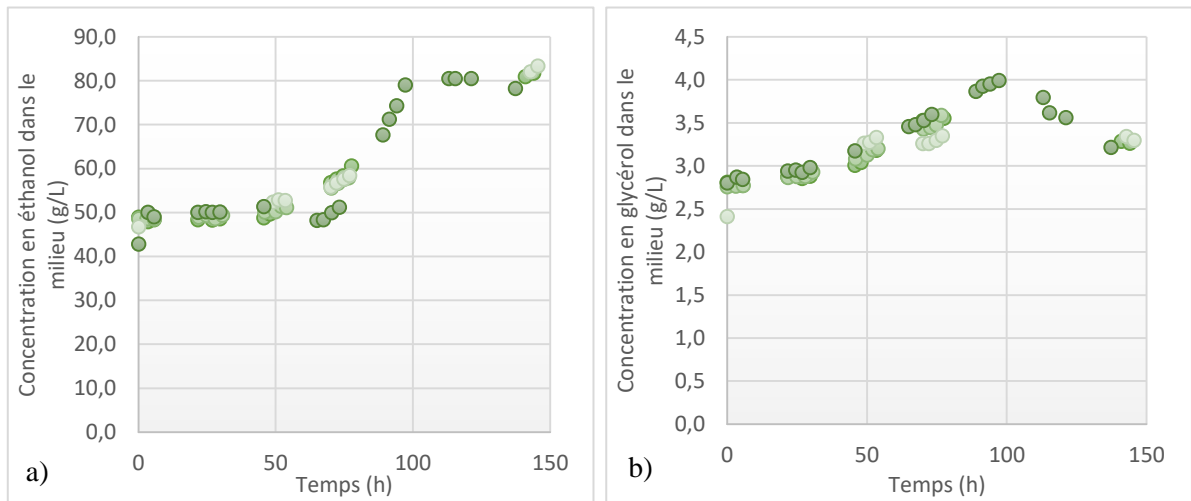


Figure 56 : Représentations cinétiques de a) la concentration de l'éthanol et b) la concentration du glycérol dans le milieu en fonction du temps, obtenues lors des 4 réplicats, suite à un bullage à l'aide d'un micro diffuseur à un débit correspondant à 0,02V<sub>Vm</sub> et une agitation du milieu à 295 rpm. La concentration en phosphate diammonique est de 3,2 g/L.

Sur cette Figure 56 (a) et (b), les profils des quatre réplicats se confondent et montrent trois phases pour la concentration en éthanol comme pour celle du glycérol, nous avons donc une bonne reproductibilité entre les quatre essais réalisés. Le suivi de la concentration en éthanol dans le milieu de culture représenté sur la Figure 56 (a), montre une longue période de 70 heures durant laquelle l'éthanol n'est pas produit, puis une production très rapide jusqu'à 97 heures (augmentation de 84% de la concentration en éthanol dans le milieu en à peine 30 heures) et enfin une phase stationnaire jusqu'à la fin de l'étude, aux environs de six jours. Pour cette condition d'aération modérée avec une agitation de 295 rpm, arrêtée à 150 heures environ, on peut penser que si l'étude avait été prolongée, on aurait certainement observé un plateau puis une légère tendance à la baisse correspondant à la consommation de l'éthanol.

La productivité en éthanol obtenue est de 0,014 gramme d'éthanol par gramme de glucose et par heure jusqu'à l'épuisement du glucose à 100 heures (rendement en éthanol de 0,43 g/g glc correspondant au maximum des rendements décrits dans la pratique, il semblerait que nous soyons donc lors de cet essai, totalement en fermentation). La vitesse spécifique de production d'éthanol est de 0,18 grammes d'éthanol par gramme de poids sec et par heure. Le fait d'avoir aéré la culture à 0,02V<sub>Vm</sub> par le micro diffuseur a comme pour le débit de 0,01 V<sub>Vm</sub>, augmenté la vitesse spécifique de production d'éthanol (+ 38 %) par rapport à la condition avec un simple balayage de l'air de la tête de cuve.

Sur la Figure 56 (b) représentant la concentration de glycérol, on observe comme lors du suivi de la croissance, une phase de latence d'au moins 6 heures durant laquelle le glycérol n'est que très peu produit puis une augmentation de la concentration en glycérol est mesurée dans le milieu de 2,9 à 4,0 g/L en 69 heures de culture suivie très rapidement d'une consommation du glycérol faisant passer sa concentration de 4,0 à 3,2 g/L en environ 40 heures. Cet instant d'arrêt de la production du

glycérol à 100 heures de culture correspond encore une fois à l'épuisement du milieu en glucose et l'arrêt de production de l'éthanol.

### 3.7.6. Condition micro diffuseur (0,1 VVm ; 295rpm faible concentration de glucose)

Dans le paragraphe 3.7.4, nous avons montré l'intérêt de l'utilisation du micro diffuseur par rapport au balayage de tête de cuve et au diffuseur annulaire. Pour cette condition, l'aération réalisée est l'aération maximale testée dans le paragraphe 3.7.4, à savoir 0,1 VVm sous une agitation plus faible de 295 rpm (contre 500 rpm auparavant) ; la concentration en glucose est bien plus faible (20 g/L contre 80 g/L dans les autres conditions).

Nous allons décrire dans ce paragraphe, les résultats obtenus lors de ces essais, sur la production d'éthanol et de glycérol. Les Figure 57 (a) et (b) représentent respectivement les concentrations en éthanol et glycérol présents dans le milieu.

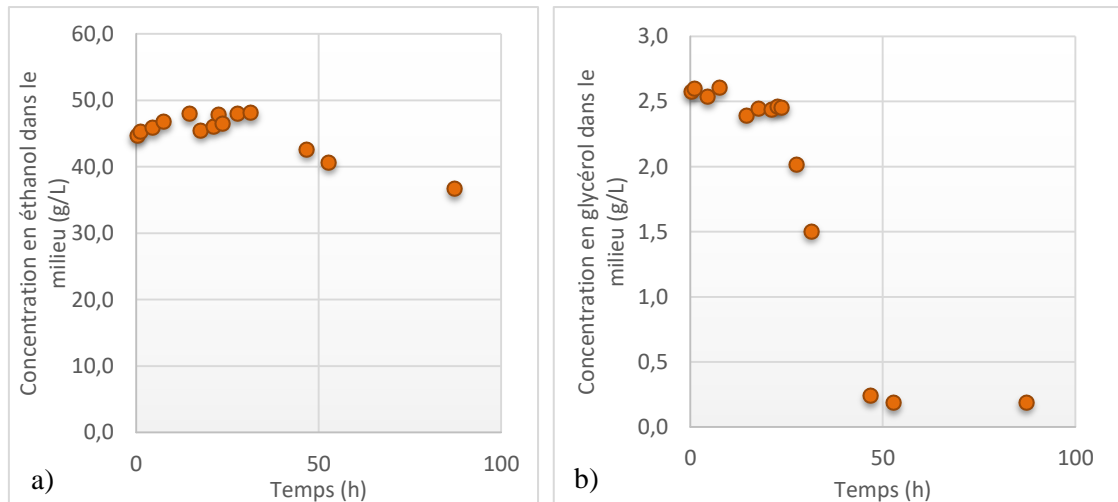


Figure 57 : Représentations cinétiques de a) la concentration de l'éthanol et b) la concentration du glycérol dans le milieu en fonction du temps, obtenues lors d'une fermentation, suite à un bullage à l'aide d'un micro diffuseur à un débit correspondant à 0,1 VVm et une agitation du milieu à 295 rpm. La concentration en phosphate diammonique est de 3,2 g/L.

Sur cette Figure 57 (a) et (b), les profils des deux répliqués se confondent et montrent trois phases pour la concentration en éthanol contre seulement deux pour celle du glycérol. Le suivi de la concentration en éthanol dans le milieu de culture représenté sur la Figure 57 (a), montre après l'inoculation, une période de légère production d'éthanol durant 7 heures (augmentation de 5 %), suivi d'une phase stationnaire d'environ 30 heures, et d'une diminution lente de sa concentration jusqu'à la fin de l'étude, aux environs de 90 heures. Pour cette condition d'aération élevée avec une agitation de 295 rpm, arrêtée à 90 heures environ, l'étude a été arrêtée à 100 h et on peut penser que la consommation de l'éthanol continue au-delà comme dans le cas des autres cultures, d'autant plus que la concentration en glycérol devient quasiment nulle. Ces résultats sont à comparer avec les essais à 0,01 VVm, une concentration de glucose de 74 g/L et une agitation de 295 rpm ; on devrait trouver un rendement d'éthanol inférieur lié à une fermentation moins importante (effet Crabtree moins marqué à cause de la plus faible concentration de glucose).

C'est bien le cas ; en effet la productivité en éthanol obtenue est de 0,007 gramme d'éthanol par gramme de glucose et par heure entre 6 et 23 heures, moment d'épuisement du glucose (rendement en éthanol de seulement 0,12 g/g glc) correspondant à une vitesse de production spécifique d'éthanol de l'ordre de 0,015 gramme d'éthanol par gramme de poids sec et par heure.

Sur la Figure 57 (b) représentant la concentration en glycérol, on observe deux phases : une période durant laquelle il n'y a pas d'augmentation du glycérol, la concentration dans le milieu restant à 2,5 g/L jusque 23 heures ; puis une diminution rapide jusqu'à 50 heures de culture où la concentration en glycérol est proche de zéro. Cet instant de début de consommation du glycérol à 23 heures de culture correspond encore une fois à l'épuisement du milieu en glucose.

### 3.7.7. Condition micro diffuseur sur moût (0,02 VVm ; 295rpm)

Cette condition est très différente des précédentes car elle a été réalisée sur moût à une concentration en glucose initiale de 70 g/L obtenue par dilution et un apport de nutriments a été réalisé (0,2 g/L de  $ZnSO_4$  ; 0,4 g/L d'extrait de levure ; 0,3 g/L  $(NH_4)_2HPO_4$ ) avec une aération par micro diffuseur à 0,02 VVm et sous une agitation de 295 rpm. Lors de cet essai, l'inoculation choisie est de 1,3 g de LSA/L (contrairement aux précédents batchs dont l'inoculation était de 0,5 ou de 0,1 g de LSA/L) afin de reproduire l'essai réalisé en cave sur une cuve de 20 hL.

A 68 heures de culture, une vidange partielle a été réalisée et un apport en moût a été effectué afin de retrouver une concentration en glucose de 70 g/L (dilution au 3/4 par apport de moût).

Nous allons décrire dans ce paragraphe, les résultats obtenus lors de cet essai, sur la production d'éthanol et de glycérol. Les Figure 58 (a) et (b) représentent respectivement les concentrations en éthanol et glycérol.

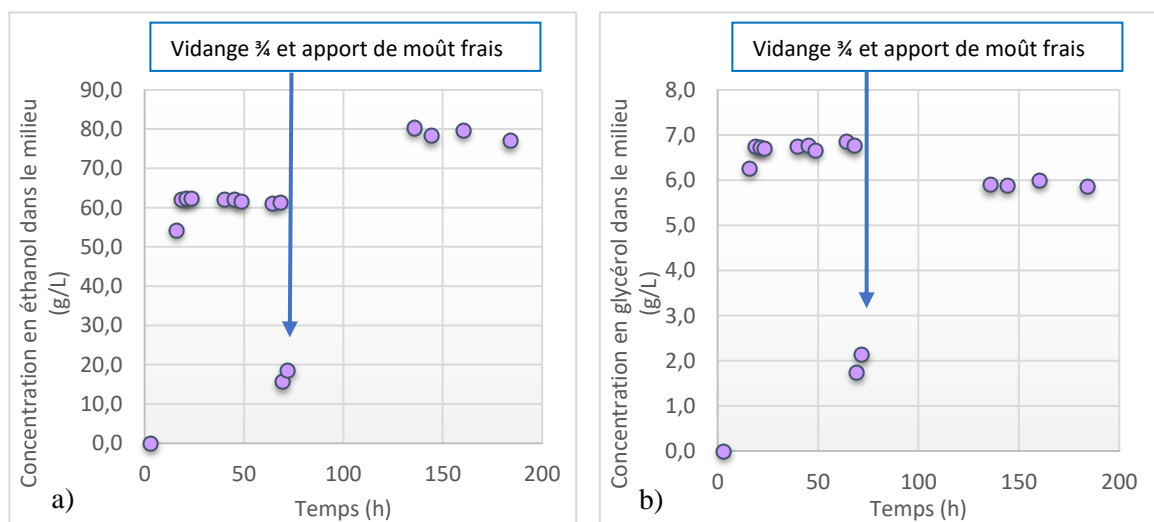


Figure 58 : Représentations cinétiques de a) la concentration de l'éthanol et b) la concentration du glycérol dans le moût en fonction du temps, obtenues lors d'une fermentation avec vidange partielle et remplissage, suite à un bullage à l'aide d'un micro diffuseur à un débit correspondant à 0,02VVm et une agitation du milieu à 295 rpm. La concentration en phosphate diammonique est de 0,3 g/L.

On peut remarquer que la concentration en éthanol (Figure 58 (a)), obtenue lors du premier batch est inférieure à celle des essais batch réalisés sur milieu contenant de l'éthanol à l'instant initial (62 g/L contre 70 environ pour les essais batch sur vin), mais cela correspond à une production très

supérieure puisque le moût ne contient pas d'éthanol au départ (62 g/L contre 30 environ pour les essais batch sur vin dilué). Lors du second batch (suite au renouvellement du milieu), on obtient une concentration finale en éthanol identique à celles des différents essais batch réalisés sur vin dilué (entre 75 et 80 g/L) bien que la concentration initiale en éthanol était bien inférieure (15,7 g/L). Le rendement en éthanol par rapport aux sucres est de 0,46 g/g sucres, en tenant compte du glucose et du fructose.

### 3.7.1. Récapitulatif

On peut donc conclure, que ce soit pour l'éthanol ou le glycérol, qu'une production est pratiquement toujours observée ; chaque élément atteint sa concentration maximale lorsque le glucose dans le milieu est épuisé. Dans un premier temps on observe une production d'éthanol et de glycérol due à la fermentation liée à l'effet Crabtree, plus ou moins importante selon la proportion de respiration et de fermentation, le rendement de production de biomasse est à ce moment-là relativement faible (0,1 g MS/g glucose, d'après Larpent (1990, p.218)). Ensuite la décroissance des produits de fermentation correspond à leur consommation par la levure pour continuer à produire de la biomasse avec un rendement plus élevé (0,6 à 0,7 g MS/g éthanol, d'après Larpent (1990, p.218)), comme le décrivent certains auteurs (Bonnet, De Kok, & Roels, 1984; Geurts, De Kok, & Roels, 1980; Raamsdonk *et al.*, 2001).

Nous représentons dans la Figure 59 les rendements de production de l'éthanol :

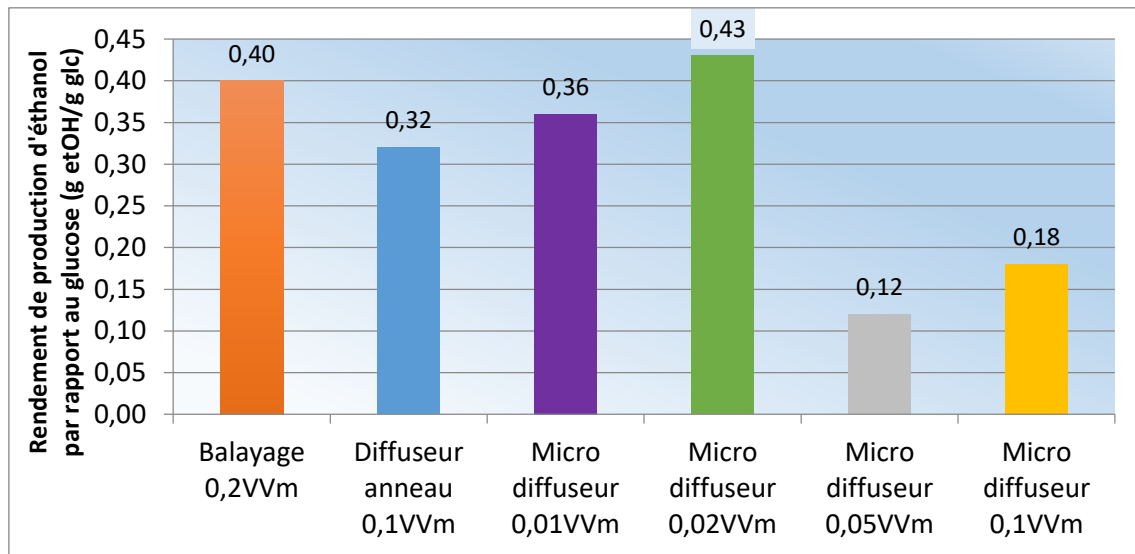


Figure 59 : Rendements d'éthanol par rapport au glucose lors de l'épuisement du glucose en fonction des différentes conditions d'aération, la concentration en glucose initiale était pour toutes, proche de 80 g/L.

Les quantités d'éthanol produit dépendent donc de la quantité mais aussi de la qualité de l'aération (taille des bulles). Elles sont sensiblement les mêmes pour le bullage par le diffuseur annulaire à 0,1 VVm et le micro diffuseur à un débit de 0,01 VVM confirmant que le micro diffuseur permet une meilleure disponibilité de l'air pour les levures ; on a des rendements proches (0,32 et 0,36 g d'éthanol par g de glucose). Pour un même débit entre le diffuseur annulaire et micro diffuseur (0,1 VVm) les vitesses spécifiques de production d'éthanol sont proches (de 0,08 et 0,09 g

etOH/gMS/h) mais des rendements de l'ordre de 0,32 contre 0,18 g d'éthanol par g de glucose. Avec le micro diffuseur à 0,05, le rendement est plus faible (0,12 g d'éthanol par g de glucose).

Quant aux conditions de balayage de tête de cuve cela semble avoir conduit à une production d'éthanol légèrement plus élevée : rendement de 0,40 g d'éthanol par g de glucose. Ceci est totalement en accord avec les suivis de la concentration d'oxygène dissous, à savoir, plus cette concentration décroît rapidement, plus le rendement en éthanol est important ; en effet la fermentation est favorisée par rapport à la respiration pour les conditions les moins aérées, ce qui conduit à une augmentation du rendement d'éthanol. Ceci est aussi en accord avec les productions de biomasse mentionnées dans la partie précédente ; plus la fermentation est prépondérante, plus le sucre est consommé pour faire de l'éthanol au détriment de la biomasse.

Dans la Figure 60, sont représentées les vitesses spécifiques de production d'éthanol.

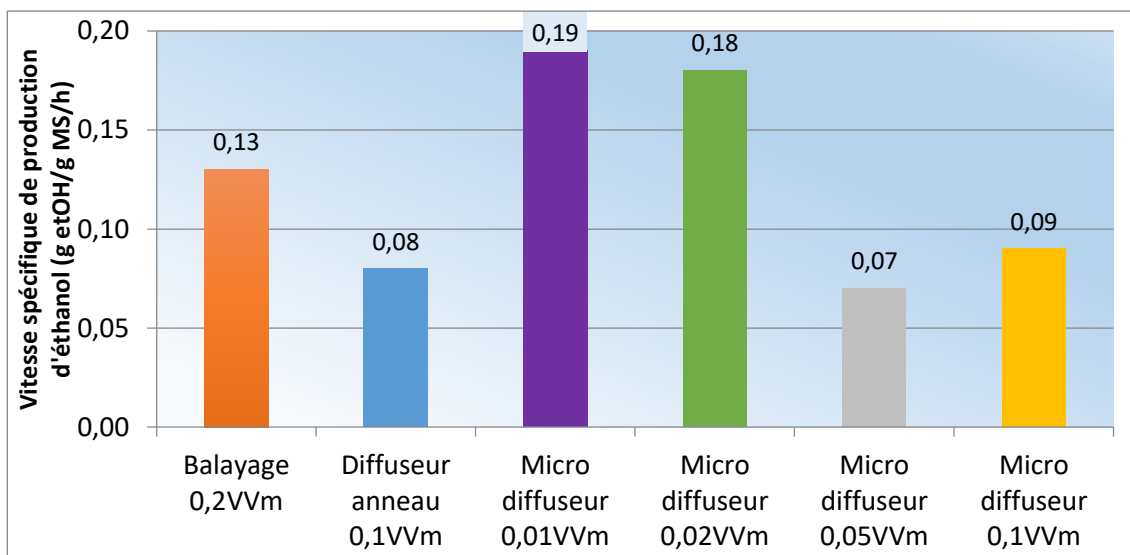


Figure 60 : Vitesses de production spécifiques d'éthanol en fonction des différentes conditions d'aération, la concentration en glucose initiale était pour toutes, proche de 80 g/L.

Concernant les vitesses, il semble se dégager un effet du débit d'aération, plus il y a d'aération et plus la vitesse est faible pour la condition d'aération par micro diffuseur. Pour les vitesses de production plus basses dans les conditions de balayage de l'air de la tête de cuve et par diffuseur annulaire, cela est difficilement explicable car nous avons montré que ces aérations étaient moins efficaces, laissant penser que le métabolisme fermentaire serait favorisé.

### 3.8. Vitesse spécifique de croissance

Lors de la phase exponentielle en mode batch, la vitesse spécifique de croissance maximale atteinte par la levure est de 0,059 à 0,075 h<sup>-1</sup>, correspondant à environ 12 h de temps de doublement. Elle est calculée en portant le logarithme népérien de l'absorbance en fonction du temps, la pente de la droite obtenue est égale à la vitesse de croissance (Annexe 3 : Détermination des vitesses spécifiques de croissance en réacteur batch). Celle-ci est très faible au vu des données de la littérature qui mentionnent une valeur de 0,4 h<sup>-1</sup> mais 0,15 h<sup>-1</sup> lors de l'oxydation de l'éthanol (Larpen, 1990).



L'aération du milieu pourrait laisser penser que la levure peut utiliser un métabolisme respiratoire, malgré la composition du milieu, relativement riche en glucose (environ 80 g/L) mais l'effet Crabtree d'un côté, et la concentration en éthanol élevée de l'autre (environ 50 g/L au départ) ralentissent grandement la croissance. Le fait d'utiliser un milieu hydro-alcoolique est certainement la principale cause de ce ralentissement.

### 3.9. Détermination de la part de respiration et de fermentation dans les essais batch entre l'instant initial et celui où le glucose est épuisé

Pour estimer cette proportion, nous allons calculer la quantité de glucose consommé par fermentation  $\Delta G_{\text{ferm}}$  (g/L), à partir de la quantité d'éthanol produit  $\Delta E$  (g/L) et du rendement correspondant (0,51 g éthanol/g glucose consommé).

$$\text{Il vient donc : } \Delta G_{\text{ferm}} = 1,96 \Delta E$$

Par ailleurs en exploitant les résultats expérimentaux nous avons montré qu'il existait une relation linéaire entre la quantité d'éthanol produit  $\Delta E$  et la quantité totale de glucose consommé  $\Delta G_{\text{total}}$  :  $\Delta G_{\text{total}} = \alpha \Delta E$  (voir Annexe 5 : Détermination des rendements éthanol à partir du glucose).

Le pourcentage de fermentation est donc égal à  $\Delta G_{\text{ferm}} / \Delta G_{\text{total}}$ , soit  $1,96 / \alpha$ .

On trouve donc les valeurs reportées dans le Tableau 8 :

Conditions	Proportion de fermentation (%)
Balayage 0,2VVm 80 g/L de glucose	79
Diffuseur anneau 0,1VVm 80 g/L de glucose	75
Micro diffuseur 0,1VVm 80 g/L de glucose	Inexploitable (diminution de la concentration en éthanol)
Micro diffuseur 0,05VVm 80 g/L de glucose	58
Micro diffuseur 0,02VVm 80 g/L de glucose	84
Micro diffuseur 0,01VVm 80 g/L de glucose	83
Micro diffuseur 0,1VVm 20 g/L de glucose	29

Tableau 8 : Proportion de fermentation par rapport à la respiration lors des différentes conditions d'aération.

On constate qu'en batch, la proportion de la fermentation est importante par rapport à la respiration, par suite de l'effet Crabtree, pour les conditions avec faible aération. Pour les plus fortes aérations la proportion de fermentation diminue en toute logique. Ceci est dû aux fortes concentrations de glucose dans le milieu de culture.

Pour augmenter la production de biomasse, suite à ces observations, il faut se placer dans des conditions privilégiant la respiration, nous devons commencer à réfléchir à la mise en place d'un procédé fed-batch qui permet de maintenir la concentration de glucose à une valeur faible.

