Modélisation de la synthèse des arômes durant la vinification

François Beaudeau

▶ **To cite this version:**

François Beaudeau. Modélisation de la synthèse des arômes durant la vinification. Microbiologie et Parasitologie. INSA de Toulouse, 2022. Français. NNT : 2022ISAT0049 . tel-04164410

HAL Id: tel-04164410
https://theses.hal.science/tel-04164410

Submitted on 18 Jul 2023

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.

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse

Présentée et soutenue par

François BEAUDEAU

Le 15 décembre 2022

Modélisation de la synthèse des arômes durant la vinification

Ecole doctorale : **SEVAB - Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingenieries**

Spécialité : **Ingénieries microbienne et enzymatique**

Unité de recherche :
TBI - Toulouse Biotechnology Institute, Bio & Chemical Engineering

Thèse dirigée par
César Arturo ACEVES-LARA et Carine BIDEAUX

Jury

M. Olivier BERNARD, Rapporteur
M. Alberto TONDA, Rapporteur
M. Alain VANDE WOUWER, Rapporteur
M. César Arturo ACEVES-LARA, Directeur de thèse
Mme Carine BIDEAUX, Co-directrice de thèse
Mme Carole MOLINA-JOUVE, Présidente

Résumé

Même si la viticulture représente une faible part de la surface agricole mondiale, le marché du vin représente une part importante de la valeur économique de la production agricole. La fermentation alcoolique, étape clé de la vinification, fait l'objet de recherche pour améliorer les qualités du vin. Dans ce contexte, le projet StarWine a pour but d'améliorer les connaissances de l'effet de l'azote initial et ajouté et de la température sur la production d'arômes pendant la fermentation alcoolique et de proposer une stratégie de conduite pour contrôler le profil aromatique du vin. Cette thèse a eu pour but de construire un modèle de la synthèse des arômes prenant en compte la température et un ajout d'azote pendant la fermentation, modèle qui sera utilisé pour construire la loi de commande pour la gestion du profil aromatique des vins. Il existe peu de modèle, dans la littérature, de la cinétique principale et un seul modèle de la synthèse des arômes lors de la fermentation œnologique. De plus, aucun de ces modèles ne prend en compte l'ajout d'azote en cours de fermentation alors que c'est une pratique courante chez les vignerons. Le modèle construit durant cette thèse ne prend en compte que cinq arômes (alcool isoamylique, isobutanol, acétate d'isoamyle, hexanoate d'éthyle et octanoate d'éthyle) ayant une grande importance sur le profil aromatique du vin et considérés comme représentatifs de l'ensemble des arômes. La calibration et la validation du modèle ont été effectuées grâce à des données de fermentations réalisées au laboratoire SPO de l'INRAe de Montpellier et à l'unité expérimentale Pech Rouge de l'INRAe à Gruissan. Les fermentations ont été réalisées avec la souche EC1118 de la levure œnologique *Saccharomyces cerevisiae*, à différentes températures (entre 18 et 28°C), avec différentes concentrations initiales en azote (de 70 à 210 mg/L) et des ajouts d'azote réalisés à 20 g/L de CO_2 dégagé de différentes concentrations (entre 50 et 150 mg/L). Dans un premier temps, deux modèles de la cinétique principale ont été élaborés (consommations du sucre et de l'azote et productions de la biomasse, de l'éthanol et du CO_2) pour des fermentations à 24°C. Ces modèles considèrent l'azote intracellulaire, ce qui permet d'avoir une croissance résiduelle malgré la carence en azote, et l'activité cellulaire qui permet de tenir compte de la perte d'activité métabolique en cours de fermentation. Un modèle a été sélectionné par rapport à l'adéquation aux données de validation et à la sensibilité des modèles. Puis l'effet température sur la cinétique principale a été intégrée dans ce modèle. Ce modèle permet de simuler correctement les cinétiques principales lors de fermentations œnologiques anisothermes. Un modèle de la synthèse des arômes a ensuite été construit pour compléter le modèle de la cinétique principale. Pour les cinq arômes, le modèle élaboré présente une discontinuité lors de l'ajout d'azote. Un modèle sans discontinuité a été également proposé pour l'acétate d'isoamyle mais il présente des capacités de prédiction moins bonnes que le modèle avec discontinuité. Le modèle complet (cinétique principale et production des arômes) permet de simuler de manière correcte les productions de CO_2, éthanol, acétate d'isoamyle, isobutanol, alcool isoamylique et hexanoate d'ethyle pour des fermentations isothermes entre 18 et 28°C. Par contre il devra être modifié pour améliorer la prédiction des concentrations en octonoate d'éthyle et également pour la prise en compte de la variation de température en cours de fermentation.

Abstract

Even if viticulture represents a small part of the world's agricultural surface, the wine market represents an important part of the economic value of agricultural production. Alcoholic fermentation, a key step in wine making, is the subject of research to improve the qualities of wine. In this context, the StarWine project aims to improve the knowledge of the effect of initial and added nitrogen and temperature on the production of aromas during alcoholic fermentation and to propose a strategy to control the aromatic profile of wine. The aim of this thesis was to build a model of aroma synthesis considering temperature and nitrogen addition during fermentation, which will be used to build the control law for the management of the wine aroma profile. In the literature there are few models of the main kinetics of oenological fermentation and only one model of the synthesis of aromas during the oenological fermentation. Moreover, none of these models considers the addition of nitrogen during fermentation, although this is a common practice among winemakers. The model built during this thesis only considers five aromas (isoamyl alcohol, isobutanol, isoamyl acetate, ethyl hexanoate and ethyl octanoate) which are of great importance on the aromatic profile of the wine and considered as representative of all aromas. The calibration and validation of the model were carried out using fermentation data from the SPO laboratory of INRAe in Montpellier and the Pech Rouge experimental unit of INRAe in Gruissan Fermentations were made with the EC1118 strain of the oenological yeast *Saccharomyces cerevisiae*, at different temperatures (between 18 and 28°C), with different initial nitrogen concentrations