### 3.10. Conclusion

L'apport d'oxygène favorise la respiration et donc la production de l'énergie, de la biosynthèse des stérols et de leurs dérivés nécessaire à la multiplication de la biomasse ; il est connu que la biosynthèse des stérols et de leurs dérivés nécessite de l'oxygène moléculaire (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Vue la teneur moyenne de *S. cerevisiae* en stérols totaux, 23 à 55% de la masse des lipides totaux (4 à 9% de lipides par g de matière sèche (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006)), la croissance des levures demande une quantité importante d'oxygène. Notons que la teneur en lipides totaux et en stérols augmente significativement quand la levure est cultivée en présence de fortes concentrations en glucose ou en éthanol (Fornairon-Bonnefond, Demaretz, Rosenfeld, & Salmon, 2002; Lallemand<sup>TM</sup>, 2006). En absence d'oxygène, on assiste aussi à une production plus importante de glycérol pour régénérer le NADH nécessaire à la fermentation.

Le Tableau 9 regroupe les rendements et productivités obtenus lors des différentes conditions d'aération, concentrations en glucose et phosphate diammonique initiales en essais batch.

Conditions	Rendements proportion de gramme poids sec par gramme de glucose (%)	Productivité (millions de levures viables par litre et par heure)
<b>Balayage 0,2VVm 80 g/L de glucose</b>	4,8	799
<b>Diffuseur anneau 0,1VVm 80 g/L de glucose</b>	6,9	1935
<b>Micro diffuseur 0,1VVm 80 g/L de glucose</b>	7,7	411
<b>Micro diffuseur 0,05VVm 80 g/L de glucose</b>	6,2	372
<b>Micro diffuseur 0,02VVm 80 g/L de glucose</b>	3,9	1158
<b>Micro diffuseur 0,01VVm 80 g/L de glucose</b>	6,8	2508
<b>Micro diffuseur 0,1VVm 20 g/L de glucose</b>	17,0	3019

Tableau 9 : Récapitulatif des rendements et productivités obtenus lors des différentes conditions d'aération et concentrations en glucose et phosphate diammonique initiales en batch.

Un effet de la concentration en glucose ressort très distinctement des rendements obtenus : plus la concentration initiale est faible, meilleur est le rendement de conversion en biomasse. L'aération est primordiale pour un bon rendement car elle permet de privilégier le métabolisme respiratoire. Le fait d'avoir de l'éthanol à l'instant initial joue aussi sur le rendement, mais de façon moins prononcée.

Habituellement pour réaliser une vinification de moût, un levurage est réalisé. Cela consiste à introduire massivement dans le moût une souche sélectionnée pour ses aptitudes fermentaires. Cette opération vise à assurer une meilleure maîtrise de la fermentation alcoolique et à prévenir d'éventuelles déviations organoleptiques. Ce levurage peut être réalisé à partir d'une LSA réhydratée dont l'usage s'est très largement répandu du fait de sa simplicité, mais dont le coût reste élevé (2 €/hL environ), ou bien à partir d'un levain fabriqué en cave à partir d'une quantité de LSA beaucoup

moins importante qu'on laissera se multiplier et qui sera ensuite répartie dans différentes cuves de vinification. Cette opération qui consiste à reproduire les propagations que nous avons décrites dans cette partie 3. Etude en bioréacteur batch, demande une rigueur et une organisation préalable afin d'avoir le temps de multiplier la levure avant l'ensemencement des différentes cuves, nous obtenions un maximum de population de 400 millions de levures par millilitre lors de nos propagations à 170 heures environ et lors de la diminution de la concentration initiale en glucose, 300 millions de levures par millilitre à 95 heures environ. C'est en partant de ce constat que nous avons cherché à simplifier la mise en œuvre en développant un procédé de type fed-batch plus simple pour l'utilisateur et qui est décrit comme donnant une meilleure productivité.

Les avis restent néanmoins partagés en matière d'ensemencement. Poulard (2008) admet que lors de la seconde fermentation il est possible d'inoculer avec une concentration d'un million de cellules par millilitre et que l'inoculation d'un moût peut se concevoir à raison de un à trois millions de cellules par millilitre, à condition que la population inoculée soit 10 fois supérieure à la population indigène présente. Fugelsang and Edwards (2007) et Lonvaud *et al.* (2010), quant à eux, préconisent un inoculum initial de l'ordre de quatre à huit millions de cellules par millilitre sans conditions particulières.

## **4. Production de levure en bioréacteur alimenté (fed-batch)**

### **4.1. Optimisation de la phase de démarrage**

Il est connu que la croissance de la levure et notamment son acclimatation en milieu hydro-alcoolique sont difficiles. Avant de démarrer le procédé de culture fed-batch, une première phase de type batch est réalisée, suivie de la mise en route de l'ajout continu de milieu, conduisant à un mode dit continu. La période de batch doit permettre la croissance du micro-organisme sans stress environnemental, dans des conditions optimales de pH, d'aération, de température et de pression.

Les essais en fioles Erlenmeyer réalisés précédemment ont permis de définir des conditions optimales de réhydratation et de démarrage du procédé pour la croissance de la levure. Les expérimentations réalisées ensuite à l'aide du bioréacteur en culture de type batch ont principalement permis de statuer sur l'aération à effectuer, tout en restant proche des conditions d'agitation industrielle existant chez les partenaires d'Œno Concept et ainsi pouvoir comparer nos résultats avec les résultats industriels, notamment en terme de productivité de biomasse.

### **4.2. Procédé mis en œuvre pour la production de micro-organismes**

Une culture discontinue alimentée est une opération semi-continue dans laquelle les éléments nutritifs nécessaires à la croissance cellulaire et la formation de produits (sources de carbone, d'azote, les phosphates...) sont apportés de manière intermittente ou continue par l'intermédiaire d'un ou plusieurs flux d'alimentation. Par conséquent, il y a augmentation du volume de la culture jusqu'à ce que le volume soit maximum. Le débit d'alimentation peut être variable pour maintenir un niveau de concentration des nutriments constant dans le bioréacteur ou fixe, calculé pour donner des conditions optimales. Une fois le volume maximal atteint, le bioréacteur fonctionne en mode batch pour finaliser la production.

La culture est récoltée habituellement seulement à la fin de la période d'exploitation, que ce soit entièrement ou partiellement (le reste servant d'inoculum pour la prochaine culture). Ce processus peut être répété un grand nombre de fois si les cellules sont pleinement viables et productives.

Dans notre cas nous introduisons le vin enrichi en glucose en mode fed batch de façon à maintenir la concentration de glucose dans le réacteur à une valeur très basse afin d'éviter l'effet Crabtree et n'avoir ainsi que de la respiration au cours de la culture.

### 4.3. Nouveau procédé de culture

#### 4.3.1. Description de la stratégie développée

Il est souvent mentionné que les réactions biologiques ont des vitesses plus lentes et des effets thermiques faibles en comparaison des réactions chimiques. C'est pourquoi bien souvent une double enveloppe suffit à réguler la température du milieu de croissance. L'échange de chaleur se fait au niveau de la paroi de la cuve entre le liquide contenu dans la cuve et le liquide dans la double enveloppe (Riba, 1998).

Lors de la croissance de la levure à l'intérieur du bioréacteur, un dégagement de chaleur se produit. La calorimétrie semble un bon outil de surveillance et de contrôle des fermentations de micro-organismes (Larsson, Lidh, Blomberg, Niklasson, & Gustafsson, 1993). Son principal avantage est la généralité de ce phénomène, la croissance de micro-organismes étant toujours accompagnée par une production de chaleur, et les mesures sont effectuées en continu par une simple sonde de température (fiable et peu coûteuse) sans introduire de perturbations dans la culture. De plus, le taux de production de chaleur peut être stœchiométriquement relié au taux de consommation du substrat et au taux de production des produits, notamment la formation de biomasse, (dans de nombreux cas, il peut être corrélé grâce à une analyse des gaz en sortie).

Nous nous sommes donc dirigés vers une mesure de cette augmentation de température afin de la relier à la croissance de la levure et ainsi apporter les nutriments nécessaires en quantité adéquate. Le procédé vise à réguler l'augmentation de température suite au dégagement de cette chaleur sans l'utilisation de la double enveloppe, il a été développé avec succès pour contrôler l'apport des substrats au meilleur moment durant la croissance aérobies de *Saccharomyces cerevisiae* avec du glucose comme source de carbone et d'énergie. En présence de ce substrat, la levure présente une croissance diauxique en consommant initialement le glucose avec production concomitante d'une faible quantité d'éthanol et de glycérol puis, une fois le glucose épuisé, en utilisant l'éthanol et le glycérol produit, comme source d'énergie. La calorimétrie peut ensuite être utilisée pour contrôler la vitesse d'alimentation de telle sorte que la production de biomasse soit à son maximum et par ailleurs que la formation d'éthanol soit limitée.

## Résultats et discussion

Il est possible de faire fonctionner un réacteur en maintenant sa température dans une plage fixée, par ajout de réactifs froids et ainsi de contrôler les paramètres réactionnels (Szeifert, Chovan, & Nagy, 1995). Bien que l'étude ait été réalisée dans un réacteur chimique, les concepts peuvent être certainement étendus à notre processus de production de biomasse.

Etant parti du constat que la croissance des levures est une réaction exothermique, nous avons donc décidé d'utiliser ce dégagement de chaleur comme paramètre de suivi pour l'apport de nutriments au moment optimal de la croissance. Pour mettre en œuvre ce procédé, deux cuves d'une contenance de cinq litres ont été réalisées par Ceno Concept, la société partenaire de ce projet, l'une servant de bioréacteur dans lequel se déroulera la croissance des micro-organismes, l'autre servant de stockage de milieu refroidi qui en fonction de la consigne refroidira la culture par l'alimentation et apportera les nutriments.

La Figure 61 montre le schéma du dispositif utilisé pour réaliser ces essais de croissance en mode fed-batch.

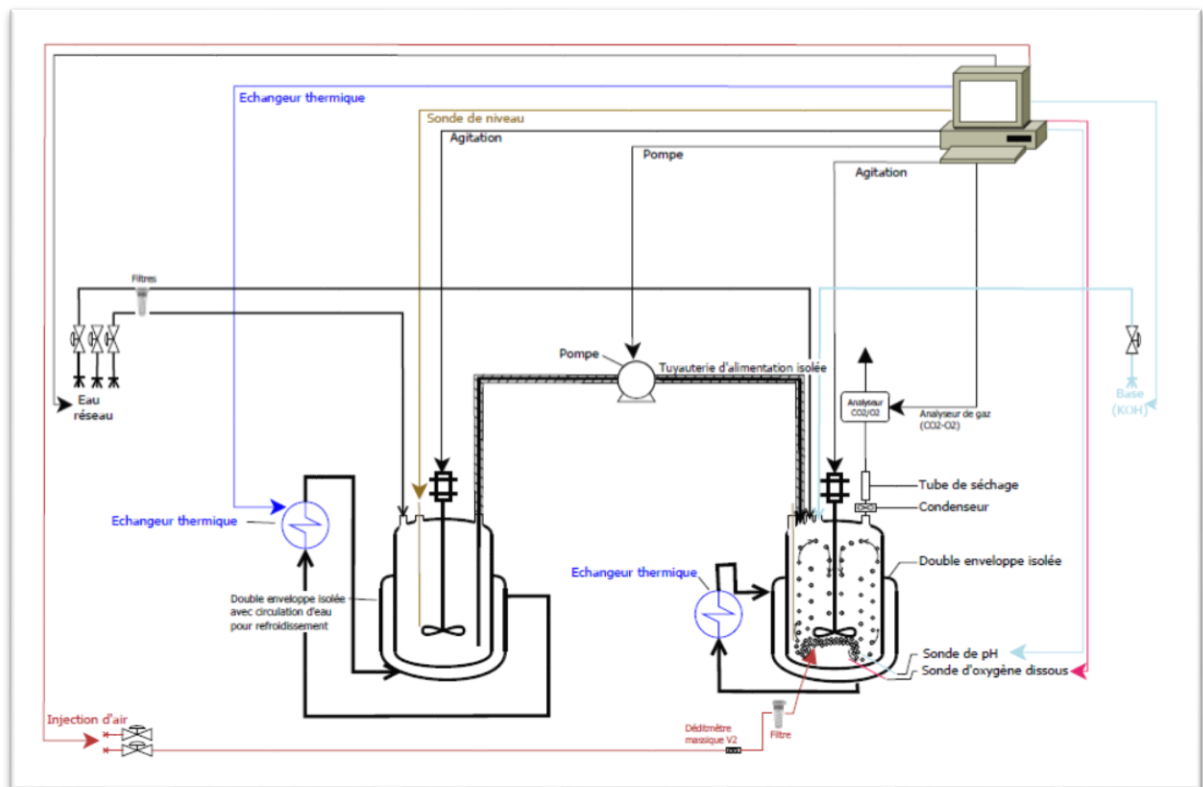


Figure 61 : Schéma du dispositif utilisé lors des études en fed-batch, cuve de 5 litres.

La Figure 62 représentant la photo de l'installation utilisée au laboratoire lors des cultures discontinues alimentées.



*Figure 62 : Photo des bioréacteurs isolés réalisés par la société Eno Concept et le panneau de contrôle Sartorius BIOSTAT® B plus utilisés lors des expériences en fed-batch*

Le procédé de contrôle de la température développé lors de ce projet permet simultanément d'apporter les nutriments nécessaires à la croissance et de refroidir le milieu de croissance sans échange thermique par l'intermédiaire de la double enveloppe. C'est un procédé dans lequel :

- on inocule le milieu de culture à une température de 28°C avec les levures à une concentration de 2 g de LSA/L contrairement aux essais batch dont l'inoculation était de 0,5 g de LSA/L ;
- on permet à la croissance (réaction exothermique) d'avoir lieu dans le milieu de culture ;
- on mesure par une simple sonde de température, une variation de la température due à la réaction exothermique ;
- on ajoute progressivement au milieu réactionnel, au cours de la croissance, l'alimentation comprenant les nutriments et servant simultanément à refroidir la culture ;

Grâce à cette alimentation progressive, on maintient, dans le milieu réactionnel, une température sensiblement constante. En contrôlant l'alimentation de cette source externe, la température de cette dernière étant apte à compenser la variation de la température due à la réaction exothermique cela permet un bon contrôle de la consigne de température et une croissance optimale de la levure qui reçoit les nutriments au moment opportun.

Ce dispositif et son utilisation dans le contrôle d'une production biologique ont fait l'objet d'un dépôt de brevet par nos soins (EP3095852(A1), 2016).

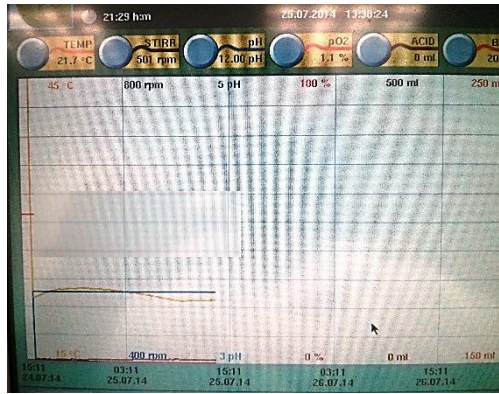


Figure 63 : Photo du panneau de contrôle du bioréacteur montrant la relative stabilité de la température (courbe jaune) malgré l'agitation mécanique, représentée par la courbe bleue et l'aération.

### 4.3.2. Etude de la chaleur dégagée par l'agitation mécanique

Le procédé développé étant basé sur la mesure de très faibles variations de température lors de la croissance de la levure dans le milieu de culture, nous nous sommes tout d'abord assuré de façon expérimentale que l'élévation de la température mesurée lors des croissances en batch n'était pas la conséquence d'un transfert thermique entre l'arbre d'agitation relié au moteur et le milieu de culture. Pour cela nous avons simplement réalisé un essai sans inoculation avec quatre litres de milieu de culture dans la cuve du bioréacteur sous une agitation de 500 rpm et une aération de 0,05 VVm et en ayant pris soin de vider la double enveloppe de son eau afin de limiter les échanges thermiques.

Lors de ce suivi, la température est restée stable comme le montre la photo de l'enregistrement du panneau de contrôle (Figure 63), ceci bien-sûr sans régulation de la température par l'intermédiaire de la double enveloppe.

Malgré la médiocre qualité de la photo (Figure 63) nous pouvons observer sur le bas de l'écran, au-dessus puis en-dessous de la courbe bleue représentant la vitesse d'agitation en fonction du temps, la courbe jaune représentant, quant à elle, la température qui oscille entre 23 et 21,7 °C suivant la température ambiante de la pièce dans laquelle se trouve la cuve sur une période de 20 heures. L'agitation mécanique et l'aération ne génèrent donc pas d'échauffement significatif.

L'augmentation de la température déclenchant la circulation d'eau dans la double enveloppe lors des différents essais en batch n'est pas liée à l'agitation mécanique ou à l'aération mais est bien la conséquence de l'activité des levures et de la chaleur qu'elles dégagent lors de leur croissance. Nous avons donc travaillé à l'optimisation de l'apport pour contrôler l'activité biologique de telle sorte que la production de biomasse soit à son maximum tout en évitant la formation d'éthanol.

Un bilan thermique global peut être écrit entre le début et la fin des essais fed batch :

$$m_{\text{glc}} \Delta H = (V_f - V_i) C_p (T_r - T_a) ,$$

$V_f$  étant le volume final et  $V_i$  celui initial en L,  $C_p$  la capacité thermique massique ( $\text{J.kg}^{-1}.\text{K}^{-1}$ ),  $T_r$  est la température dans le réacteur de propagation et  $T_a$  celle du milieu ajouté. Enfin  $m_{\text{glc}}$  est la masse de glucose consommé.

### 4.3.3. Corrélations entre poids sec, absorbance et concentration cellulaire

De la même façon que pour les essais batch, des corrélations sont réalisées pour les différentes cultures réalisées, confirmant la possibilité de suivre la biomasse par l'absorbance, le poids sec ou le comptage cellulaire (Tableau 10). Ces corrélations sont proches de celles obtenues en batch et proches entre elles, les poids cellulaires sont donnés avec une erreur de 20% environ.

Fed-batch	Concentrations en glucose / éthanol (g/L)		Corrélation poids sec (g/L) vs abs	Corrélation concentration cellulaire (cell/L) vs abs	Poids moyen d'une cellule (pg)
	initial es	de l'aliment ation			
<b>Fed-batch « 2 »</b>	9,9 / 51,2	94,1 / 53,1	= 0,35 Abs + 1,00	= 1,31 10 <sup>10</sup> Abs	26,7
<b>Fed-batch « 4 »</b>	9,8 / 51,1	94,1 / 53,1	= 0,41 Abs + 1,00	= 8,32 10 <sup>9</sup> Abs	49,2
<b>Fed-batch « 10 »</b>	5 / 51,2	9,8 / 53,1	= 0,35 Abs + 1,00	= 1,64 10 <sup>10</sup> Abs	21,0
<b>Fed-batch « 11 »</b>	9,8 / 51,1	49,8 / 53,1	= 0,37 Abs + 1,00	= 1,06 10 <sup>10</sup> Abs	34,9
<b>Fed-batch « 12 »</b>	5,1 / 51,1	23,0 / 53,1	= 0,31 Abs + 1,00	= 1,17 10 <sup>10</sup> Abs	26,5

Tableau 10 : Corrélations des principaux essais réalisés en fed-batch.

Les valeurs données pour le poids cellulaire sont des valeurs moyennes sur toute la durée de la culture ; il est difficile de se prononcer sur d'éventuelles différences en fonction des cultures, les poids cellulaires étant du même ordre de grandeur. Toutefois en regardant plus précisément les variations au cours du temps, on constate que généralement le poids cellulaire augmente au cours de la culture.

D'après les corrélations de fed-batch « 4 », plus on avance dans le temps et moins il faut de levure pour faire 1 g/L de poids sec donc il semblerait qu'à la fin elles soient de plus en plus lourdes. Nous retrouvons ces résultats pour le deuxième essai, il en faut en début d'alimentation (jusque 50 h) environ  $6 \cdot 10^{11}$  cellules puis à partir de 50 h seulement  $1 \cdot 10^{11}$  cellules pour faire 1 g/L ; idem pour l'essai « 10 » dans lequel il en faut  $9 \cdot 10^{11}$  jusque 50 h, puis à partir de 98h seulement  $2 \cdot 10^{11}$  cellules.

Il semble y avoir une hétérogénéité de la population de levures au cours de la croissance. En effet, en phase stationnaire, après carence en glucose, M. Cot (2006) relate qu'Allen *et al.* (2006) identifient deux populations qu'ils arrivent à séparer. L'une est composée de cellules quiescentes, plus denses car elles accumuleraient du glycogène et seraient les cellules filles (sans cicatrice pour 91 %) et l'autre de cellules non-quiescentes.



#### 4.3.4. Exemples de résultats d'essais en fed-batch alimenté par un milieu refroidi

S'agissant d'un apport de milieu, il est donc nécessaire de quantifier la variation du volume dans le réacteur au cours du temps. Le volume de culture est calculé à chaque intervalle de temps à partir de la connaissance du volume initial de culture, des volumes ajoutés des différentes solutions d'alimentation et de la solution basique permettant l'ajustement du pH et des volumes de prélèvement d'échantillon. Les solutions d'alimentation et de base sont ajoutées par des pompes péristaltiques permettant l'acquisition en ligne de l'évolution des alimentations.

La performance de ce type de procédé se caractérise d'un point de vue cinétique par la productivité et d'un point de vue plus global par la concentration finale en biomasse obtenue. Dans un premier temps est représenté, l'aspect cinétique de ces fermentations afin de donner une vue d'ensemble des différentes étapes du procédé.

Le milieu de propagation, d'un volume initial de 1200 mL, contenait différentes concentrations en glucose (5 ou 10 g/L), 3,2 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 0,2 g/L de  $\text{ZnSO}_4$ , 0,5 g/L d'extrait de levure, le milieu d'alimentation étant conservé sous agitation constante dans une cuve maintenue à 0°C. Il a été décidé de réaliser une phase durant laquelle les levures s'acclimatent et commencent à se multiplier durant 20 heures environ. En effet, d'après les résultats des différents essais batch, il s'agit de la durée minimale permettant d'observer une augmentation franche de la concentration cellulaire. Lors des différents essais batch nous avons estimé la vitesse de consommation du glucose entre 2 et 5 grammes par heure, soit entre 0,2 et 1 g/L/h durant la phase de croissance exponentielle, ce qui, d'après les concentrations initiales de ces essais conduit à un épuisement du glucose entre 5 et 20 heures après le début de la phase de croissance. C'est donc à ce moment-là que nous procédons au démarrage du procédé fed batch.

##### 4.3.4.1. Fed-batch à une concentration en glucose initiale de 10 g/L et apport de 50 g/L

Cet essai a été réalisé pour une concentration initiale de glucose dans le réacteur de 10 g/L et celle de l'alimentation de 50 g/L. Durant 15 à 20 heures aucun volume de milieu n'est apporté, la culture ne dégage pas de chaleur et par conséquent le milieu est chauffé par la double enveloppe à 26,5°C pour des raisons de problèmes techniques (branchement de la double enveloppe long et difficile). Ensuite la régulation par l'apport de milieu froid est mise en fonctionnement, le volume de milieu ajouté cumulé est représenté dans la Figure 64.

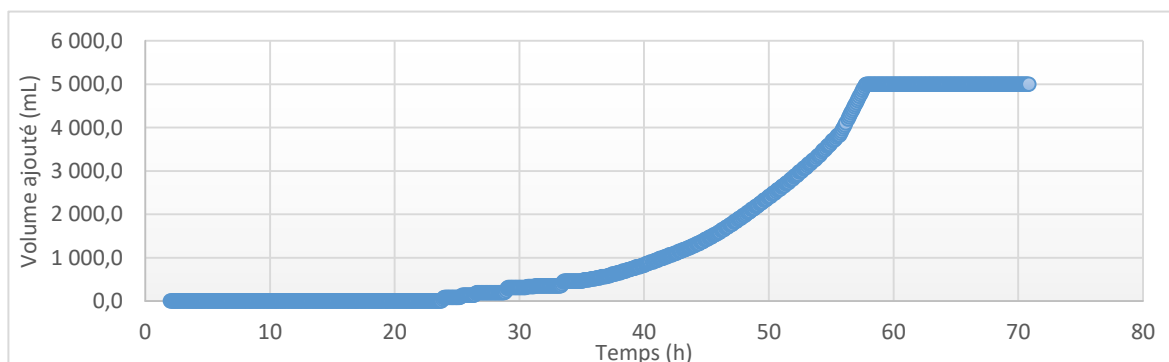


Figure 64 : Volume du milieu froid ajouté dans la cuve de propagation.

En supposant que l'apport ait été réellement corrélé avec le dégagement de chaleur lié à la croissance de la levure, en prenant la partie exponentielle de la courbe, il est possible, à partir du coefficient de la droite (Figure 65) de remonter au taux de croissance ( $\mu$ ) ainsi que de calculer le temps de doublement.

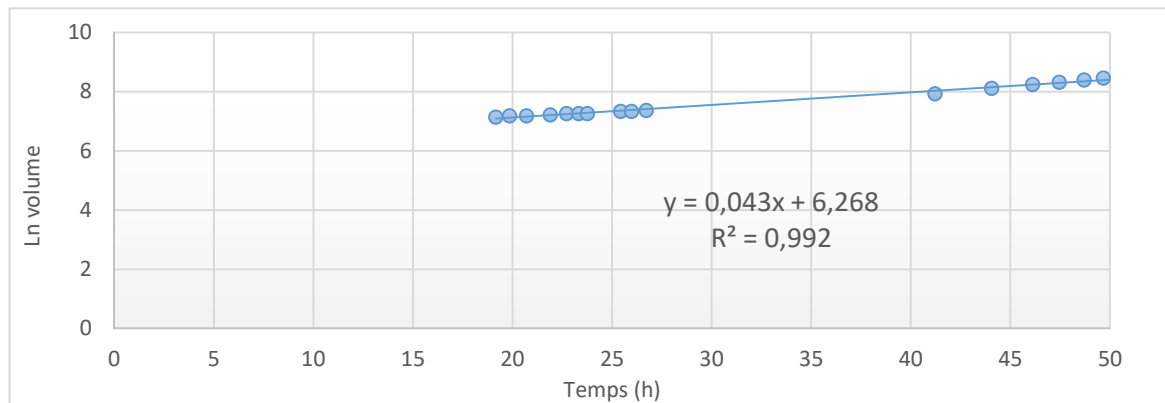


Figure 65 : Représentation logarithmique de la partie exponentielle de la courbe d'apport du milieu.

On trouve une vitesse spécifique de croissance calculée à partir de la variation du volume de l'ordre de  $0,043 \text{ h}^{-1}$  (temps de doublement de 16 h), à comparer avec les valeurs entre 0,06 et 0,07 obtenues en batch. Les valeurs sont du même ordre de grandeur.

Nous traçons dans la Figure 66 le suivi de l'absorbance totale (abs 600nm multiplié par le volume total de milieu dans la cuve), du volume de milieu dans la cuve et de la température.

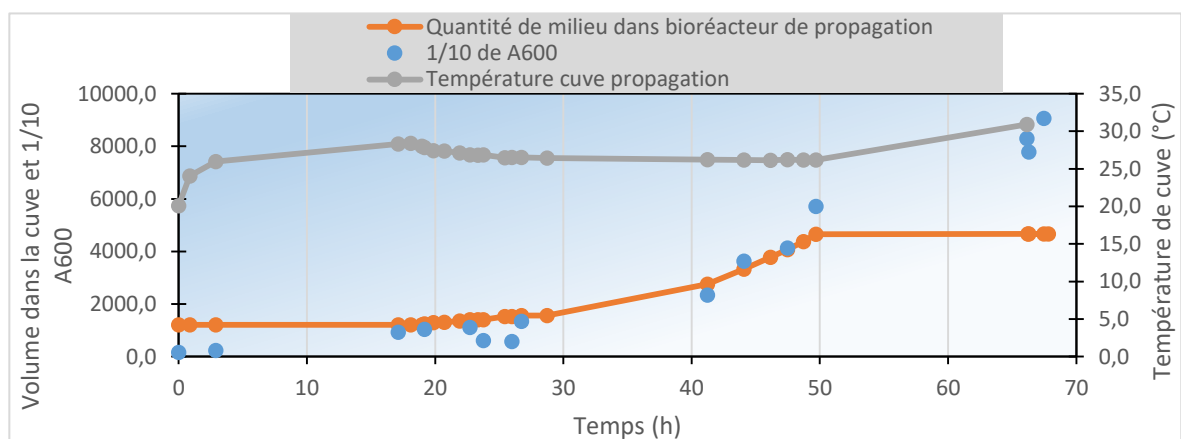


Figure 66 : Suivi de l'absorbance et de la température dans la cuve de propagation en fonction de la quantité de milieu apporté au cours du temps lors du fed-batch avec le milieu de propagation à une concentration initiale en glucose de 10 g/L et le milieu d'apport est à une concentration en glucose de 50 g/L.

Au vu de la Figure 66 l'absorbance augmente tout le temps, ce qui montre qu'on ne dilue pas le milieu et même elle semble croître plus vite que la vitesse d'alimentation à partir de 40 heures. De plus, compte tenu du volume croissant au cours de la culture, la quantité de biomasse produite augmente encore plus à partir de 40 h. La température est très proche de la consigne. Cet essai permet

## Résultats et discussion

d'obtenir une concentration de biomasse de 5,6 g/L en 66 heures et donc une productivité de 0,08 gMS/L/h.

Nous avons vérifié que la concentration de glucose restait faible et stable la plupart du temps lors de toute la culture, à environ 3 g/L.

Ceci montre que la régulation marche bien la plupart du temps. On voit très nettement après l'arrêt de l'alimentation à 50 heures de culture que la température augmente, notre apport permettait donc une régulation précise de la température. Nous pouvons aussi noter le maintien de la concentration en glucose à une valeur faible et stable.

### 4.3.4.2. Fed-batch à une concentration en glucose initiale de 5 g/L et apport de 10 g/L

Les suivis de la concentration cellulaire, de la concentration de glucose et de la température sont représentés sur les Figure 68 et Figure 67 pour un autre essai fed-batch « 10 », pour une aération par micro diffuseur à 0,1 VVM et sous une agitation de 295 rpm. Lors de cet essai la concentration en glucose initiale est de 5 g/L et le milieu d'apport à une concentration en glucose de 10 g/L.

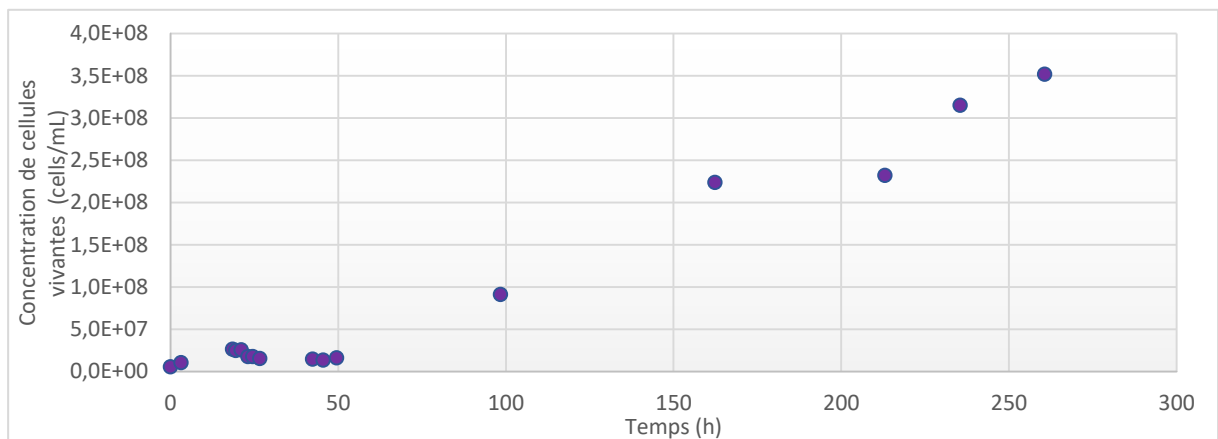


Figure 67 : Suivi des concentrations cellulaires au cours du temps lors du fed-batch avec le milieu de propagation à une concentration initiale en glucose de 5 g/L et le milieu d'apport à une concentration en glucose de 10 g/L.

La Figure 67 montre que la population diminue légèrement lors de l'apport de milieu entre 19 et 42 heures de culture, une dilution est entraînée après le début de l'alimentation, dont le débit est donc un peu trop important aux alentours des 23 heures de culture.

Dans la Figure 68 sont représentés la concentration en glucose et le maintien de la température de consigne de 26,5 °C pour les raisons techniques déjà évoquées précédemment.

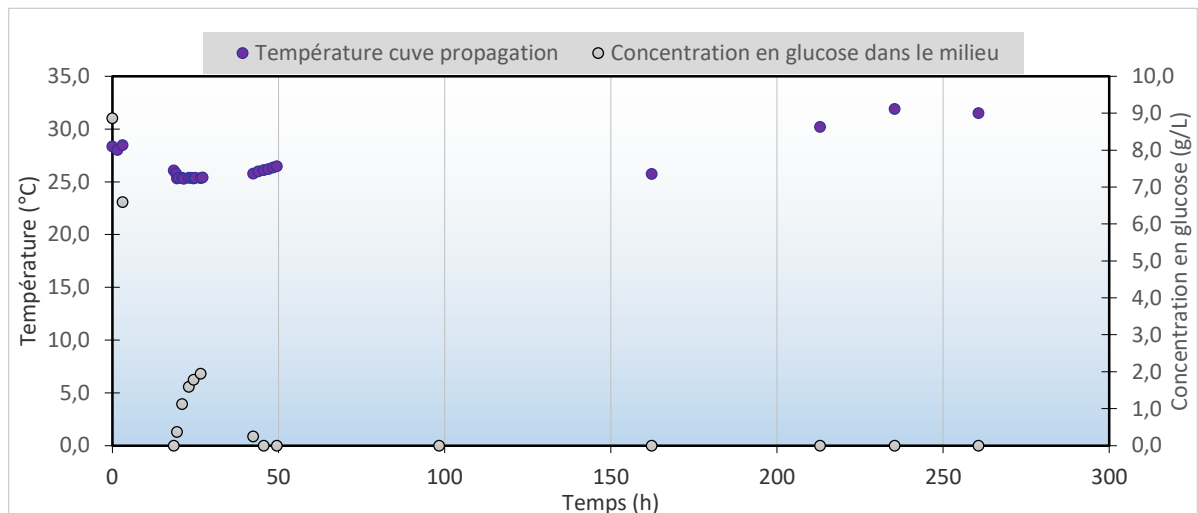


Figure 68 : Suivis de la concentration en glucose et de la température au cours du temps lors du fed-batch avec le milieu de propagation à une concentration initiale en glucose de 5 g/L et le milieu d'apport est à une concentration en glucose de 10 g/L.

La Figure 68 montre que l'alimentation n'a causé qu'une faible accumulation de sucre et a même permis une stabilisation de la concentration entre 0,2 et 2 g/L au cours de l'essai ce qui semble optimal car proche des 0,25 g/L de glucose d'après le coefficient d'affinité pour le glucose de *S. cerevisiae* qui est de 0,025 g/L (Stanbury *et al.*, 1989, p. p15).

$$\text{En suivant la cinétique de Monod } \mu = \mu_{\max} \left( \frac{S}{S + K_S} \right)$$

il vient  $\mu \cong \mu_{\max}$  pour  $S > 10 K_S$

Il vient donc  $\mu \cong \mu_{\max}$  pour [glucose] = 0,25 g/L

La température a quant à elle, été parfaitement régulée par l'alimentation.

Dans cet essai nous avons obtenu une productivité de 0,043 gMS/L/h. tout de même deux fois inférieure à celle de l'essai précédent, ce qui est cohérent avec le fait qu'ayant moins d'apport de glucose par rapport au précédent, l'effet Crabtree est moindre (teneur en glucose inférieure à 2 g/L contre 3 g/L pour l'essai précédent) donnant un rendement plus élevé en biomasse (22% contre 10), mais une vitesse de consommation de glucose nettement plus faible (1 g/L/h contre 4 environ).

Comme précédemment nous avons porté le logarithme du volume dans la partie exponentielle et trouvé une vitesse spécifique de croissance de 0,061 h<sup>-1</sup> proche de ce qui est trouvé en batch. On peut donc dire en première approximation que le dégagement de chaleur, corrélé à l'apport de milieu froid, est bien lié à la croissance de biomasse.

#### 4.3.4.3. Fed-batch à une concentration en glucose initiale de 5 g/L et apport de 25 g/L, puis différents essais de vidanges et remises en fonctionnement du procédé

Lors de cet essai où la concentration en glucose initiale est de 5 g/L et celle de l'apport 25 g/L, à une température de 28°C, nous avons cherché à simuler la future utilisation de notre procédé

## Résultats et discussion

en cuverie. Pour cela après un premier fed-batch réalisé comme lors des essais précédents, une vidange de la moitié de la cuve de propagation a été réalisée au matin de J+4 après l'inoculation et le procédé d'alimentation a été redémarré le soir. Les jours suivants, des vidanges ont été répétées de la même façon pour garder un volume de liquide dans la cuve de propagation de 2500 mL et l'alimentation a été redémarrée ensuite.

On trouvera sur la Figure 69 l'illustration de ces alimentations et vidanges ; la courbe rouge donnant le volume (mL) dans la cuve, la courbe bleue la température et les marques verts représentent la concentration cellulaire en nombre de cellules par millilitre. A J+5, nous avons testé une alimentation plus faible pour répondre à un besoin moindre en levain à J+6. A partir de J+6 l'alimentation est revenue à sa valeur initiale. A J+8 nous avons simulé un arrêt de la demande de levain (lors d'un weekend par exemple) et descendu la température de la cuve de propagation à 4°C grâce à la circulation du liquide caloporteur dans la double enveloppe. Trois jours plus tard, nous avons remonté la température de la cuve (12°C/h) à 28°C et redémarré l'alimentation après avoir de nouveau vidé la double enveloppe de son liquide.

Le suivi est représenté dans la Figure 69. A noter que lors du prélèvement et de la remise en fonctionnement de l'alimentation, la concentration en glucose dans la cuve de propagation était nulle.

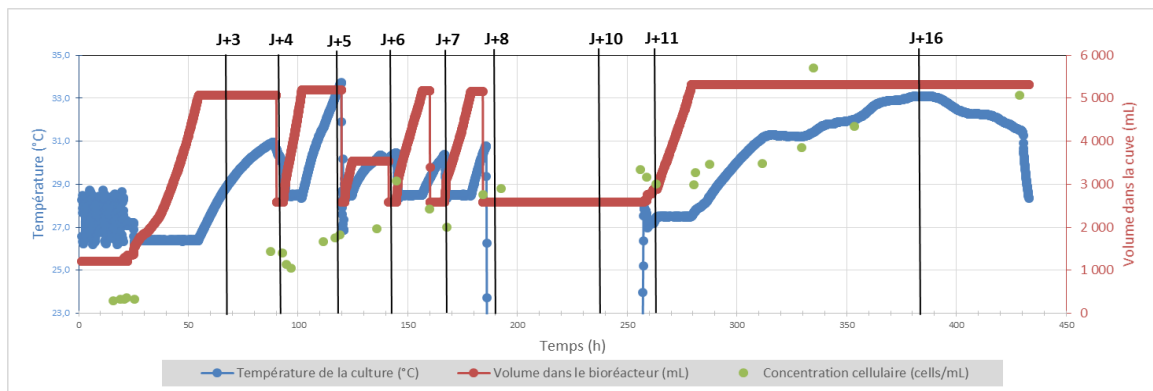


Figure 69 : Suivi du comportement d'un fed-batch durant deux semaines.

L'alimentation suffit à maintenir constante la température du milieu à la consigne (courbe bleue), malgré les prélèvements quotidiens de 50 % la population levurienne reste stable aux alentours de 450 millions de cellules par mL ou même à tendance à augmenter tout au long de l'étude. Ceci montre que la population a pu doubler en 12 h et rejoint le taux de croissance calculé précédemment pour les autres essais à partir du débit d'alimentation.

Le fait d'avoir descendu en température la cuve durant plus de deux jours n'a pas occasionné de retard de croissance lors du redémarrage, seule une diminution de la viabilité semble avoir été observée (70 % contre plus de 80 % habituellement), peut-être la conséquence du réchauffement du milieu un peu rapide.

Dans le futur, il serait bon de pouvoir réguler indifféremment la circulation du liquide dans la double enveloppe et l'alimentation par la pompe afin de réguler la température par l'intermédiaire de la double enveloppe, une fois tout le milieu envoyé et ne pas observer ces pics d'augmentation de température (variations de 4 °C environ).

## 4.3.5. Récapitulatif des divers essais

	Numéro de l'essai fed-batch	Temps final (h)	Concentration en glucose		Masse glucose consommé (g)	MS produite (g)	Rendement biomasse (g MS/g glc)	Vitesse spécifique de consommation du glucose (g glc/g MS/h)	Masse d'éthanol produit (g)
			Au Temps initial (g/L)	Alimentation (g/L)					
<b>Isolation sommaire</b>	1	117	10	94	375	34	<b>9%</b>	7,80E-04	93,6
	2	87	10	94	364	30	<b>8%</b>	9,30E-04	107,6
	4	143	10	94	368	26	<b>7%</b>	4,80E-04	76,4
	5	12	10	50	183	57	<b>31%</b>	2,10E-03	0,9
<b>Bonne isolation Cuve Oeno Concept</b>	6	142	10	50	186	38	<b>21%</b>	1,40E-03	-14,8
	7	99	10	50	212	23	<b>11%</b>	1,10E-03	6,7
	8	69	10	50	267	17	<b>6%</b>	9,10E-04	-93,8
	9	90	5	10	49	10	<b>21%</b>	2,30E-03	-33,5
	10	46	5	10	44	10	<b>22%</b>	4,80E-03	-18,3
	11	66	10	50	259	26	<b>10%</b>	2,10E-03	13,0
	12	53	5	25	100	30	<b>30%</b>	5,50E-03	7,7
	12.1	14	0	25	65	18	<b>28%</b>	2,00E-02	18,0
	12.2	5	0	25	23	9	<b>38%</b>	7,60E-02	5,6
	12.3	19	0	25	64	20	<b>31%</b>	1,60E-02	-14,0
	12.4	13	0	25	65	20	<b>32%</b>	2,40E-02	-24,4
12.5	92	0	25	65	20	<b>31%</b>	3,40E-03	-21,1	

Tableau 11 : Récapitulatif des rendements de production de biomasse et d'éthanol, ainsi que de la vitesse spécifique de consommation du glucose lors des divers essais.

On trouvera dans le Tableau 11 les résultats obtenus pour les divers essais. Les numéros des essais fed-batch avec des indices 12.1 ; 12.2 ; 12.3 ; 12.4 et 12.5 ; représentent les essais successifs réalisés à partir de la même culture suite aux prélèvements d'une partie du volume de la cuve.

Afin de déterminer les rendements de production (biomasse, éthanol) et de consommation du glucose, chaque concentration mesurée en g/L est multipliée par le volume dans la cuve de propagation à l'instant de la mesure afin d'obtenir une quantité massique (gramme).

A partir des concentrations mesurées d'éthanol et de biomasse, on peut calculer les masses totales obtenues au temps final qui correspond au moment où le volume final de liquide est atteint (de l'ordre de 5 L). Cela correspond à la fin du mode fed batch. Le volume dans la cuve est suivi dans le temps.

Les teneurs en glucose au temps final étant nulles, la quantité totale apportée (présente dans le réacteur initialement + apportée par le fed-batch) est consommée. C'est ainsi qu'on calcule le rendement biomasse/glucose.

La production d'éthanol est, elle, obtenue par différence entre la quantité totale apportée (présente dans le réacteur à l'instant initial + apportée par le fed-batch) et la quantité restante au temps final. Cette différence peut être positive dans le cas d'une production par fermentation et négative dans le cas d'une consommation de l'éthanol (pour produire de la biomasse).

Il est probable que trois phénomènes coexistent : la respiration du glucose pour donner de la biomasse, la fermentation du glucose pour donner de l'éthanol et la respiration de l'éthanol ou glycérol pour donner de la biomasse. Dans le cas où la consommation de l'éthanol (ou glycérol) l'emporte sur sa production, le rendement biomasse sur glucose est donc surestimé puisqu'une partie de la biomasse est produite à partir d'autres substrats. Il est cependant difficile de faire la part des choses.

On peut constater sur ce tableau et un certain nombre de points :

- on améliore le rendement biomasse par le procédé fed-batch, mais ce n'est flagrant que pour les essais à plus faible teneur en glucose. On constate qu'un excès de glucose diminue le rendement malgré le mode fed-batch (essais 1 à 4). Ceci est dû à une certaine accumulation du glucose, l'apport étant parfois trop important pour la consommation ; du fait de cette accumulation l'effet Crabtree se déclenche, diminuant la production de biomasse.

- certaines valeurs de production d'éthanol sont négatives montrant une consommation de l'éthanol pour produire de la biomasse. C'est le cas pour les conditions avec apport de glucose moindre ;

- les concentrations de glycérol sont toujours très faibles mais une consommation est observée pour la plupart des essais (70%) ;

- les concentrations en éthanol et glycérol pour les cuves bien isolées (6 à 13) sont plus basses que pour les cuves avec une isolation sommaire (1 à 5) ;

- le glycérol semble plus utilisé (plus tôt et plus rapidement) que l'éthanol lors de l'épuisement du glucose.

Pour les essais avec apport important de glucose, où la production d'éthanol est positive, nous supposons que la production de biomasse à partir d'éthanol est négligeable. Il reste donc

oxydation du glucose et fermentation. Pour calculer la part de chacun des deux phénomènes, on considèrera le rendement éthanol/glucose qui est de 0,51 ; à partir de l'éthanol formé on peut remonter au glucose consommé par fermentation. En calculant le rapport de cette quantité de glucose et de la quantité totale, on peut estimer le pourcentage de fermentation.

On trouve pour les essais 1 à 4 un pourcentage de fermentation de l'ordre de 50 %. Pour les autres essais, il est quasi nul ou très faible (< 10 %), ce qui est en cohérence avec le fait que plus on met de glucose, plus on a de fermentation. Le mode fed-batch ne parvient pas à éliminer la fermentation pour les conditions les plus riches en glucose dans l'alimentation. Par contre c'est le cas pour les autres conditions, montrant la supériorité de ce mode par rapport au mode batch pour privilégier la respiration.

Un essai a été fait sans apport de glucose dans l'alimentation ; il montre malgré tout une bonne production de biomasse confirmant qu'il est possible de la produire à partir de l'éthanol directement.

La Figure 70 illustre les productivités moyennes en nombre de levures par millilitre et par heure pour les divers essais réalisés en mode fed-batch.

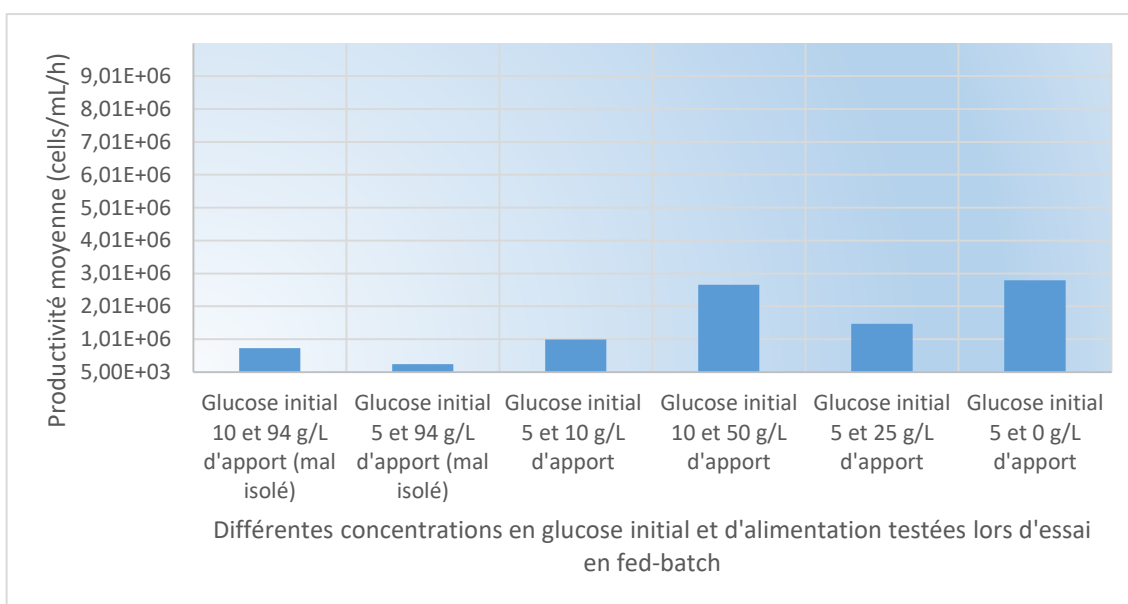


Figure 70 : Productivités moyennes de levures pour chaque essai en mode fed-batch (cells/mL/h).

A noter que pour le fed-batch avec le glucose initial 5 g/L puis 25 g/L d'apport (essai numéro 12) dont plusieurs vidanges ont été réalisées, seul la productivité sur le premier apport est représenté sur ce graphique car les suivants ayant une concentration initiale lors de la remise en route du procédé de plus en plus élevée, la productivité en est d'autant plus élevée et n'est donc pas comparable.

La productivité du fed-batch avec le glucose initial 5 g/L puis 0 g/L d'apport (essai numéro 13), semble elle aussi importante, pourtant cet essai a été réalisé avec un milieu d'alimentation conservé dans les mêmes conditions, à savoir, sous agitation constante dans une cuve maintenue à 0°C mais sans apport de glucose, seulement le vin dilué (53 g/L d'éthanol) ; 3,2 g/L de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 0,2 g/L de ZnSO<sub>4</sub> et 0,5 g/L d'extrait de levure. La consommation en éthanol et



glycérol est importante mais similaire à certains essais avec une alimentation en glucose importante.

Les productivités pour les essais réalisés avec les cuves dont l'isolation était optimale donnent des productivités moyennes supérieures à un million de cells/mL/h.

La Figure 71, montre les vitesses de production de biomasse obtenues pour chaque fed-batch pris individuellement.

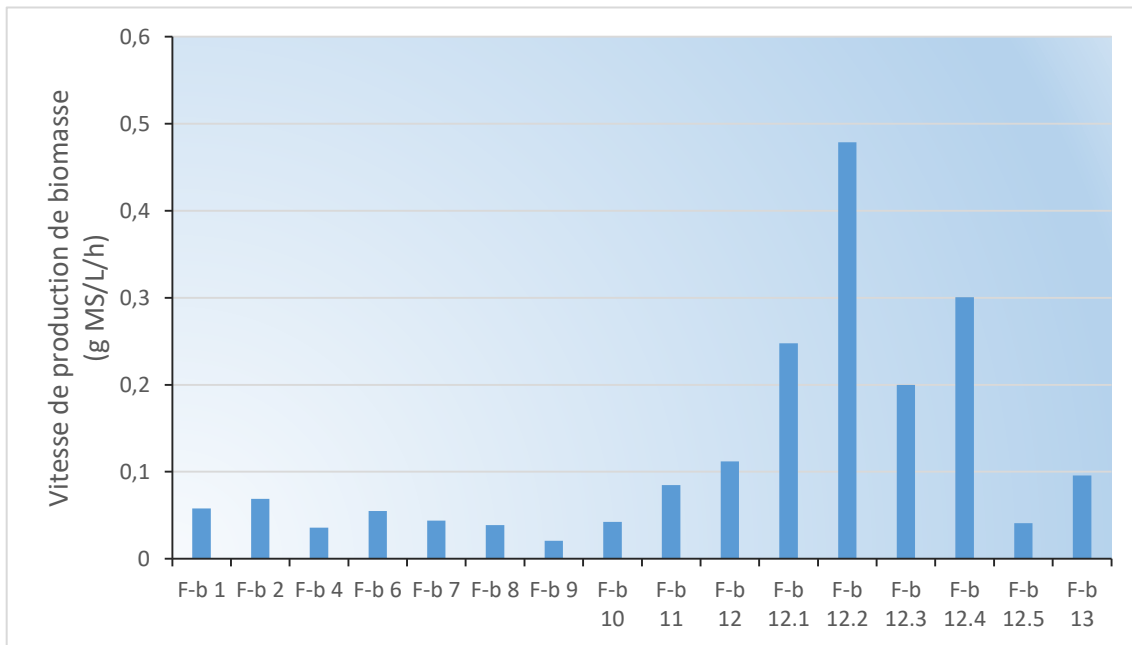


Figure 71 : Vitesse de production de biomasse pour chaque essai fed-batch « F-b ».

L'essai numéro 5 n'est pas représenté ici car les résultats ne sont pas exploitables (beaucoup de biomasse en très peu de temps ; 0,98 g MS/L/h).

Cette fois encore la dernière alimentation du fed-batch numéro 12 (12.5) montre une vitesse plus faible, certainement due au réchauffement opéré un peu rapidement suite à la baisse à 4°C du milieu sur le weekend, dont nous avons déjà relevé dans le paragraphe précédent une diminution de la viabilité. La production de biomasse a été similaire aux autres (20 g/L) mais moins rapidement.

#### 4.4. Conclusion des essais fed-batch

Le procédé fed-batch développé a bien fonctionné en augmentant le rendement de biomasse à partir du glucose à plus de 30%. Lors des différents essais, une plus grande quantité de biomasse a été obtenue grâce à l'apport progressif du glucose et certainement à la consommation du glycérol et de l'éthanol.

La concentration optimale de glucose dans le milieu de propagation à l'instant initial semble être entre 5 et 10 g/L. La concentration optimale de glucose dans le milieu d'alimentation était certainement, elle, entre 25 et 50 g/L, mais cela pourrait être amélioré car nous avons eu le temps de seulement étudier des alimentations avec 5, 10, 25, 50 et 100 g/L de glucose. Tout cela reste à optimiser.

A noter que, même lors d'une alimentation sans glucose, une croissance est observée, mais cet essai reste à confirmer. Par ailleurs, ce qui semble tout à fait logique, plus il y avait de levure dans le bioréacteur lors de la mise en marche du procédé, meilleures étaient les concentrations en fin de cultures (essais fed-batch avec des indices 12.1 ; 12.2 ; 12.3 ; 12.4 et 12.5).

Lors de la vidange de la moitié du volume de culture, une nouvelle culture avec les mêmes concentrations en levure a pu être obtenue sur douze heures. Nous pouvons en conclure que le temps de doublement est au maximum de 12 heures. Ainsi une fois estimé la quantité de levain nécessaire quotidiennement pour la cave, il suffit de disposer d'une cuve du double du volume afin de pouvoir obtenir un levain renouvelé chaque jour.

Nous faisons le calcul sur l'exemple de la coopérative COGEVI qui utilise 10 hL de ferment par jour, préparés à l'avance dans une cuve de 100 hL pour deux semaines de tirage. Avec notre cuve pilote (cf. paragraphe suivant) de 800 L vidangée chaque jour de 37,5 % du volume, on obtient la même production qu'avec la cuve de 100 hL, soit un gain de plus de 90% du volume. On produirait en effet 300 litres de levain par jour à une concentration de 200 millions de levures par millilitre (au minimum), donc 60 000 milliards de levure produites par jour. La coopérative produit ce même chiffre mais avec un volume de 1000 litres à une concentration de 60 millions de levures par millilitre.

## 5. Fed-batch pilote

Au vu des résultats encourageant, la société partenaire du projet a accepté de nous suivre et de démarrer une étude pour le dimensionnement d'un pilote de 800 litres. Nous détaillerons brièvement dans cette partie les avancements réalisés sur le dimensionnement des cuves du procédé développé. Les cuves seront sur un skid afin de faciliter son déplacement chez un viticulteur lors de futurs essais en cave.

### 5.1. Caractérisation rhéologique du milieu de culture

La viscosité est un facteur très important dans les procédés lors du développement de systèmes avec des pompes et tuyauteries car elle dimensionne la puissance nécessaire à l'agitation du milieu notamment et joue aussi un rôle non négligeable sur la capacité du milieu à retenir les gaz dissous. Elle est exprimée en Pa.s.

La Figure 72 représente les rhéogrammes du milieu de croissance seul ainsi qu'après croissance des levures. La viscosité du milieu de croissance à  $t=0$  est de 1,50 mPa.s et celle après croissance contenant 350 millions de levures par millilitre est de 1,17 mPa.s d'après les mesures faites à l'aide d'un viscosimètre à cylindre rotatif à l'Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Reims Champagne Ardenne (ICMR UMR URCA/CNRS). La viscosité ne varie pas en fonction des contraintes de cisaillement appliquées.

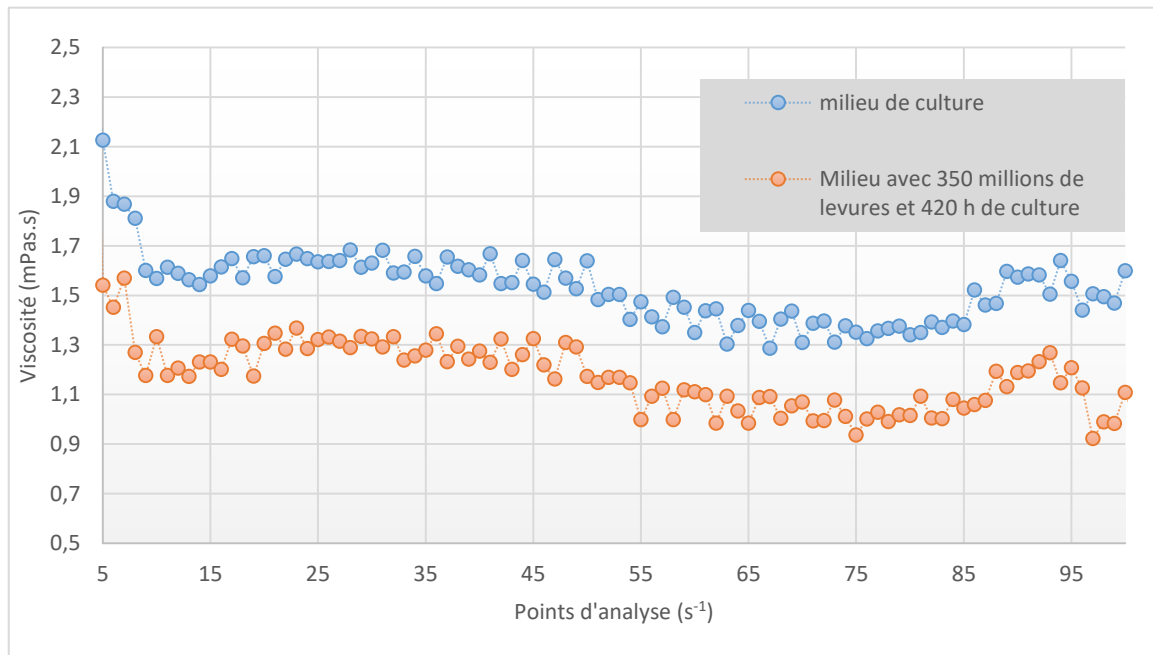




Figure 72 : Evolution de la viscosité du milieu de croissance, la courbe avec le symbole  représente le milieu seul à t0 et le symbole  le milieu contenant les levures à une concentration de 350 millions par millilitre après 420 heures de croissance.

Quel que soit le régime permanent, le comportement rhéologique de ce fluide n'évolue pas, il reste newtonien sur la gamme d'étude du gradient de vitesse ( $D$  en  $s^{-1}$ ). Il en est de même pour toutes les expériences réalisées. Le fait que la viscosité soit plus faible en présence des levures en fin de culture que pour le milieu initial s'explique probablement par la consommation des nutriments. Ceci permet certainement une meilleure évacuation du dioxyde de carbone produit lors de la croissance, mais aussi peut-être un moins bon transfert de dioxygène grâce à un simple phénomène physique permettant aux microbulles d'être plus mobiles, de se rencontrer et remonter à la surface (Gérard Liger-Belair & Rochard, 2008). Dans l'étude réalisée par de Rautlin de la Roy (1972), il ressort qu'une faible augmentation de la viscosité du milieu de culture, de 1,15 à 1,30 mPa.s, retient le gaz dans le liquide dans 56% des essais. La mesure de la viscosité et la prise en considération des pales d'agitation souhaitées ont permis le dimensionnement de la puissance du moteur pour le pilote.

## 5.2. Schéma de procédé

Le schéma de procédé (Figure 73) montre le dispositif tel qu'il a été défini pour le pilote de 800 litres.

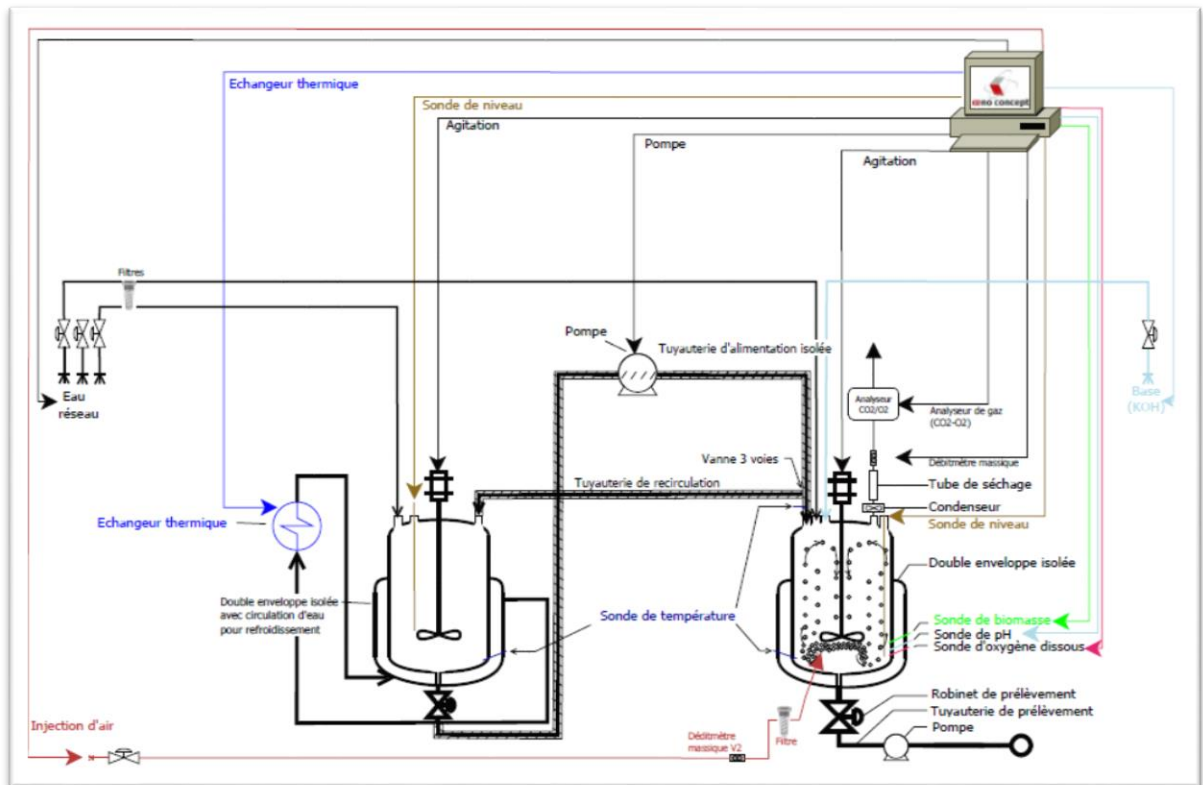


Figure 73 : Schéma du procédé développé, pilote 800 litres.

EnAnnexe 6 : Dessin de la cuve de stockage et mélange du milieu d'alimentation d'une contenance de 1000 litres Annexe 6 et 7, sont représentés les dessins des cuves pour le pilote de 800 litres, l'agitation sera effectuée par une pale Rushton en bas de l'axe puis deux pales marines en milieu d'axe, entraînées par un moteur dont la puissance nécessaire est estimée à 5,5 kW.



# Conclusion générale et perspectives



# Conclusion générale

Au cours des dernières décennies, la production industrielle de la levure a contribué à la généralisation de l'utilisation de la Levure Sèche Active (LSA). Actuellement, de plus en plus de vinificateurs utilisent une même souche qu'ils entretiennent tout au long de l'année pour permettre une qualité et un goût identique de leur vin d'une année sur l'autre.

Au vu des prix pratiqués par les fournisseurs de levure, l'entretien d'une souche représente des économies non négligeables, le prix des LSA étant de l'ordre de 50 euros le kilogramme environ. La production industrielle de biomasse de levure est un processus simple qui a été amélioré au cours des années avec la mise en œuvre d'une meilleure conception des processus, conceptions et des stratégies de contrôle.

Les connaissances acquises sur la production de levure sont nombreuses tant sur le plan biologique que sur le plan procédé. Cependant, elles ont été pour la plupart obtenues dans l'objectif de produire des composés issus du métabolisme de la levure (éthanol, protéines,...) ; les connaissances sur la production de levure en tant que telle restent cantonnées au monde industriel des producteurs de levure.

Aujourd'hui encore, le secteur viticole représente un poids considérable dans l'économie mondiale. Et le trio de tête reste européen : l'Italie, la France et l'Espagne. Ces trois pays représentent à eux seuls 48 % de la production mondiale. En 2015, elle s'élève à 275 millions d'hectolitres avec une progression de 2% par rapport à l'année précédente. Ces producteurs représentent un marché considérable pour les producteurs de levure ou les entreprises travaillant comme intégrateurs de process viticole, comme la société Ceno Concept, partenaire de ce projet.

L'objectif premier de ce travail était de mettre en œuvre expérimentalement une stratégie simple de production de levure *Saccharomyces cerevisiae* en grande quantité à destination des opérateurs du monde viticole qui produisent actuellement de façon empirique. Initialement il avait été décidé d'optimiser le procédé en culture batch dans les cuves utilisées actuellement par les clients d'Ceno Concept.

L'étude de la réhydratation préalable de LSA, préconisée par le fournisseur, a permis de montrer que la réhydratation préalable ne permet pas de gains de productivité et viabilité supplémentaires lors d'une culture dans notre milieu. On peut ainsi gagner un temps significatif sur le démarrage du procédé en supprimant cette étape. D'autres auteurs assurent tout de même que la réhydratation est nécessaire (Jacques *et al.*, 2003, p. 97). Ce qui nous semble important pour une bonne vitalité de la levure après réhydratation est la température et composition du milieu dans lequel elle se réhydrate.

Par ailleurs les études préliminaires en Erlenmeyer ont permis d'étudier l'influence de diverses conditions physico-chimiques et de déterminer des conditions favorables à une bonne production de biomasse dans un milieu hydro-alcoolique.



Les études en bioréacteur de type batch ont, quels que soient les débits d'aération (entre 0,01 et 0,10 VVm), montré que le rendement en biomasse était relativement faible, de l'ordre de 0,04 à 0,08 gramme de poids sec par gramme de glucose, pour une concentration initiale en glucose de 80 g/L environ. Il semble ressortir qu'un apport assez élevé de phosphate diammonique (3,2 g/L) diminue le rendement sur glucose mais les cultures concernées ont par la suite rattrapé leur retard en poids sec, par consommation de l'éthanol et du glycérol. Nous avons fait l'hypothèse que les levures en contact avec une concentration importante de phosphate diammonique ont réalisé des stocks (tréhalose, glycogène,...), utilisés après l'épuisement du glucose et permettant ainsi une production de biomasse identique, voire légèrement supérieure au final (respectivement des poids sec de 6,7 et 9,7 g/L contre 5,5 g/L pour les conditions avec 0,2 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ). Les différents débits d'aération testés n'ont pas montré de différences significatives sur la viabilité, 75 à 85%, compte tenu de la précision de la méthode de mesure au bleu de méthylène. Nous avons montré que dans tous les essais il existait une part de respiration et une part de fermentation dont les proportions varient légèrement avec l'aération. L'aération par le micro diffuseur est tout de même plus efficace que par le diffuseur annulaire. Plus l'aération est importante, plus la respiration est favorisée, accroissant le rendement biomasse/glucose mais diminuant la vitesse de consommation du glucose. Cependant ces effets sont assez minimes, les proportions de fermentation ont pu être estimées aux alentours de 80% pour tous les essais avec une concentration initiale de glucose de 80 g/L. Par contre l'effet de la concentration initiale de glucose est important : pour une concentration plus faible (20 g/L), la proportion de fermentation chute considérablement (30 % environ). Ceci est dû à un effet Crabtree plus ou moins prononcé.

Grâce aux optimisations réalisées, nous obtenons pour une concentration initiale en glucose de 80 g/L, un maximum de population de 400 millions de levures viables par millilitre après 170 heures de culture (rendement de bioconversion de 9 %) ; lors de la diminution de la concentration initiale en glucose, on produit 300 millions de levures viables par millilitre à 95 heures environ avec un meilleur rendement de bioconversion (17 %) et une vitesse plus importante. Les productivités volumiques obtenues varient de 372 à 3019 millions de levures par litre et par heure.

A noter que comparativement, les concentrations obtenues en cave lors de développement sur vin ne sont que de 60 à 80 millions de levures par millilitre. Nous pensons avoir ainsi atteint la production maximale en batch dans ce milieu hydro-alcoolique. L'objectif étant de concevoir et commercialiser une cuve de taille réduite pour la production de ferments concentrés disponibles de façon quasi continue avec la possibilité de prélever un volume régulier adapté aux besoins de production, nous nous sommes dirigés vers un procédé fed-batch à partir des résultats de croissance de type batch. L'avantage supplémentaire du fed-batch est en théorie, la possibilité de maintenir dans le réacteur une concentration de glucose très faible permettant de favoriser la respiration au détriment de la fermentation et donc d'augmenter encore le rendement biomasse obtenue à partir du glucose. C'est ce que nous avons vérifié lors des essais fed-batch.

Le présent travail a ensuite porté sur l'amélioration du contrôle du procédé grâce à un indicateur simple et robuste, la température. Le contrôle de la température a permis une alimentation en nutriments adéquate pour une croissance optimale en milieu hydro-alcoolique. Ce procédé innovant développé dans la dernière phase de ce projet a fait l'objet d'un brevet.

Lors des essais fed-batch réalisés à partir de ce procédé innovant, la régulation de l'apport en nutriment, basée sur le dégagement de chaleur produit lors de la croissance de la levure, a donné de très bons résultats en améliorant significativement le rendement de bioconversion par

rapport au meilleur essai batch (30 % contre 17 % auparavant pour une faible quantité en glucose) ; ce rendement est similaire à ceux trouvés dans la littérature, par exemple Vieira *et al.* (2013) qui obtiennent un rendement de 33% lors d'un essai de production de *Saccharomyces cerevisiae* par faible alimentation en glucose. La productivité volumique obtenue est très clairement améliorée avec 37 500 millions de levures par litre et par heure, par rapport à la croissance en mode batch ; nous avons également montré qu'après la vidange de la moitié du réacteur le procédé se remettait en route de façon très satisfaisante et permettait d'atteindre la même production en une nuit. Ceci confirme l'applicabilité de ce procédé pour une utilisation en cave : vidange de la moitié de la cuve et récupération du niveau de production le lendemain.

Nous confirmons par une seule étude certes, réalisée en bouteille Schott de laboratoire non fermée de façon hermétique, que le fait de cultiver la levure dans un milieu de croissance proche de celui du vin, qui est contraignant pour son développement, a permis de mener à terme une fermentation. Cela demande confirmation ultérieure mais notre procédé a permis d'acclimater et ainsi de diminuer les risques durant la fermentation.

Nous avons trouvé des conditions permettant une bonne production de biomasse en fed-batch et une régulation quasi parfaite de la température ; la faisabilité de notre procédé est donc démontrée, mais il resterait bien sûr à optimiser ses divers paramètres comme nous le détaillerons dans la partie « perspectives ».

Nous avons pu montrer qu'en condition aérobie après l'épuisement du glucose, la consommation des produits de fermentation tels que le glycérol et l'éthanol est possible et donne des rendements intéressants. Par ailleurs, un essai sans apport de glucose montre une bonne production de biomasse confirmant qu'il est possible de la produire à partir du glycérol et de l'éthanol directement.

Afin de contrôler la viabilité des levures au niveau industriel, le pH pourra être suivi ; en effet nous avons remarqué que la mort des levures après plusieurs semaines de phase stationnaire sans apport de nutriments montrait une augmentation significative du pH du milieu. En cas de problème dans la culture, le suivi du pH sera donc un moyen rapide, à l'aide d'un capteur peu onéreux, de connaître l'état du levain.

Ce projet de recherche étant en lien direct avec une application industrielle de production de biomasse en milieu vinicole, les outils développés et les résultats obtenus durant ces travaux ont permis de concevoir, dimensionner et élaborer une cuve pilote instrumentée de 800 litres qui reste à tester. Il a aussi permis de répondre à certaines questions scientifiques sur la croissance en milieu hydro-alcoolique de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, notamment sur la coexistence de la respiration et de la fermentation sur glucose, mais aussi montré que la respiration de l'éthanol et du glycérol était possible pour une production de biomasse non négligeable.

Bien évidemment comme tout travail de recherche, cette étude débouche sur des questions qui ouvrent un certain nombre de perspectives.

- on constate une certaine hétérogénéité dans les poids des levures entre différentes conditions de croissance et même au cours d'une même croissance ; ce point est à confirmer par des mesures de poids cellulaire plus précises car il pourrait renseigner sur l'état des cellules. Le poids de la cellule dépend-il de sa provenance : respiration sur glucose, respiration sur éthanol/glycérol, fermentation ? Pourquoi augmente-t-il en fin de croissance ?

- en liaison avec le point précédent, l'identification précise des cellules vivantes et mortes est importante ; il serait intéressant d'isoler ces deux types de cellules pour les étudier séparément
- l'effet de l'ajout de phosphate diammonique est à creuser pour confirmer son action sur la consommation du glucose et conforter ou infirmer l'hypothèse selon laquelle il joue sur la vitesse de consommation du substrat. Des études supplémentaires seraient intéressantes pour affiner la valeur de l'apport optimal
- de nombreuses concentrations de glucose ont été étudiées en fed-batch, on pourrait compléter cette étude pour affiner les conditions optimales
- l'effet de l'aération n'a pas été testé en fed-batch ; il serait intéressant de faire quelques essais à divers débits d'aération, pour vérifier que le comportement est semblable à celui des essais batch
- nous n'avons pas étudié l'effet de la concentration d'éthanol, tester une dilution plus importante du vin et *a contrario* déterminer la teneur limite acceptable d'éthanol pour la propagation des levures pourraient apporter des résultats précieux
- les aspects thermiques n'ont pas été creusés ; étudier l'influence de la température de l'alimentation sur la production de biomasse, permettrait d'optimiser ce paramètre
- après avoir complété les résultats expérimentaux en fed-batch, il serait intéressant de réaliser un plan d'expériences avec plusieurs variables : concentrations de glucose dans le réacteur au début du fed-batch et dans l'alimentation, concentration d'éthanol initiale, température de l'alimentation. Le but serait de trouver le meilleur compromis entre un bon rendement biomasse, une bonne vitesse de production et une viabilité maximale
- la cuve de 800 L devra être testée d'abord dans les conditions déterminées dans ce travail, puis dans d'éventuelles conditions permettant de meilleures performances. Enfin le procédé développé et l'appareillage mis au point pourront être testés sur du moût dilué ; les quelques essais réalisés dans le cadre de cette thèse semblent positifs.

#### Plusieurs pistes peuvent être envisagées pour comprendre

Il semblerait qu'il existe une hétérogénéité dans les poids des levures entre différentes conditions de croissance. En fin de fed-batch, il serait aussi intéressant de pouvoir séparer les différentes populations (quiescentes ou non) pour pouvoir les étudier indépendamment. Certaines sont responsables du maintien de l'activité métabolique, d'autres sont définitivement mortes.

Certainement prélever plus de la moitié de la cuve car cela se fera dès le matin très certainement, donc non pas 12 h de culture par la suite mais une vingtaine d'heures.

Ultérieurement, une utilisation de ce procédé sur moût de raisin dilué devra être réalisée.



## Références bibliographiques

- A**guilera, J., Van Dijken, J. P., De Winde, J. H., & Pronk, J. T. (2005). Carbonic anhydrase (Nce103p): an essential biosynthetic enzyme for growth of *Saccharomyces cerevisiae* at atmospheric carbon dioxide pressure. *The Biochemical Journal*, 391(Pt 2), 311–316. <http://doi.org/10.1042/BJ20050556>
- Al-Mhanna, N. M. M. (2010). Observation of Crabtree effect and diauxic behaviour of yeast by using absorption. *Chemical Engineering Transactions*, 21, 1465–1470. <http://doi.org/10.3303/CET1021245>
- Aldiguié, A.-S. (2006). *Activité bio-catalytique en haute densité cellulaire de Saccharomyces cerevisiae pour l'intensification de la production en bio-éthanol*. Retrieved from <http://eprint.insa-toulouse.fr/archive/00000097/>
- Aldiguié, A.-S., Alfenore, S., Cameleyre, X., Goma, G., Uribe Larrea, J. L., Guillouet, S. E., & Molina-Jouve, C. (2004). Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behaviour in ethanol bio-fuel production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 26(4), 217–22. <http://doi.org/10.1007/s00449-004-0352-6>
- Ansanay-galeote, V., Blondin, B., Dequin, S., & Sablayrolles, J.-M. (2001). Stress effect of ethanol on fermentation kinetics by stationary-phase cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 23(9), 677–681.
- Arroyo-López, F., Orlic, S., Querol, A., & Barrio, E. (2009). Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid. *International Journal of Food Microbiology*, 131, 120–127. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160509000518>
- Association des Brasseurs de France, W. (2016). Brasseurs de France. Retrieved August 5, 2016, from <http://www.brassers-de-france.com/?age-verified=245d356657>
- Attfeld, P. V. (1997). Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nature Biotechnology*, 15, 1351–1357. <http://doi.org/10.1038/nbt1297-1351>
- B**aduel, P. (2002). Principales applications industrielles. *Techniques de l'Ingénieur*, (Procédés chimie-bio-agro-Opérations unitaires-Génie de la réaction chimique). Retrieved from [www.techniques-ingenieur.fr](http://www.techniques-ingenieur.fr)
- Bakker, B. M., Overkamp, K. M., Van Maris, A. J. A., Kötter, P., Luttik, M. A. H., Van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (2001). Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(1), 15–37. [http://doi.org/10.1016/S0168-6445\(00\)00039-5](http://doi.org/10.1016/S0168-6445(00)00039-5)
- Bataillon, M., Rico, A., Sablayrolles, J.-M., Salmon, J.-M., & Barre, P. (1996). Early thiamin assimilation by yeasts under enological conditions: Impact on alcoholic fermentation kinetics. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82(2), 145–150. [http://doi.org/10.1016/0922-338X\(96\)85037-9](http://doi.org/10.1016/0922-338X(96)85037-9)
- Bechet, C. (2016). *Agrex consulting*.
- Bell, S.-J., & Henschke, P. A. (2005). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(3), 242–295. <http://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00028.x>
- Bely, M., Sablayrolles, J.-M., & Barre, P. (1990). Description of Alcoholic Fermentation

- Kinetics : Its Variability and Significance. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41(4), 319–324.
- Bely, M., Salmon, J. M., & Barre, P. (1994). Assimilable nitrogen addition and hexose transport system activity during enological fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 100(4), 279–282.
- Ben Azouz Ahmed, K. (2012). *Relations entre propriétés rhéologiques et structure microscopique de dispersions de particules d' argile dans des solutions de polymères*. Thèse. UNIVERSITÉ DE STRASBOURG, Institut de Mécanique des Fluides et des Solides, CNRS-UDS.
- Ben Chaabane, M. F. (2006). *Intensification de la production d'éthanol biocarburant dans un bioréacteur bi étagé avec recyclage cellulaire : Modélisation et stratégie de conduite*. Thèse. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.
- Bideaux, C., Alfenore, S., Cameleyre, X., Molina-Jouve, C., Uribelarrea, J. L., & Guillouet, S. E. (2006). Minimization of glycerol production during the high-performance fed-batch ethanolic fermentation process in *Saccharomyces cerevisiae*, using a metabolic model as a prediction tool. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 2134–2140. <http://doi.org/10.1128/AEM.72.3.2134-2140.2006>
- Bioengineering. (2016). BioDictionary. Retrieved February 3, 2014, from [http://www.bioengineering.ch/php/biblio/lexikon\\_1-en.php?02020201&abc=A&search=&display=1277&offset=0](http://www.bioengineering.ch/php/biblio/lexikon_1-en.php?02020201&abc=A&search=&display=1277&offset=0)
- BKYeast - wordpress. (2013). Dyeing Yeast Cells: Life vs Death BKYeast. Retrieved from <https://bkyeast.wordpress.com/2013/01/26/dyeing-yeast-cells-life-vs-death/>
- Bodizs, L., Titica, M., Faria, N., Srinivasan, B., Dochain, D., & Bonvin, D. (2007). Oxygen control for an industrial pilot-scale fed-batch filamentous fungal fermentation. *Journal of Process Control*, 17(7), 595–606. <http://doi.org/10.1016/j.jprocont.2007.01.019>
- Bonnet, J. A. B. A. F., De Kok, H. E., & Roels, J. A. (1984). The growth of *Saccharomyces cerevisiae* CBS 426 on mixtures of glucose and succinic acid: a model. *Antonie van Leeuwenhoek*, 46, 564–576.
- Booth, I. R. (2002). Stress and the single cell: Intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. *International Journal of Food Microbiology*, 78(1–2), 19–30. [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00239-8](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00239-8)
- Boulton, R. (1980). The prediction of fermentation behavior by a kinetic model. *American Journal of Enology and Viticulture*, 31(1), 40–45.
- Bourat, G. (1992). Fermentations - Propriétés des micro-organismes. *Techniques de L'ingénieur*. Retrieved from [www.techniques-ingenieur.fr](http://www.techniques-ingenieur.fr)
- Brandam, C., Lai, Q. P., Julien-Ortiz, A., & Taillandier, P. (2013). Influence of oxygen on alcoholic fermentation by a wine strain of *Torulaspora delbrueckii*: kinetics and carbon mass balance. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 77(9), 1848–53. <http://doi.org/10.1271/bbb.130228>
- Branger, A. (2004). Fabrication de produits alimentaires par fermentation : l'ingénierie. *Techniques de L'ingénieur*, (Procédés chimie-bio-agro-Bioprocédés-Concepts, équipements et réglementations des biotechnologies). Retrieved from [www.techniques-ingenieur.fr](http://www.techniques-ingenieur.fr)
- Brasseurs de France, W. (2016). La bière,matieres premieres. Retrieved August 5, 2016, from <http://www.brasseurs-de-france.com/la-biere/de-lepi-au-demi/matieres-premieres/?age-verified=02b5eda5b0>

Breban, J.-J. (2016). Syndicat Français des Vins Mousseux, vin et bulles. Retrieved January 10, 2016, from <http://www.vin-et-bulles.fr/>

Cadière, A., Ortiz-Julien, A., Camarasa, C., & Dequin, S. (2011). Evolutionary engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains with increased in vivo flux through the pentose phosphate pathway. *Metabolic Engineering*, *13*(3), 263–271. <http://doi.org/10.1016/j.ymben.2011.01.008>

Cassagnau, P., Mijangos, C., & Michel, A. (1991). An Ultraviolet Method for the Determination of the Residence Time Distribution in a Twin Screw Extruder. *Polymer Engineering and Science*, *31*(11).

Celton, M. (2011). *Etude de la réponse de Saccharomyces cerevisiae à une perturbation NADPH par une approche de biologie des systèmes*. Thèse. INRA CENTRE INTERNATIONAL D'ETUDES SUPERIEURES EN SCIENCES AGRONOMIQUES DE MONTPELLIER SUPAGRO.

Charoenchai, C., Fleet, G. H., & Henschke, P. A. (1998). Effects of Temperature, pH, and Sugar Concentration on the Growth Rates and Cell Biomass of Wine Yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture*, *49*(3), 283–288.

Ciani, M., Beco, L., & Comitini, F. (2006). Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, *108*(2), 239–245. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.012>

Cot, M. (2006). *Etudes physiologiques de l'adaptation et de la résistance de la levure Saccharomyces cerevisiae au cours de la production intensive d'éthanol*. Thèse. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.

Crabtree, H. G. (1929). Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochemical Journal*, *23*(3), 536–545. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1254097/>

Crumplén, R., D'Amore, T., Panchal, C. J., Russell, I., & Stewart, G. G. (1989). Industrial uses of yeast. In *Seventh international symposium on yeasts*.

Dashko, S., Zhou, N., Compagno, C., & Piškur, J. (2014). Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation? *FEMS Yeast Research*, *14*(6), 826–832. <http://doi.org/10.1111/1567-1364.12161>

De Deken, R. H. (1966). The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *Journal of General Microbiology*, *44*(2), 149–156. <http://doi.org/10.1099/00221287-44-2-149>

de Rautlin de la Roy, Y. (1972). Influence de la Viscosité du Milieu sur le Degagement Gazeux au Cours des Processus de Fermentation. *Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology*, *10*(3), 298–300.

Debs-Louka, E., Louka, N., Abraham, G., Chabot, V., & Allaf, K. (1999). Effect of compressed carbon dioxide on microbial cell viability. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*(2), 626–631.

Dewey, D. R., Kim, Y., & Kim, J. (1984). Effect of air supplement on the performance of continuous ethanol fermentation system. *Biotechnology and Bioengineering*, *26*(1), 12–16. <http://doi.org/10.1002/bit.260260104>

Dombek, K. M., & Ingram, L. O. (1986). Magnesium limitation and its role in apparent toxicity of ethanol during yeast fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, *52*(5), 975–

81. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=239160&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Dombek, K. M., & Ingram, L. O. (1987). Ethanol production during batch fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*: changes in glycolytic enzymes and internal pH. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(6), 1286–91. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=203856&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

**E**hsani, M., Fernández, M. R., Biosca, J. A., & Dequin, S. (2009). Reversal of coenzyme specificity of 2,3-butanediol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae* and in vivo functional analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 104(2), 381–389. <http://doi.org/10.1002/bit.22391>

EP3095852(A1), Taidi, B., Hussenet, C., Poisot, M., Duchiron, F., & Dominique, P. (2016). Method and device for controlling the temperature of an exothermal or endothermal reaction.

Erasmus, D. J., Cliff, M., & Van Vuuren, H. J. J. (2004). Impact of yeast strain on the production of acetic acid, glycerol, and the sensory attributes of icewine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55(4), 371–378.

Erasmus, D. J., Van Der Merwe, G. K., & Van Vuuren, H. J. J. (2003). Genome-wide expression analyses: Metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. *FEMS Yeast Research*, 3(4), 375–399. [http://doi.org/10.1016/S1567-1356\(02\)00203-9](http://doi.org/10.1016/S1567-1356(02)00203-9)

**F**iechter, A., & Seghezzi, W. (1992). Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. *Journal of Biotechnology*, 27(1), 27–45. [http://doi.org/10.1016/0168-1656\(92\)90028-8](http://doi.org/10.1016/0168-1656(92)90028-8)

Fleet, G. H. (2008). Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 979–995. <http://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00427.x>

Flores, C. L., Rodriguez, C., Petit, T., & Gancedo, C. (2000). Carbohydrate and energy- yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 507–529.

Fornairon-Bonnefond, C., Demaretz, V., Rosenfeld, E., & Salmon, J.-M. (2002). Oxygen addition and sterol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* during enological fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93(2), 176–82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16233184>

Foucaud-scheunemann, C., & Helinck, S. (2009). Les micro-organismes au cœur des biotechnologies. *Techniques de L'ingénieur*, (Procédés chimie-bio-agro-Bioprocédés-Concepts, équipements et réglementations des biotechnologies). Retrieved from [www.techniques-ingenieur.fr](http://www.techniques-ingenieur.fr)

FranceAgriMer. (2016a). Le marché mondial des vins effervescents. *Ministère de L'agriculture, de L'agroalimentaire et de La Forêt*, 1–6.

FranceAgriMer. (2016b). Ventes et achats de vins tranquilles. *Ministère de L'agriculture, de L'agroalimentaire et de La Forêt*.

Fries, S., Glazomitsky, K., Woods, A., Forrest, G., Hsu, A., Olewinski, R., ... Chartrain, M. (2005). Evaluation of disposable bioreactors. *Bioprocess International*, 3((Suppl) 6), 36–44.

Fugelsang, K. C., & Edwards, C. G. (2007). *Wine microbiology - Practical applications and procedures* (second edi). Springer Science.



- Gancedo, J. M. (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: *MMBR*, 62(2), 334–61. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=98918&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Garre, E., Raginel, F., Palacios, A., Julien, A., & Matallana, E. (2010). Oxidative stress responses and lipid peroxidation damage are induced during dehydration in the production of dry active wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 136(3), 295–303. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.10.018>
- Gervais, P., & Martinez de Maranon, I. (1995). Effect of the kinetics of temperature variation on *Saccharomyces cerevisiae* viability and permeability. *Biochimica et Biophysica Acta - BBA*, 1235(1), 52–56. [http://doi.org/10.1016/0005-2736\(94\)00299-5](http://doi.org/10.1016/0005-2736(94)00299-5)
- Geurts, T. G. E., De Kok, H. E., & Roels, J. A. (1980). A quantitative description of the growth of *Saccharomyces cerevisiae* CBS 426 on a mixed substrate of glucose and ethanol. *Biotechnology and Bioengineering*, 22(10), 2031–2043. <http://doi.org/10.1002/bit.260221004>
- Ghose, T. K., & Tyagi, R. D. (1979). Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate. II. Product and substrate inhibition and optimization of fermentor design. *Biotechnology and Bioengineering*, 21(8), 1401–1420. <http://doi.org/10.1002/bit.260210808>
- Gilis, J.-F., Seiller, I., & Delia, M.-L. (1999). *Effet de certains paramètres physico-chimiques (pH et O<sub>2</sub>) sur la cinétique de croissance de Brettanomyces*. 6ème Symposium international d'oenologie, Bordeaux.
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., ... Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 Genes. *Science*, 274, 546–567. <http://doi.org/10.1126/science.274.5287.546>
- Gómez-Pastor, R., Pérez-Torrado, R., Garre, E., & Matallana, E. (2011). Recent Advances in Yeast Biomass Production. In *Biomass - Detection, Production and Usage* (pp. 202–222). Retrieved from [www.intechopen.com](http://www.intechopen.com)
- Hagman, A., Säll, T., & Piškur, J. (2014). Analysis of the yeast short-term Crabtree effect and its origin. *FEBS Journal*, 281(21), 4805–4814. <http://doi.org/10.1111/febs.13019>
- Hirasawa, T., Yoshikawa, K., Nakakura, Y., Nagahisa, K., Furusawa, C., Katakura, Y., ... Shioya, S. (2007). Identification of target genes conferring ethanol stress tolerance to *Saccharomyces cerevisiae* based on DNA microarray data analysis. *Journal of Biotechnology*, 131(1), 34–44. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.05.010>
- Hulse, G. A. (2003). Yeast Propagation. In K. Smart (Ed.), *Brewing Yeast Fermentation Performance* (2nd ed., pp. 265–269). Science Blackwell.
- ICV. (n.d.). Institut Coopératif du Vin. Retrieved January 15, 2014, from <http://www.icv.fr/>
- Infowine. (2016). Au cœur du vin: les levures. Retrieved October 2, 2016, from <http://www.infowine.com/default.asp?scheda=15703>
- Inglede, W. M., Magnus, C. A., & Sosulski, F. W. (1987). Influence of oxygen on proline utilization during the wine fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture, Food Biotechnology*, 38(3), 246–248.

- J**acobson, J. L. (2006). *Introduction to Wine Laboratory - Practices and Procedures*. Springer Science.
- Jacques, K. A., Lyons, T. P., & Kelsall, D. R. (2003). *The Alcohol Textbook 4th Edition* (4th ed.).
- Jiranek, V., Langridge, P., & Henschke, P. A. (1995). Amino acid and ammonium utilization by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from a chemically defined medium. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46(1), 75–83. [http://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00157-0](http://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00157-0)
- Jones, R. P., & Greenfield, P. F. (1982). Effect of carbon dioxide on yeast growth and fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 4(4), 210–223. [http://doi.org/10.1016/0141-0229\(82\)90034-5](http://doi.org/10.1016/0141-0229(82)90034-5)
- Julien, A., Théodore, D., Specht, G., Dumont, A., & Brung, C. (2014). Nutrition et protection des levures : réussir sa fermentation alcoolique. Retrieved from <http://lallemandwine.com/wp-content/uploads/2014/10/ETAT-DE-LART.pdf>
- K**äppeli, O. (1986). Regulation of Carbon Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and Related Yeasts. *Advances in Microbial Physiology*, 28, 181–209. [http://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60239-8](http://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60239-8)
- Käppeli, O., & Sonnleitner, B. (1986). Regulation of sugar metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*-type yeast: experimental and conceptual considerations. *Critical Reviews in Biotechnology*, 4(3), 299–325. <http://doi.org/10.3109/07388558609150798>
- Kompala, D. S. (2013). Microbial Growth on Multiple Substrates. In *Bioprocess Engineering: Fundamentals and Applications* (First edit, p. 750). Bosa Roca: Taylor & Francis Inc.
- Kompala, D. S., Ramkrishna, D., Jansen, N. B., & Tsao, G. T. (1986). Investigation of bacterial growth on mixed substrates: experimental evaluation of cybernetic models. *Biotechnology and Bioengineering*, 28(August 2015), 1044–1055. <http://doi.org/10.1002/bit.260280715>
- Kontkanen, D., Inglis, D. L., Pickering, G. J., & Reynolds, A. (2004). Effect of Yeast inoculation rate, acclimatization, and nutrient addition on icewine fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55(4), 363–370.
- Kunkee, R. E., & Ough, C. S. (1966). Multiplication and fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* under carbon dioxide pressure in wine. *Applied Microbiology*, 14(4), 643–8.
- L**afforgue, C., Malinowski, J., & Goma, G. (1987). High yeast concentration in continuous fermentation with cell recycle obtained by tangential microfiltration. *Biotechnology Letters*, 9(5), 347–352. <http://doi.org/10.1007/BF01025802>
- Lagunas, R., Dominguez, C., Busturia, A., & Saez, M. J. (1982). Mechanisms of appearance of the Pasteur effect in *Saccharomyces cerevisiae*: Inactivation of sugar transport systems. *Journal of Bacteriology*, 152(1), 19–25.
- Lagunas, R., & Gancedo, C. (1983). Role of phosphate in the regulation of the Pasteur effect in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, 137, 479–483.
- Lallemand™. (2006). *La protection des levures lors de la fermentation alcoolique : le rôle des stéroïdes*. Retrieved from [www.lallemandwine.com](http://www.lallemandwine.com)
- Lallemand™. (2011). *Sécuriser la fermentation alcoolique : La nutrition complète des levures*. Retrieved from [www.lallemandwine.com](http://www.lallemandwine.com)

- Lallemand™. (2016). Lallemand web page. Retrieved February 3, 2014, from [www.lallemandwine.com](http://www.lallemandwine.com)
- Lange, H., Bavouzet, J. M., Tallandier, P., & Delorme, C. (1993). SYSTEMATIC ERROR AND COMPARISON OF FOUR METHODS FOR ASSESSING THE VIABILITY OF SACCHAROMYCES CEREVISIAE SUSPENSIONS. *Biotechnology Techniques*, 7(3), 223–228.
- Larpent, J.-P. (1990). *Biotechnologie des levures*. Elsevier Masson.
- Larsson, C., Lidh, G., Blomberg, a., Niklasson, C., & Gustafsson, L. (1993). Monitoring and control of batch and fed-batch cultures of *Saccharomyces cerevisiae* by calorimetry. *Pure and Applied Chemistry*, 65(9), 1933–1937. <http://doi.org/10.1351/pac199365091933>
- Laurent, M., & Valade, M. (1998). La propagation des levains de tirage. *Le Vigneron Champenois ; N°3 Mars*, 29–52.
- Liger-Belair, G. (2010). Visual Perception of Effervescence in Champagne and Other Sparkling Beverages. *Advances in Food and Nutrition Research*, 61(C), 1–55. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-374468-5.00001-5>
- Liger-Belair, G. (2012). The physics behind the fizz in champagne and sparkling wines. *European Physical Journal: Special Topics*, 201(1), 1–88. <http://doi.org/10.1140/epjst/e2012-01528-0>
- Liger-Belair, G., Polidori, G., & Jeandet, P. (2008). Recent advances in the science of champagne bubbles. *Chemical Society Reviews*, 37(11), 2490. <http://doi.org/10.1039/b717798b>
- Liger-Belair, G., & Rochard, J. (2008). *Les vins effervescents-Du terroir à la bulle* (Dunod).
- Loëz, A. (2003). Production de la levure de panification par biotechnologie. *Techniques de L'ingénieur*, (Procédés chimie-bio-agro-Bioprocédés-Bioprocédés dans les domaines de la santé, de l'agroalimentaire et de la chimie). Retrieved from <http://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agro-th2/bioprocetes-dans-les-domaines-de-la-sante-de-l-agroalimentaire-et-de-la-chimie-42163210/production-de-la-levure-de-panification-par-biotechnologie-j6013/>
- Lonvaud, A., Renouf, V., Strehaiano, P., & Ribéreau-Gayon, P. (2010). *Microbiologie du vin ; bases fondamentales et applications*. Tec & Doc Lavoisier.
- Luparia, V., Soubeyrand, V., Berges, T., Ortiz-Julien, A., & Salmon, J.-M. (2004). Assimilation of grape phytosterols by *Saccharomyces cerevisiae* and their impact on enological fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(1), 25–32. <http://doi.org/10.1007/s00253-003-1549-3>
- M**agasanik, B., & Kaiser, C. A. (2002). Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 290(1–2), 1–18. [http://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)00558-9](http://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)00558-9)
- Marechal, P. A., Martinez de Maranon, I., Molin, P., & Gervais, P. (1995). Yeast cell responses to water potential variations. *International Journal of Food Microbiology*, 28, 277–287.
- Martini, S., Ricci, M., Bonechi, C., Trabalzini, L., Santucci, A., & Rossi, C. (2004). In vivo <sup>13</sup>C-NMR and modelling study of metabolic yield response to ethanol stress in a wild-type strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 564(1–2), 63–68. [http://doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00316-3](http://doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00316-3)
- Media, C., & Culture, C. (1982). Effect of External pH on the Growth of *Saccharomyces cerevisiae* Fermenting Maltose in Batch and Continuous Culture. *Biotechnology and Bioengineering*, XXIV(3), 2725–2729.

- Michnick, S., Roustan, J., Remize, F., & Barre, P. (1997). Modulation of Glycerol and Ethanol Yields During Alcoholic Fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* Strains Overexpressed or Disrupted for GPD1 Encoding Glycerol 3-Phosphate Dehydrogenase, 793, 783–793.
- Morakul, S. (2011, April). *Etude et modélisation de la composition du gaz fermentaire en conditions œnologiques : intérêt pour le contrôle de la fermentation*. *Revue Internationale de Sécurité Sociale*. Retrieved from <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1752-1718.2010.01366.x>
- Moran, L. (2011). Better Biochemistry: The Free Energy of ATP Hydrolysis. Retrieved September 10, 2015, from <http://sandwalk.blogspot.fr/2011/11/better-biochemistry-free-energy-of-atp.html>
- Mosrati, R. (1993). *Nouvelle approche de la cinétique fermentaire de Saccharomyces cerevisiae et de la conduite d'un procédé semi-continu : Modélisation de la croissance basée sur le bilan énergétique de la levure. Commande Prédictive et Floue*. INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE.
- Moulin, G., Boze, H., & Galzy, P. (1984). Inhibition of alcoholic fermentation. *Biotechnology and Genetics Engineering Reviews*, 2, 365–382. <http://doi.org/10.1080/02648725.1984.10647805>
- N**elson, D. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger's Principles of Biochemistry - 5th Edition*. (K. AHR, Ed.) (5th ed.).
- Nerantzis, E. T., Tataridis, P., Sianoudis, I. A., Ziani, X., & Tegou, E. (2007). Winemaking process engineering: on line fermentation monitoring - sensors and equipment. *E-Journal of Science & Technology (E-JST)*, 29–36.
- Nevoigt, E., & Stahl, U. (1997). Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 21(3), 231–241. [http://doi.org/10.1016/S0168-6445\(97\)00058-2](http://doi.org/10.1016/S0168-6445(97)00058-2)
- Nonus, M., Cognart, P., Kergoat, F., & Lebeault, J.-M. (2008). Fermenteurs industriels conception et réalisation. *Techniques de L'ingénieur*, (Procédés chimie-bio-agro-Bioprocédés-Concepts, équipements et réglementations des biotechnologies). Retrieved from [www.techniques-ingenieur.fr](http://www.techniques-ingenieur.fr)
- P**assonneau, J. V., & Lowry, O. H. (1962). Phosphofructokinase and the Pasteur effect. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 7(1), 10–15.
- Passonneau, J. V., & Lowry, O. H. (1964). The role of phosphofructokinase in metabolic regulation. *Advances in Enzyme Regulation*, 2, 265–274. [http://doi.org/10.1016/S0065-2571\(64\)80018-2](http://doi.org/10.1016/S0065-2571(64)80018-2)
- Pérez-Torrado, R., Bruno-Barcena, J. M., & Matallana, E. (2005). Monitoring Stress-Related Genes during the Process of Biomass Propagation of *Saccharomyces cerevisiae* Strains Used for Wine Making. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 6831–6837. <http://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6831>
- Pérez-Torrado, R., Gamero, E., Gómez-Pastor, R., Garre, E., Aranda, A., & Matallana, E. (2015). Yeast biomass, an optimised product with myriad applications in the food industry. *Trends in Food Science and Technology*, 46(2), 167–175. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.10.008>
- Pérez-Torrado, R., Gómez-Pastor, R., Larsson, C., & Matallana, E. (2009). Fermentative capacity of dry active wine yeast requires a specific oxidative stress response during industrial

- biomass growth. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(5), 951–960. <http://doi.org/10.1007/s00253-008-1722-9>
- Pham, H. T. B., Larsson, G., & Enfors, S. O. (1998). Growth and energy metabolism in aerobic fed-batch cultures of *Saccharomyces cerevisiae*: Simulation and model verification. *Biotechnology and Bioengineering*, 60(4), 474–482. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19981120\)60:4<474::AID-BIT9>3.0.CO;2-J](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19981120)60:4<474::AID-BIT9>3.0.CO;2-J)
- Phong Lai, Q. (2010). *Utilisation de levures non Saccharomyces en œnologie : études des interactions entre Torulaspora delbrueckii et Saccharomyces cerevisiae en cultures mixtes*. Thèse. Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse).
- Pigeau, G. M., & Inglis, D. L. (2005). Upregulation of ALD3 and GPD1 in *Saccharomyces cerevisiae* during Icewine fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 99(1), 112–125. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02577.x>
- Pigeau, G. M., & Inglis, D. L. (2007). Response of wine yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) aldehyde dehydrogenases to acetaldehyde stress during Icewine fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 103(5), 1576–1586. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03381.x>
- Pole Fruitier de Bretagne, W. (2016). Association des mordus de la pomme. Retrieved September 12, 2016, from <http://www.mordusdelapomme.fr/spip.php?article75>
- Poulard, A. (2008). *Maîtrise des fermentations spontanées et dirigées*. Le Grau du Roi: Institut Français de la Vigne et du Vin.
- Pronk, J. T., Steensma, H. Y., & Van Dijken, J. P. (1996). Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 12(16), 1607–1633. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199612\)12:16<1607::AID-YEA70>3.0.CO;2-4](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199612)12:16<1607::AID-YEA70>3.0.CO;2-4)
- R**aamsdonk, L. M., Diderich, J. A., Kuiper, A., Van Gaalen, M., Kruckberg, A. L., Berden, J. A., & Van Dam, K. (2001). Co-consumption of sugars or ethanol and glucose in a *Saccharomyces cerevisiae* strain deleted in the HXK2 gene. *Yeast*, 18(11), 1023–1033. <http://doi.org/10.1002/yea.746>
- Ratledge, C. (1991). Yeast physiology - a micro-synopsis. *Bioprocess Engineering*, 6(5), 195–203. <http://doi.org/10.1007/BF00369712>
- Reed, G., & Nagodawithana, T. W. (1988). Technology of Yeast Usage in Winemaking. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39(1), 83–90. Retrieved from <http://www.ajevonline.org/content/39/1/83.abstract>
- Riba, J. (1998). Réacteurs enzymatiques et fermenteurs. *Techniques de L'ingénieur*, (Procédés chimie-bio-agro-Agroalimentaire-Procédés biochimiques et chimiques en agroalimentaire). Retrieved from [www.techniques-ingenieur.fr](http://www.techniques-ingenieur.fr)
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006). *Handbook of Enology*. *Handbook of Enology* (Vol. 1). <http://doi.org/10.1002/0470010398>
- Rodrigues, F., Ludovico, P., & Leão, C. (2006). Sugar Metabolism in Yeasts : an Overview of Aerobic and Anaerobic Glucose Catabolism. In *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* (pp. 101–121). Berlin, Heidelberg. [http://doi.org/10.1007/3-540-30985-3\\_6](http://doi.org/10.1007/3-540-30985-3_6)
- Roukas, T. (1994). Ethanol production from nonsterilized carob pod extract by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells using fed-batch culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 43(3), 189–194. <http://doi.org/10.1002/bit.260430302>
- Russell, I. (2003). *The Alcohol Textbook. A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol*

- industries*. (K. A. PhD Jacques, T. P. PhD Lyons, & D. R. Kelsall, Eds.) (4th ed.). Nottingham University Press.
- Ryder, D. N., & Sinclair, C. G. (1972). Model for the growth of aerobic microorganisms under oxygen limiting conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, *14*(5), 787–798.
- S**ablayrolles, J.-M., & Barre, P. (1993). Kinetics of alcoholic fermentation under anisothermal enological conditions. I. Influence of temperature evolution on the instantaneous rate of fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, *44*(2), 127–133.
- Sablayrolles, J.-M., & Salmon, J.-M. (2010). Déroulement et contrôle de la fermentation. In *INRA Montpellier, U M R Sciences pour l'oenologie*. (pp. 1–29).
- Sablayrolles, J. M. (2009). Control of alcoholic fermentation in winemaking: Current situation and prospect. *Food Research International*, *42*(4), 418–424. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.12.016>
- Salma, M. (2013). *Etude et caractérisation de l'état " Viable mais Non Cultivable " chez Saccharomyces cerevisiae*. Thèse. Université de Bourgogne - Institut Jules Guyot - Institut Universitaire de la Vigne et du Vin UMR PAM A02-102 Equipe VAIMiS.
- Sanchez Gonzalez, Y. (2008). *Etude de l'adaptation et de la gestion de l'activité cellulaire dans un bioréacteur biétagé: intensification de la production d'éthanol*. Université de Toulouse. INSA de Toulouse. Retrieved from [http://eprint.insa-toulouse.fr/archive/00000247/01/Sanchez\\_Gonzalez.pdf](http://eprint.insa-toulouse.fr/archive/00000247/01/Sanchez_Gonzalez.pdf)
- Sander, R. (2015). Compilation of Henry's law constants (version 4.0) for water as solvent. *Atmospheric Chemistry and Physics*, *15*(8), 4399–4981. <http://doi.org/10.5194/acp-15-4399-2015>
- Scanes, K. T., Hohmann, S., & Prior, B. a. (1998). Glycerol Production by the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its Relevance to Wine: A Review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, *19*(1), 17–24. Retrieved from <http://www.sasev.org/journal-sajev/sajev-articles/volume-19-1/art3%5Cglycerol%5Cnin%5Cnwine.pdf>
- Smart, K. A. (2003). *Brewing Yeast Fermentation Performance*. Blackwell Science (2nd ed.). <http://doi.org/10.1002/9780470696040>
- Soubeyrand, V., Luparia, V., Williams, P., Doco, T., Vernhet, A., Ortiz-Julien, A., & Salmon, J.-M. (2005). Formation of Micella Containing Solubilized Sterols during Rehydration of Active Dry Yeasts Improves Their Fermenting Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(20), 8025–8032.
- Stanbury, P. F., Whitaker, A., & Hall, S. J. (1989). *Principles of Fermentation Technology*. Elsevier Science Ltd. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Stanley, D., Bandara, A., Fraser, S., Chambers, P. J., & Stanley, G. A. (2010). The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology*, *109*(1), 13–24. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04657.x>
- Sugimoto, K., Hirao, M., Yoshida, M., Shiosaka, M., & Yokobayashi, Y. (1973). Process for preparing low molecular weight amyloses. *European Patent Office*. Japan.
- Sumino, Y. (1992). Measurement of Shaking-Flask Performance and Its Application to Scaling-Up a Fermentation Process to a Stirred-Tank Fermentor. *Biochemical Engineering for 2001*, *36*(12), 207–208. [http://doi.org/10.1007/978-4-431-68180-9\\_55](http://doi.org/10.1007/978-4-431-68180-9_55)
- Sumino, Y., Sonoi, K., & Akiyama, S. I. (1992). Oxygen transfer rate in stirred-tank fermentors under the supply of oxygen-enriched air. *Journal of Fermentation and Bioengineering*,

73(2), 175–177. [http://doi.org/10.1016/0922-338X\(92\)90761-I](http://doi.org/10.1016/0922-338X(92)90761-I)

Swanson, W. H., & Clifton, C. E. (1948). Growth and assimilation in cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 56(1), 115–124.

Szeifert, F., Chovan, T., & Nagy, L. (1995). Process dynamics and temperature control of fed-batch reactors. *Computers in Chemical Engineering*, 19, 447–452.

**T**he Nobel Foundation. (1907). Nobelprize.org. Retrieved September 8, 2016, from [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1907/buchner-bio.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1907/buchner-bio.html)

The Royal Society of Chemistry. (2016). The Merck Index. Retrieved April 22, 2015, from <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m5574/fructosediphosphate?q=unauthorize>

Thomas, K. C., & Ingeldew, W. M. (1992). Production of 21% (v/v) ethanol by fermentation of very high gravity (VHG) wheat mashes. *Journal of Industrial Microbiology*, 10(1), 61–68. <http://doi.org/10.1007/BF01583635>

Torija, M. J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., & Mas, A. (2002). Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 80(1), 47–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12430770>

Tracey, R. P., & Simpson, E. (1986). Effect of Rehydration Temperature of Active Dried Yeast on Wine Production and quality. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 7(2), 66–70.

**U**nivers biere, W. (2016). Univers bière.malt. Retrieved September 12, 2016, from <http://univers-biere.net/malt.php>

**V**alero, E., Millán, C., Ortega, J. M., & Mauricio, J. C. (2003). Concentration of amino acids in wine after the end of fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(8), 830–835. <http://doi.org/10.1002/jsfa.1417>

Van Dijken, J. P., & Scheffers, W. A. (1986). Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 32(3–4), 199–224. [http://doi.org/10.1016/0378-1097\(86\)90291-0](http://doi.org/10.1016/0378-1097(86)90291-0)

Van Dijken, J. P., Weusthuis, R. A., & Pronk, J. T. (1993). Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, 63(3–4), 343–352. <http://doi.org/10.1007/BF00871229>

Van Urk, H., Postma, E., Scheffers, W. A., & Van Dijkeb, J. P. (1989). Glucose Transport in Crabtree-positive and Crabtree-negative Yeasts. *Journal of General Microbiology*, 135, 2399–2406. <http://doi.org/10.1099/00221287-135-9-2399>

Verduyn, C., Stouthamer, A. H., Scheffers, W. A., & Van Dijken, J. P. (1991). A theoretical evaluation of growth yields of yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 59(1), 49–63. <http://doi.org/10.1007/BF00582119>

Verduyn, C., Zomerdijk, T. P. L., Dijken, J. P., & Scheffers, W. A. (1984). Continuous measurement of ethanol production by aerobic yeast suspensions with an enzyme electrode. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 19(3), 181–185. <http://doi.org/10.1007/BF00256451>

Veron, M. (2006). Viticulture oenologie, boisson-cidre. Retrieved from <http://www.viticulture->

oenologie-formation.fr/vitioenoformlycee/boissontcbvs20052006/cidre.htm

Vieira, É. D., Andrietta, M. D. G. S., & Andrietta, S. R. (2013). Yeast Biomass Production: a New Approach in Glucose-limited Feeding Strategy. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(2), 551–558. <http://doi.org/10.1590/S1517-83822013000200035>

**W**ang, L., Zhao, X.-Q., Xue, C., & Bai, F.-W. (2013). Impact of osmotic stress and ethanol inhibition in yeast cells on process oscillation associated with continuous very-high-gravity ethanol fermentation. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 133. <http://doi.org/10.1186/1754-6834-6-133>

Werner-Washburne, M., Braun, E., Johnston, G. C., & Singer, R. A. (1993). Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*, 57(2), 383–401. <http://doi.org/10.1093/nar/gkr782>

Weusthuis, R. A., Visser, W., Pronk, J. T., Scheffers, W. A., & Vandijken, J. P. (1994). Effects of Oxygen Limitation on Sugar Metabolism in Yeasts : a Continuous-Culture Study of the Kluuyver Effect. *Microbiology-Uk*, 140, 703–715. Retrieved from %3CGo

White, L. R., Richardson, K. E., Schiewe, A. J., & White, C. E. (2003). Performance, Comparison of Yeast Viability/Vitality Methods and Their Relationship to Fermentation. In K. A. Smart (Ed.), *Brewing Yeast Fermentation Performance* (2nd ed., pp. 138–144). Science Blackwell.

Wikén, T., Scheffers, W. A., & Verhaar, A. J. M. (1961). On the existence of a negative pasteur effect in yeasts classified in the genus *Brettanomyces* Kufferath et van Laer. *Antonie van Leeuwenhoek*, 27(1), 401–433. <http://doi.org/10.1007/BF02538468>

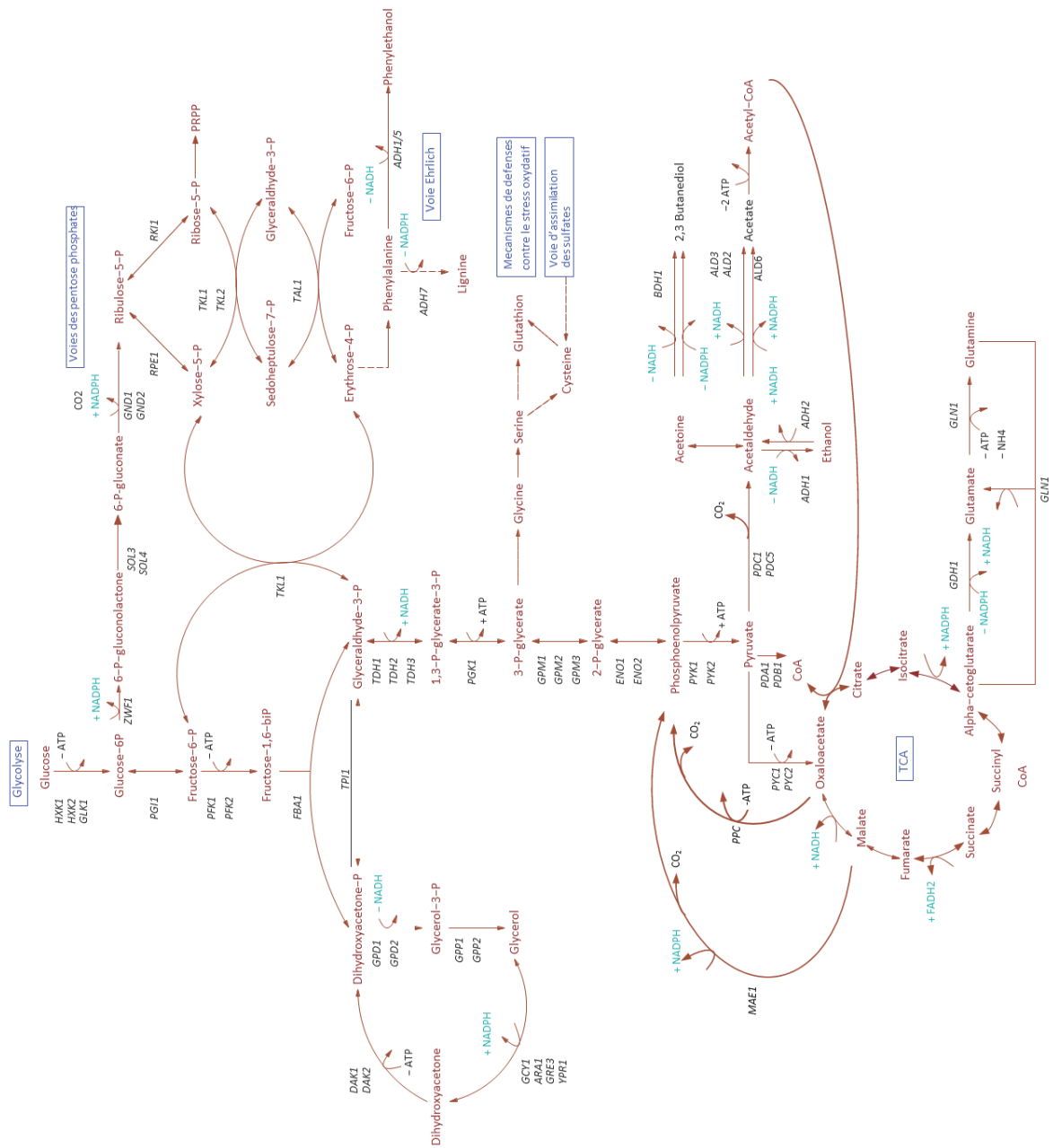
**X**iros, C., & Christakopoulos, P. (2012). Biotechnological potential of brewers spent grain and its recent applications. *Waste and Biomass Valorization*, 3(2), 213–232. <http://doi.org/10.1007/s12649-012-9108-8>

Xuereb, C. (2000). Les mobiles d'agitation. In *INP Toulouse enseiht Energétique et Procédés Bureau d'Etudes Industrielles*.

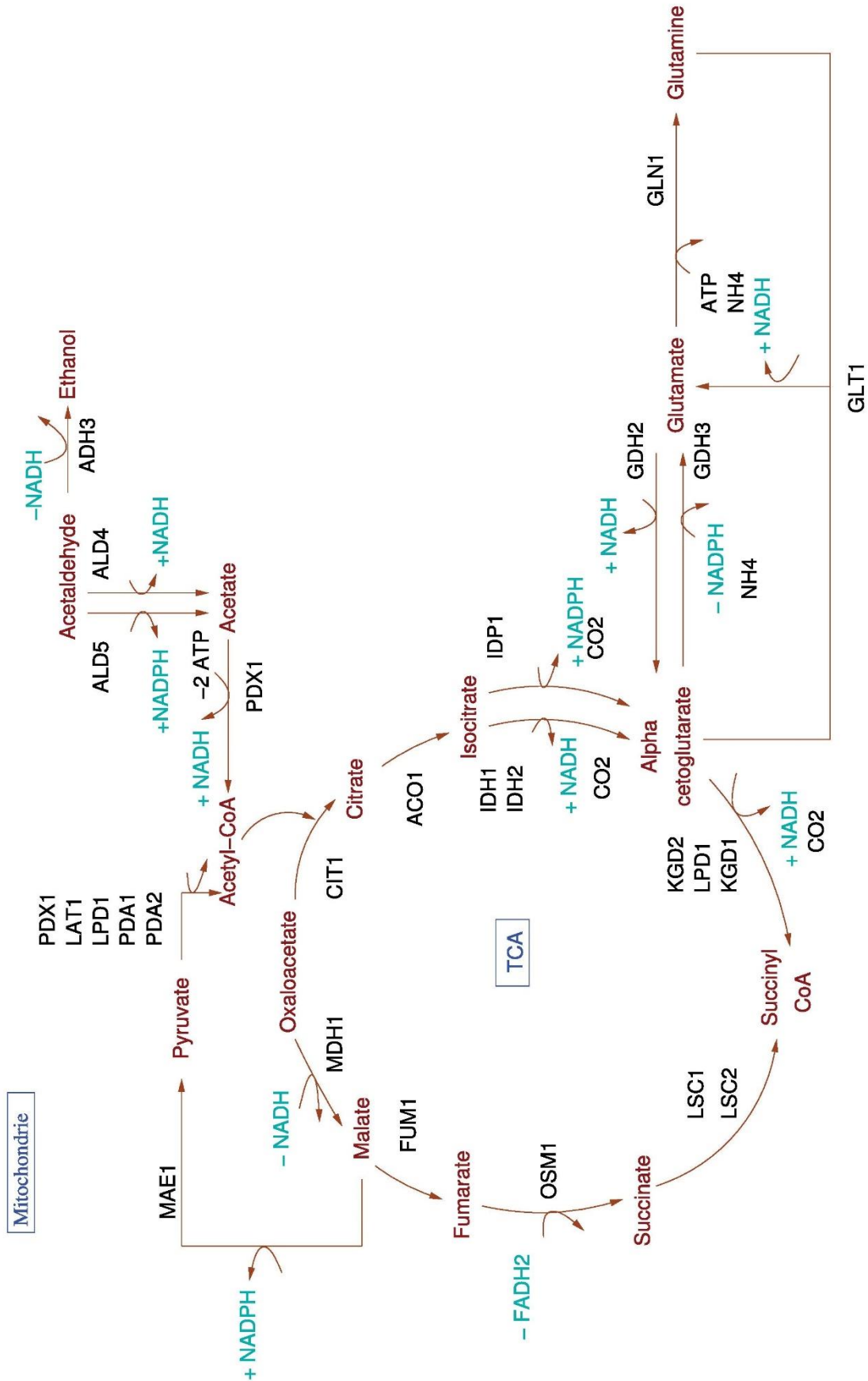


# Annexes

# Annexe 1 : Métabolisme carboné central de *Saccharomyces cerevisiae*, d'après Larpent (1990)



## Annexe 2 : Détail du métabolisme carboné central de la mitochondrie d'après Larpent (1990)



### Annexe 3 : Détermination des vitesses spécifiques de croissance en réacteur batch

Nous avons adopté la loi classique :  $\frac{dX}{dt} = \mu X$  pour déterminer la vitesse spécifique de croissance  $\mu$  pendant la phase exponentielle.

On a donc porté  $\ln\left(\frac{\text{Abs}}{\text{Abs}_0}\right)$  en fonction du temps et obtenu des droites de pente égale à  $\mu$ , pour chaque condition.

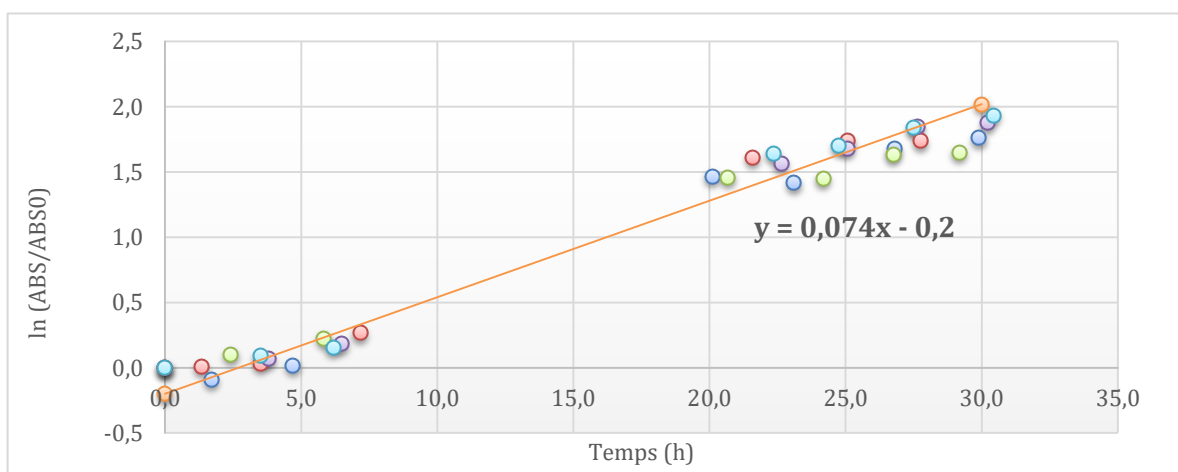


Figure 74 : Détermination des vitesses spécifiques de croissance par la représentation du logarithme népérien du rapport de l'absorbance du milieu à 600 nm sur l'absorbance initiale des cinq conditions d'aération lors du balayage de l'air de la tête de cuve à 0,2 VVm.

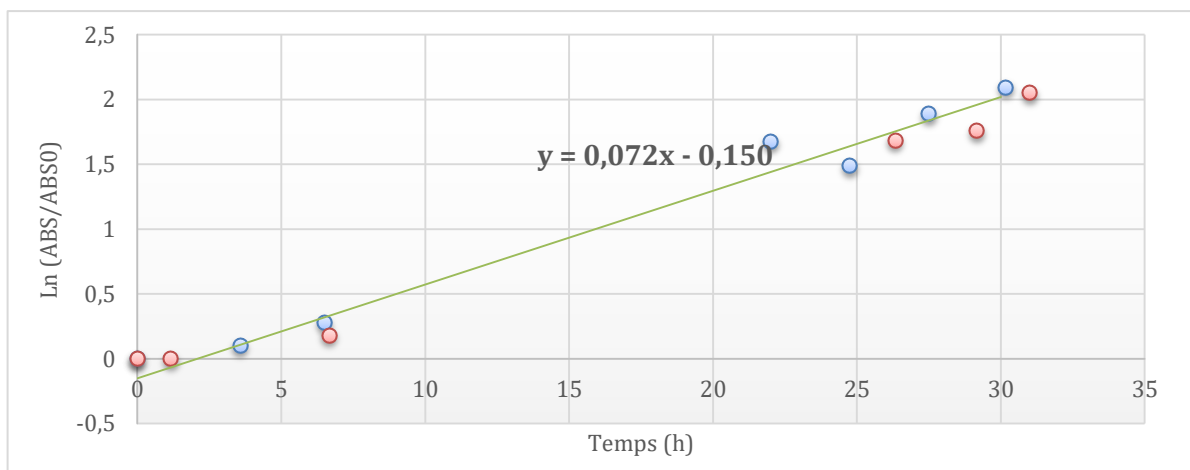


Figure 75 : Détermination des vitesses spécifiques de croissance par la représentation du logarithme népérien du rapport de l'absorbance du milieu à 600 nm sur l'absorbance initiale des de la condition d'aération par bullage à l'aide du diffuseur annulaire à 0,1 VVm en duplicats.

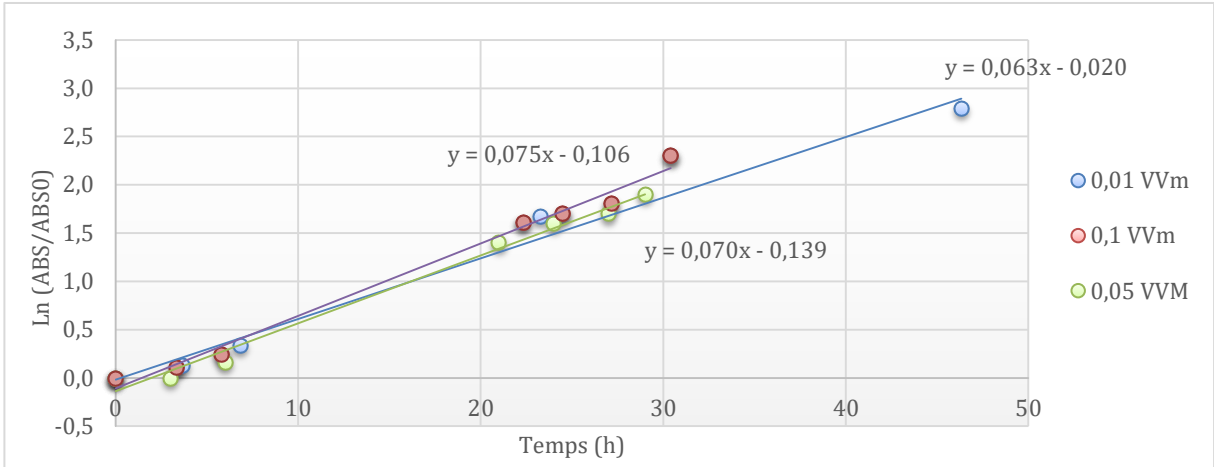


Figure 76 : Détermination des vitesses spécifiques de croissance par la représentation du logarithme népérien du rapport de l'absorbance du milieu à 600 nm sur l'absorbance initiale des trois conditions d'aération par le micro diffuseur à 0,1 ; 0,05 et 0,01 VVm.

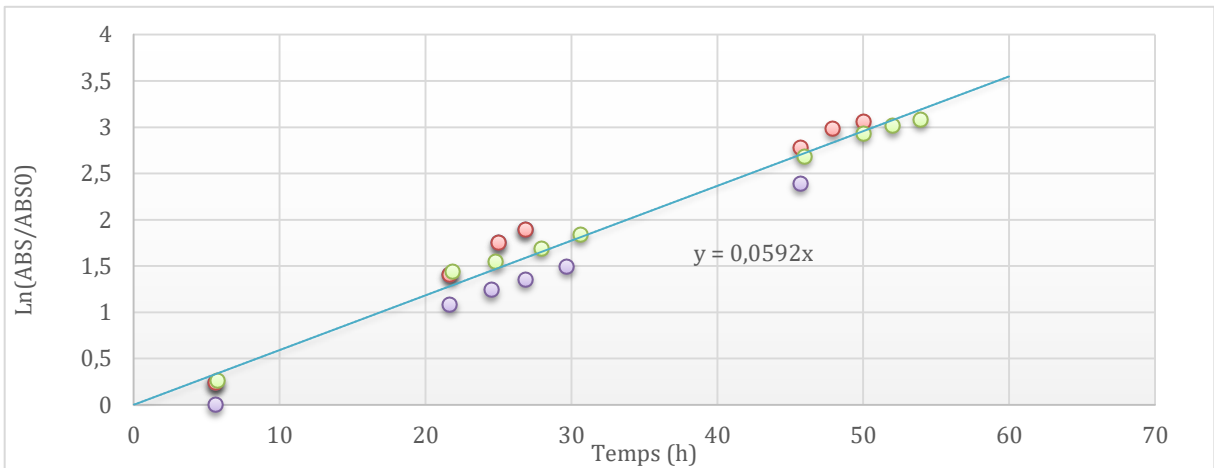


Figure 77 : Détermination des vitesses spécifiques de croissance par la représentation du logarithme népérien du rapport de l'absorbance du milieu à 600 nm sur l'absorbance initiale de la condition d'aération par le micro diffuseur à 0,02 VVm des quatre réplicats.

On trouve donc les valeurs suivantes :

	Balayage	Bullage	Microaération			
Débit d'air	0,2 VVm	0,1 VVm	0,01 VVm	0,02 VVm	0,05 VVm	0,1 VVm
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0,074	0,072	0,063	0,059	0,070	0,075
Temps de doublement (h)	9,4	9,6	11,0	11,7	9,9	9,2

## Annexe 4 : Calcul de l'évaporation d'éthanol dans le réacteur avec condenseur

On peut représenter le montage par la figure ci-dessous :

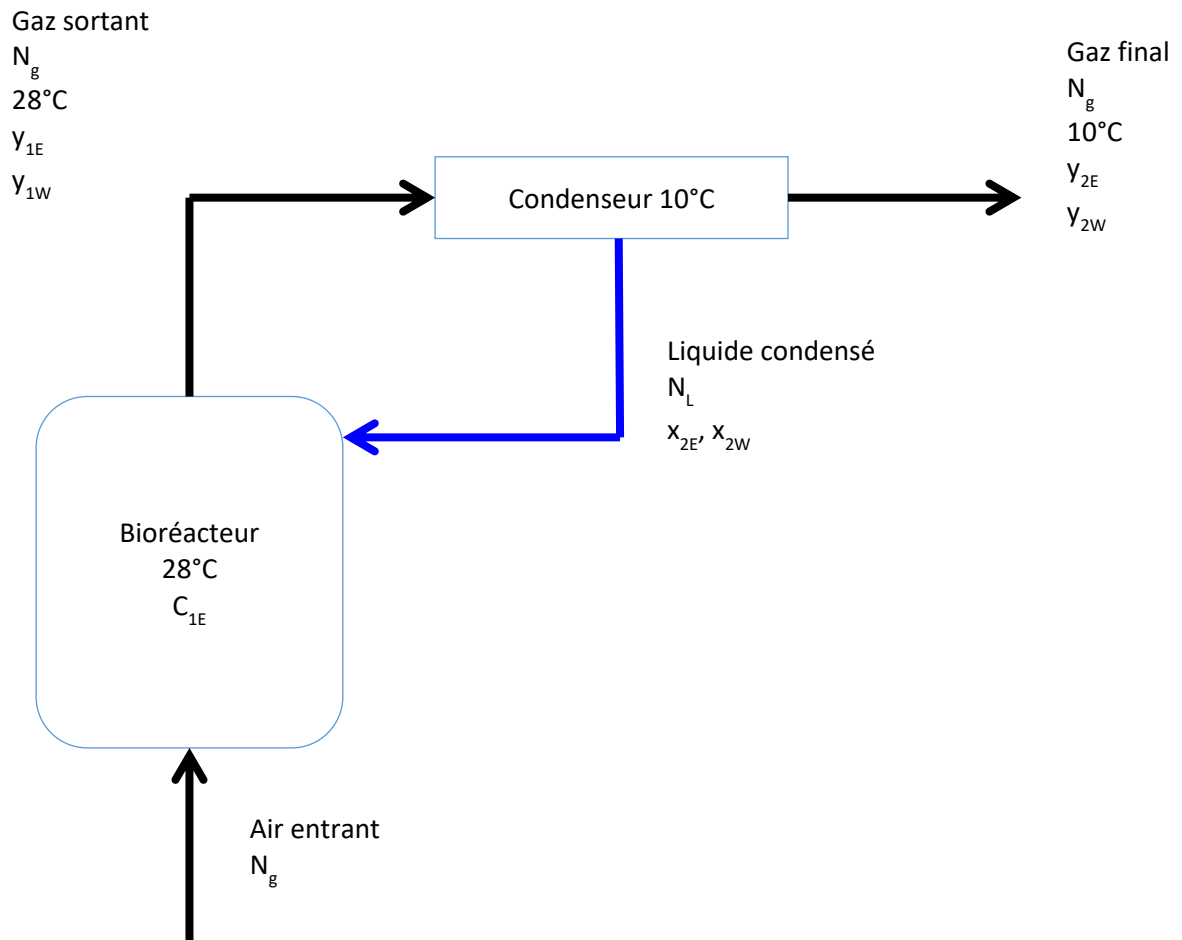


Figure 78 : Montage bioréacteur-condenseur

*Notations:*

- $N_g$  : débit molaire d'air (mol/h)
- $N_L$  : débit molaire de liquide condensé (mol/h)
- $C_{1E}$  : concentration d'éthanol dans le bioréacteur (g/L)
- $y_{1E}$  et  $y_{1W}$  : fractions molaires d'éthanol et d'eau dans le gaz sortant du bioréacteur
- $y_{2E}$  et  $y_{2W}$  : fractions molaires d'éthanol et d'eau dans le gaz sortant du condenseur
- $x_{2E}$  et  $x_{2W}$  : fractions molaires d'éthanol et d'eau dans le liquide sortant du condenseur

*Hypothèses :*

- Seuls l'éthanol et l'eau sont condensés :  $x_{2E} + x_{2W} = 1$

- Ce liquide reste assez dilué en éthanol :  $x_{2E}$  assez faible (à vérifier a posteriori)
- L'équilibre est réalisé entre le gaz sortant du bioréacteur et le milieu de culture à 28°C: saturation du gaz en vapeur d'eau et loi de Henry pour l'éthanol
- L'équilibre est réalisé entre le gaz et le liquide sortant du condenseur à 10°C: saturation en vapeur d'eau du gaz et loi de Henry pour l'éthanol
- Pressions des gaz constantes et égales à 1 atm

*Validation de l'utilisation de la loi de Henry pour l'éthanol*

La validité d'une loi de type Henry a été vérifiée grâce à des résultats d'évaporation d'éthanol obtenus par Brandam *et al.* (2013), la concentration d'éthanol a été suivie en fonction du temps pour différents débits d'air, lors d'une culture à 20°C et un condenseur à une température de 18°C.

Le bilan d'éthanol sur le réacteur est entre  $t$  et  $t + dt$  :  $-V dC_E / 46 = N_g y_E dt$

Et à tout instant on a équilibre entre les deux phases :  $y_E = k x_E$

La relation entre  $C_E$  et  $x_E$  est donnée par  $x_E = C_E / 46 / 55,5$

Il vient :  $-V dC_E = N_g k x_E dt = N_g k \frac{C_E}{55,5} dt$

Donc :  $\ln \left[ \frac{C_E}{C_{E0}} \right] = - \frac{N_g k}{V 55,5} t$

On porte  $\ln (C_E/C_{E0})$  en fonction du temps pour les trois débits d'air.

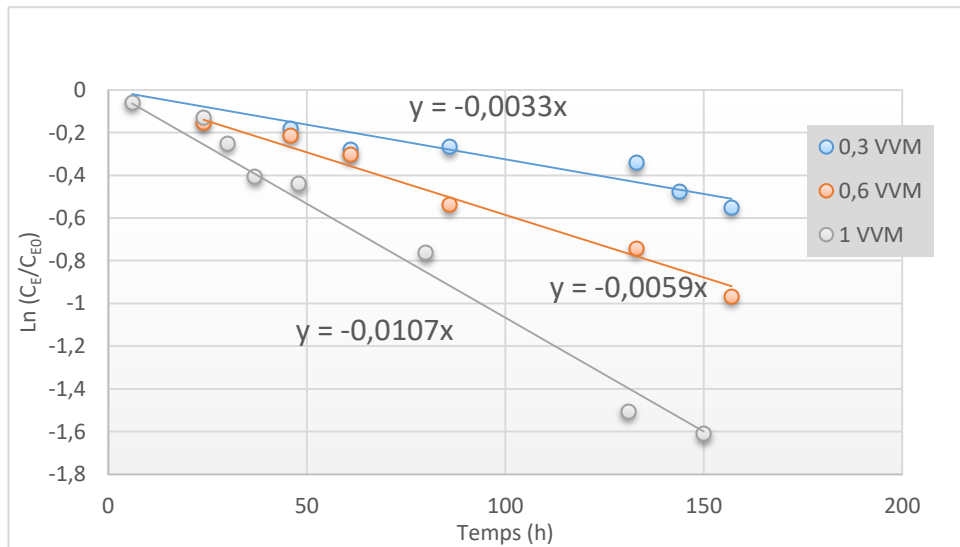


Figure 79 : Modèle d'évaporation d'éthanol

On obtient des droites ce qui valide le modèle. Les pentes des droites obtenues doivent être proportionnelles au débit  $N_g$ , donc à la valeur en VVm, comme on le vérifie bien sur la figure ci-dessous :

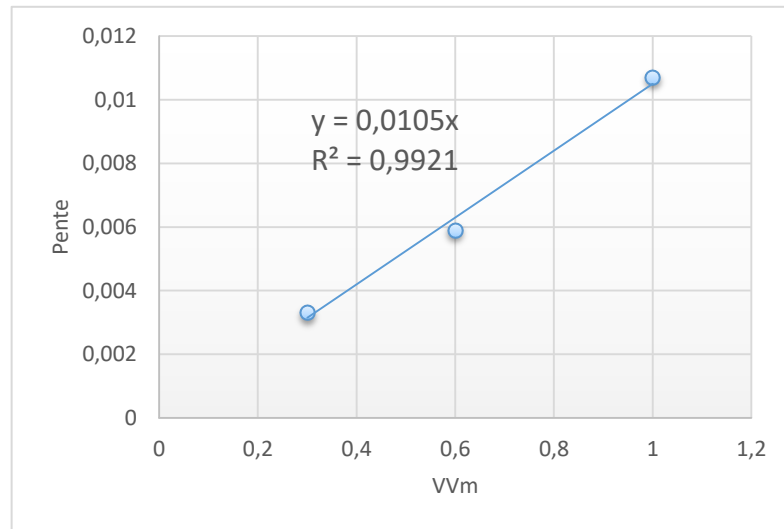


Figure 80 : Variation de la pente de  $\ln(CE/CE_0) = f(t)$  en fonction du débit d'air

On peut remonter à la valeur du coefficient d'équilibre  $k$ , soit 0,23, correspondant à peu près à une température de 19°C, ce qui valide bien le modèle.

#### Calcul de l'évaporation dans nos essais

Le calcul des coefficients de Henry de l'éthanol aux deux températures donnent les valeurs suivantes (Sander, 2015), pour une loi de la forme  $y_E = k x_E$

$$k_{28} = 0,305 \text{ et } k_{10} = 0,098$$

$$\text{On a donc : } y_{1E} = k_{28} x_{1E} \text{ et } y_{2E} = k_{10} x_{2E}$$

Les pressions partielles de l'eau dans les deux gaz sont égales aux pressions de vapeur saturante aux températures correspondantes,  $p_w^\circ(28)$  et  $p_w^\circ(10)$ ; les fractions molaires correspondantes sont obtenues en divisant les pressions de vapeur saturante par la pression totale (1 atm). On obtient :  **$y_{1w} = 0,035$  et  $y_{2w} = 0,0051$**

*Bilans matière sur le condenseur :*

$$\text{Ethanol : } N_g y_{1E} = N_g y_{2E} + N_L x_{2E}$$



$$\text{Eau : } N_g y_{1w} = N_g y_{2w} + N_L (1 - x_{2E})$$

Nous allons faire le calcul dans le cas le plus défavorable, c'est à dire pour le plus grand débit d'air (0,1 VVm), ce qui donne pour un volume de 5 L, un débit de 0,5 L/min ou 30 L/h à 28°C. Le débit molaire  $N_g$  est donc de 1,2 mol/h.

De la même façon nous nous plaçons à une concentration importante d'éthanol, 80 g/L, ce qui correspond à une fraction molaire  $x_{1E}$  de 0,031. On peut donc calculer  $y_{1E} = \mathbf{0,011}$ .

Il reste trois inconnues :  $N_L$ ,  $x_{2E}$  et  $y_{2E}$

Les deux bilans matière et la loi de Henry du condenseur permettent de les calculer. On obtient :  $x_{2E} = \mathbf{0,0106}$   $y_{2E} = \mathbf{0,0010}$

Le débit molaire d'éthanol évaporé est donc :  $N_g y_{2E} = 1,2 \cdot 10^{-3}$  mol/h.

Le nombre de moles présentes dans le réacteur pour 80 g/L d'éthanol est de 8,7 mol. Si on calcule le nombre de moles évaporées sur 150 h pour une concentration d'éthanol de 80 g/L (en fait la concentration est la plupart du temps très inférieure à 80 g/L), on trouve 0,18 mol, soit 2% de la quantité totale.

*L'évaporation est toujours très faible grâce au condenseur, nous la négligerons donc.*

## Annexe 5 : Détermination des rendements éthanol à partir du glucose

On utilise un modèle très simple selon lequel les deux réactions de production de biomasse et de production d'éthanol à partir de glucose sont du premier ordre. On supposera en première approximation que la concentration d'oxygène dissous est à peu près constante dans le temps.

$$\frac{dX}{dt} = k_1 G X \qquad \frac{dE}{dt} = k_2 G X$$

avec X, G et E : concentrations de la biomasse, du glucose et de l'éthanol à t ;  $k_1$  et  $k_2$  constantes de vitesse, avec  $k_1$  qui dépend de l'oxygénation, contrairement à  $k_2$ .

$$\text{Il vient : } \frac{1}{k_1} \frac{dX}{dt} = \frac{1}{k_2} \frac{dE}{dt} \qquad \text{donc } X - X_0 = \frac{k_1}{k_2} (E - E_0)$$

$$\text{Par ailleurs un bilan sur le glucose donne : } \frac{dG}{dt} = -Y_{GX} k_1 G X - Y_{GE} k_2 G X$$

avec  $Y_{GX}$  et  $Y_{GE}$  les rendements glucose par rapport à la biomasse et à l'éthanol.

$$\text{Soit : } \frac{dG}{dt} = -Y_{GX} \frac{dX}{dt} - Y_{GE} \frac{dE}{dt}$$

$$\text{et en intégrant : } G_0 - G = -Y_{GX} (X - X_0) - Y_{GE} (E - E_0)$$

$$\text{Finalement il vient : } G_0 - G = - \left( Y_{GX} \frac{k_1}{k_2} + Y_{GE} \right) (E - E_0)$$

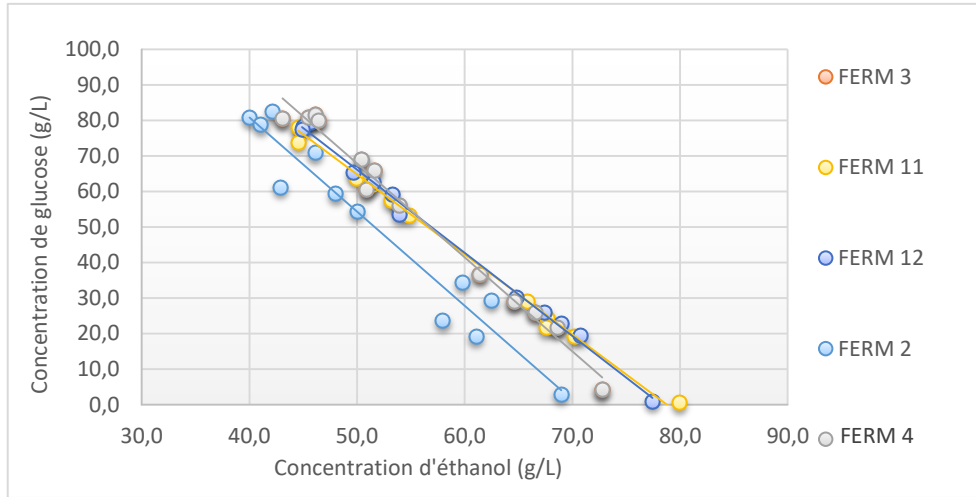


Figure 81 : Détermination du rendement éthanol sur glucose pour la condition d'aération à 0,2 VVm par balayage de la tête de cuve.

Les pentes obtenues (en g glucose par g d'éthanol) pour les conditions de balayage sont de : 2,63 ; 2,64 ; 2,53 ; 2,33 ; 2,34, montrant la validité du modèle et la bonne reproductibilité des essais.

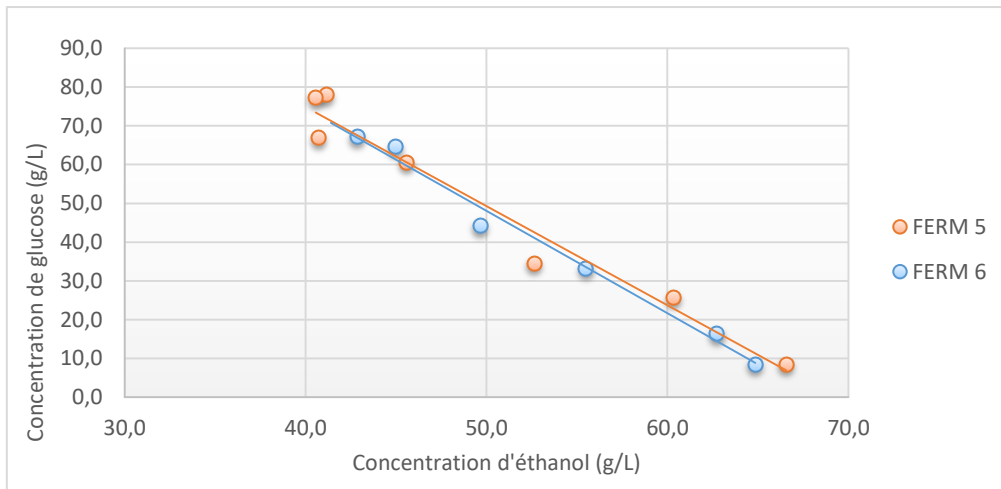


Figure 82 : Détermination du rendement éthanol sur glucose pour la condition d'aération à 0,1 VVm par le diffuseur annulaire.

Les pentes obtenues (en g glucose par g d'éthanol) pour les conditions bullage sont de 2,56 et 2,64. On observe ici aussi la validité du modèle et une excellente reproductibilité.

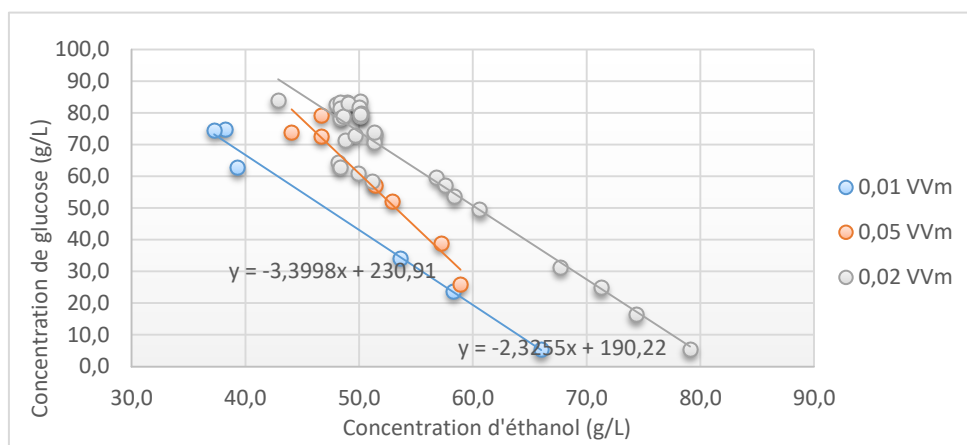


Figure 83 : Détermination du rendement éthanol sur glucose pour la condition d'aération à 0,01 ; 0,02 ; 0,05 VVm par le micro diffuseur.

Les pentes obtenues (en g glucose par g d'éthanol) sont de 2,36 pour 0,01 VVm ; 2,33 pour 0,02 VVm et 3,40 pour 0,05 VVm. On constate que la condition à 0,05 VVm donne une pente assez différente des autres, plus importante, liée à une aération meilleure, donc une constante  $k_1$  plus élevée.

Les valeurs des pentes sont regroupées dans le tableau suivant :

	Valeur de la pente (g glucose/g éthanol)	Valeur moyenne
Balayage 2	2,63	2,49
Balayage 3	2,64	
Balayage 4	2,53	
Balayage 11	2,33	
Balayage 12	2,34	
Bullage 5	2,56	2,60
Bullage 6	2,64	
Micro aération 0,01 VVm	2,36	2,36
Micro aération 0,02 VVm	2,33	2,33
Micro aération 0,05 VVm	3,40	3,40

## Annexe 6 : Dessin de la cuve de stockage et mélange du milieu d'alimentation d'une contenance de 1000 litres

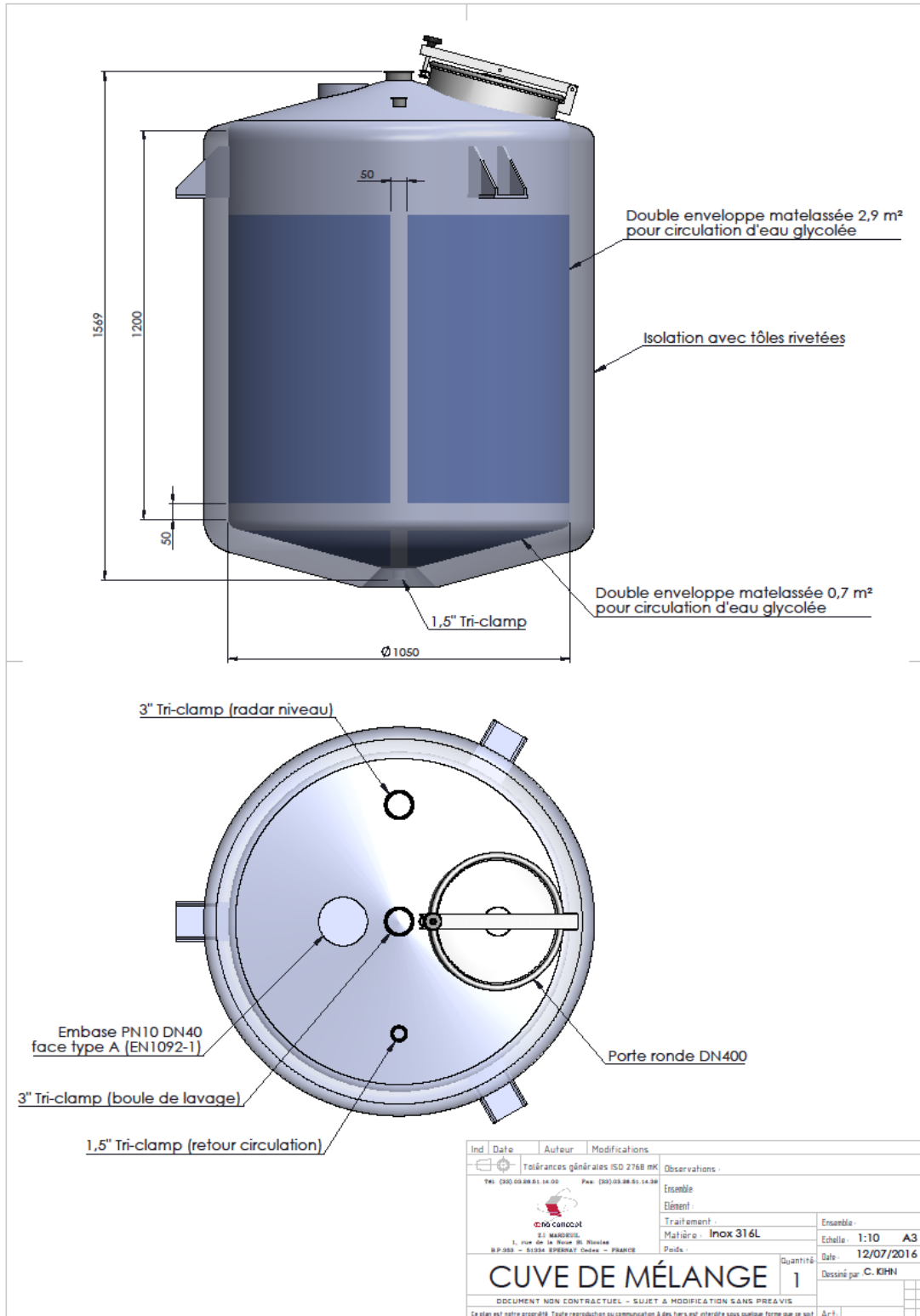


Figure 84 : Schéma de la cuve de mélange du pilote.

## Annexe 7 : Dessin de la cuve de croissance d'une contenance de 800 litres

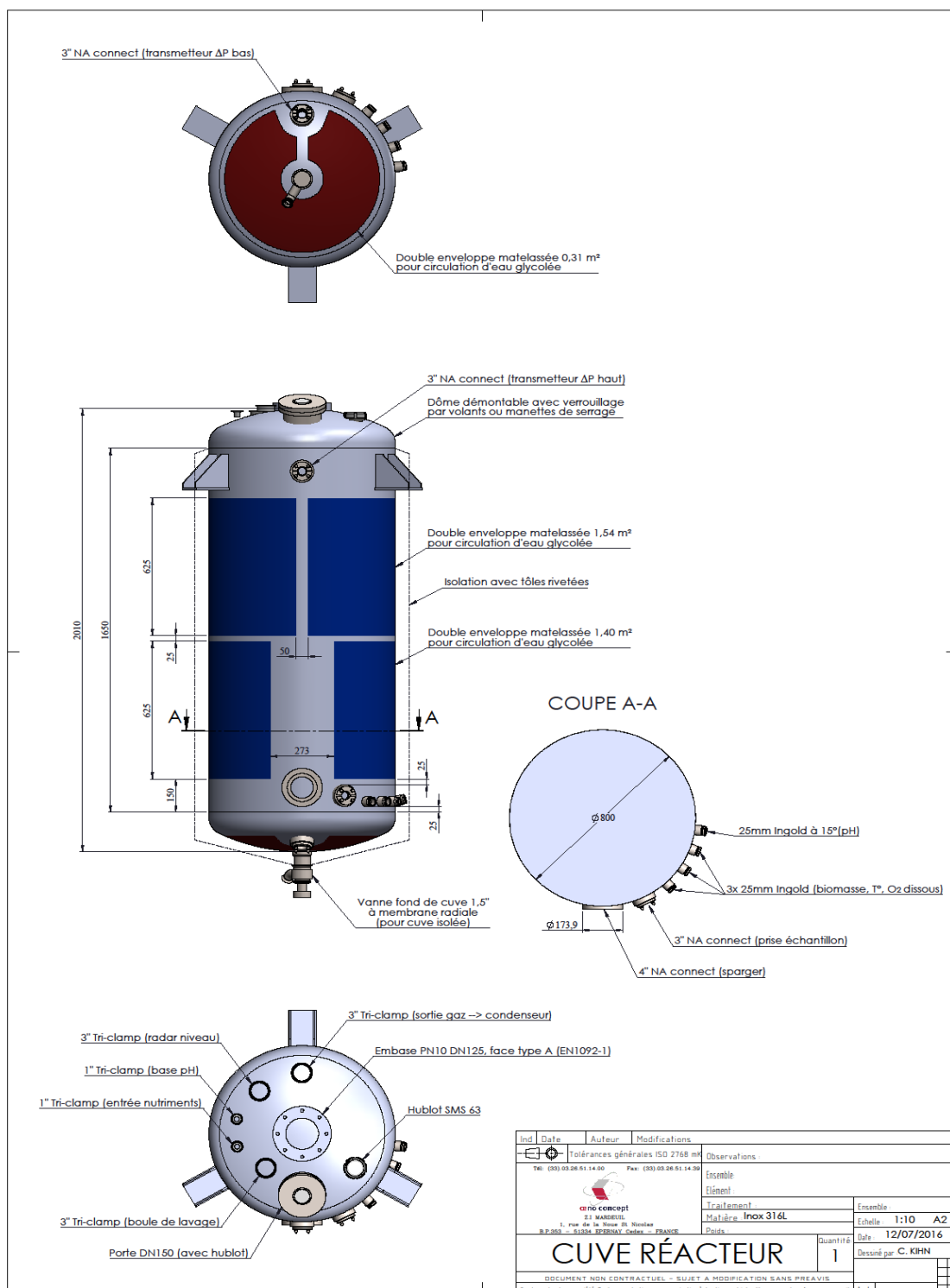


Figure 85 : Schéma de la cuve de propagation du pilote

## Annexe 8 : Représentation graphique de l'évolution du nombre de levures et de leur taille lors des prélèvements quotidiens lors d'un essai de fermentation aérée à 0,1VVM

La couleur jaune représente le comptage après l'inoculation (environ 12 millions de levures par millilitre), puis en allant vers le « fond » du graphique (axe z), bleu clair, marron, bleu ciel, violet, vert clair, rouge et bleu foncé, représentent l'évolution de la culture au cours de l'étude allant jusqu'à une concentration finale d'environ 450 millions de levures par millilitre.

Sur cette représentation graphique, on voit très distinctement que la quantité de levure augmente en diminuant de taille en allant du bleu clair au bleu foncé et deux populations apparaissent, certainement cellules mère et fille.

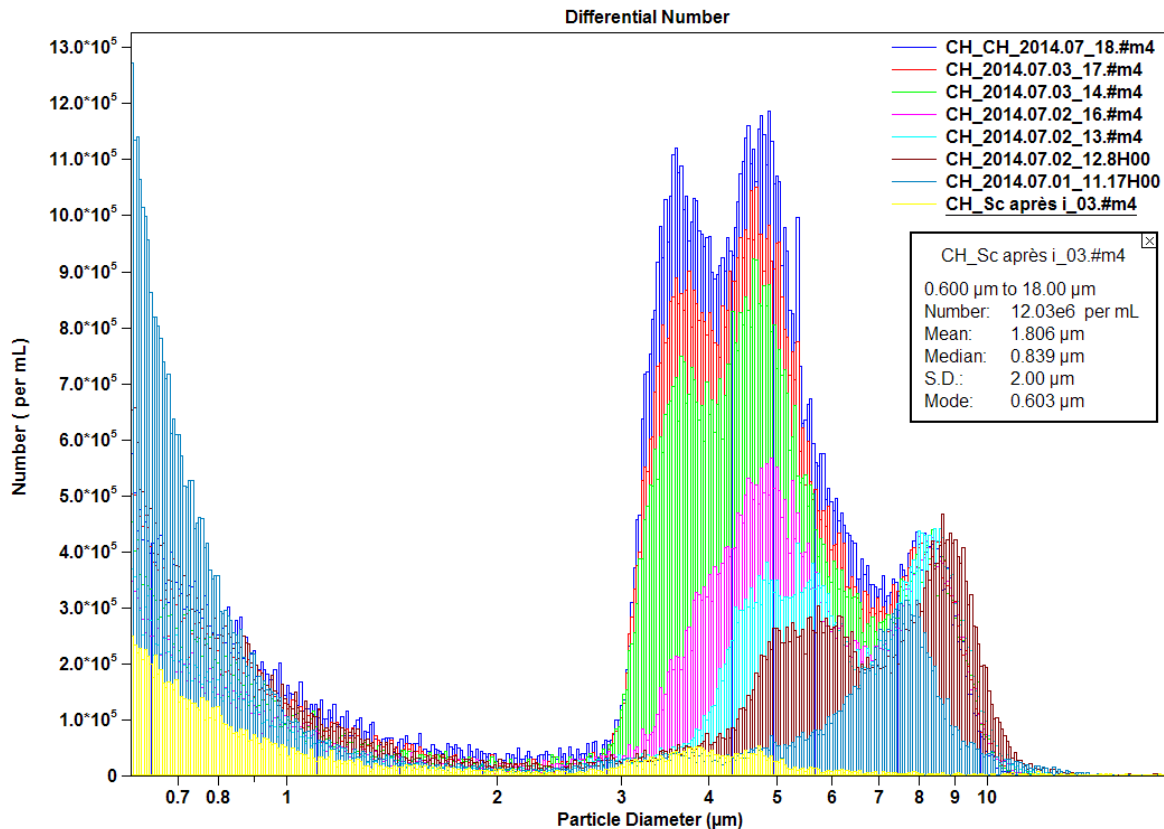


Figure 86 : Exemple de graphique suite aux comptages réalisés par le compteur de particules.

## Annexe 9 : Glossaire

<b>Aérobic</b>	Terminologie appliquée au niveau de la biologie désignant la nécessité d'un micro-organisme de se développer dans un milieu saturé en oxygène (métabolisme qui nécessite de l'oxygène)
<b>Alicament</b>	Aliment combinant les propriétés d'un aliment et d'un médicament et permettant de réduire ou de prévenir l'apparition de certaines maladies
<b>Anaérobic</b>	Terminologie appliquée au niveau de la biologie désignant la capacité d'un micro-organisme à se développer dans un milieu ne contenant pas ou peu d'oxygène
<b>Autoclave</b>	Enceinte hermétique permettant d'assurer la stérilisation par voie thermique, sous pression et grâce à la vapeur d'eau (121°C ; 1,2 bar ; 20 min)
<b>Autotrophe</b>	Mode de nutrition d'un organisme capable de synthétiser la matière organique à partir d'une source de carbone inorganique (CO <sub>2</sub> /CO)
<b>Eucaryote</b>	Organismes ayant une structure complexe contenant un noyau entouré d'une membrane ainsi que plusieurs organites intracellulaires
<b>Hétérotrophe</b>	Mode de nutrition d'un organisme capable d'assimiler le carbone organique préexistant obtenu à partir d'autres organismes (vivant ou mort)
<b>Incubateur</b>	Une enceinte à environnement contrôlé permettant la croissance des pré-cultures
<b>Inoculum</b>	Echantillon de micro-organismes susceptible d'être introduit dans un milieu de culture à un temps initial
<b>Levurien</b>	Néologisme constituant l'adjectif de levure, au même titre que bactérien pour une bactérie.
<b>Maintenance</b>	Energie consommée pour des fonctions autres que celles destinées à la synthèse de matière pour de nouvelles cellules. Energie nécessaire pour la réparation des dommages cellulaires, transfert de nutriment et de produit à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule et pour réguler l'osmolarité du volume intérieur des cellules.
<b>Membrane plasmique</b>	Membrane qui délimite la cellule et qui la sépare de son milieu extérieur
<b>Métabolite</b>	Composé organique intermédiaire ou issu de la transformation biochimique d'une molécule initiale par le métabolisme
<b>Mitochondries</b>	Organites considérés comme les sources énergétiques des cellules eucaryotes
<b>Osmorégulation</b>	Ensemble de réactions responsables de la pression osmotique et de la régulation de la concentration de sels dissous à son niveau normal dans les fluides internes d'un être vivant
<b>Produit inhibiteur</b>	Produit généré qui à forte concentration induit une diminution de la vitesse de croissance cellulaire
<b>Substrat limitant</b>	Substrat qui est susceptible de disparaître le plus rapidement possible et qui limite la vitesse de croissance
<b>Temps de séjour</b>	Temps moyen de résidence d'une molécule dans le réacteur



**Titre :** Instrumentation, modélisation et automatisation de fermenteurs levuriers à destination œnologique

**Mots clés :** Micro-organisme ; levure ; fermentation ; bioréacteur batch et fed-batch

**Résumé :** Le vin est un milieu peu propice à la croissance de la levure mais il est néanmoins possible de la faire croître sur base de vin enrichi en nutriments et dilué pour diminuer la concentration en éthanol. En vue de l'élaboration des vins effervescents par une seconde fermentation, produire la levure *Saccharomyces cerevisiae* dans ces conditions est indispensable pour l'acclimater mais il s'agit d'un enjeu complexe qui doit prendre en compte de nombreux paramètres physico-chimiques mais aussi économiques. En effet, les paramètres opératoires peuvent induire des conditions de croissance pouvant affecter le développement de la levure. Seule la levure *S. cerevisiae* (Fizz+) a été utilisée car elle est spécialement sélectionnée pour cette seconde fermentation en vase clos. Le principal enjeu était donc d'obtenir une bonne adaptation de la levure à croître dans un milieu hydro-alcoolique, conditions contraignantes pour elle, mais aussi d'obtenir une production maximale. Nous avons tout d'abord étudié en fioles Erlenmeyer (250 mL) l'influence de divers paramètres : conditions physico-chimiques, concentrations en nutriments, concentration minimale en levure sèche active nécessaire à une bonne activité ainsi que son temps de réhydratation. Dans un deuxième temps, nous avons effectué des

propagations en mode batch dans un bioréacteur (5 L) pour valider les conclusions réalisées à la suite de l'étude en Erlenmeyer et ainsi étudier l'influence de différentes aérations sur la production de *S. cerevisiae*. Les données obtenues ont servi de base pour comparer les améliorations apportées par le procédé développé en mode fed-batch. Les concentrations en levures obtenues suite à l'optimisation des conditions du milieu de culture en cinq litres sont supérieures d'un facteur cinq à celles obtenues dans la pratique en cave. Ensuite l'étude s'est concentrée sur le développement d'un nouveau procédé d'alimentation en nutriments pour cultiver *S. cerevisiae* en métabolisme respiratoire dans des cuves réalisées par la société partenaire du projet, Ceno Concept. La nouveauté réside dans la façon de réguler la température de la culture qui se fait simultanément à l'apport des nutriments suite au dégagement de chaleur lors de la croissance de *S. cerevisiae*. Un brevet a été déposé sur cette technologie.

Ce nouveau procédé a permis une augmentation de la productivité cellulaire, d'un facteur supérieur à quatre, car il a permis aux levures de s'adapter à cet environnement stressant et a favorisé l'oxydation du glucose au détriment de la fermentation.

**Title:** Instrumentation, Modeling and Automation yeast Fermentors

**Keywords:** Microorganism; yeast; fermentation; batch and fed-batch bioreactor

**Abstract:** Wine is an aggressive/stressful growth medium; it is depleted of micronutrients, rich in ethanol and very poor in assimilable nitrogen. Despite all these difficulties, it is possible to grow yeast in a medium largely based on wine by diluting the ethanol concentration and enriching the medium with micronutrients, a carbon source and assimilable nitrogen. It is, desirable to propagate *Saccharomyces cerevisiae* in such environment in order to produce a culture of yeast adapted to a second fermentation of alcoholic beverages. Production of microorganism in wine growing environment, is a complex issue that must take into account many, physicochemical and economic parameters. Indeed, the operating parameters can affect the development of yeast in a bioreactor. Therefore, it is important to know the most influential parameters on growth. The strain *S. cerevisiae* (Fizz<sup>+</sup>), a commercial strain that has been selected for the second fermentation in bottles, was used during this project. The propagation process served to increase the amount of yeast as well as to adapt the yeast to grow in an alcoholic environment. We first studied in shake-flasks cultures various physicochemical conditions such as nutrients

concentration, the rehydration time and the minimum concentration of active dry yeast necessary for good yeast activity.

In a second step, we performed batch fermentations in bioreactors (5 L) to confirm the conclusions from the shake-flask cultures and additionally to study the influence of aeration on *S. cerevisiae* production. The data obtained served as a basis for performing fed-batch cultures. The yeast concentrations obtained as a result of the optimization of the conditions of the culture medium in five liters were five times greater than those obtained in actual industrial production processes.

The next step was to develop an automated fed-batch culture to grow *S. cerevisiae* respiratively in partnership with the industrial partner of the project, Ceno Concept. The novelty of the process is the way in which the growth medium feed-rate is linked to the heat produced by the growing *S. cerevisiae*.

This research has allowed an increase in cell productivity, by a factor greater than four, thanks to the novel process in stressful growth environment promoting respiration with regard to fermentation.

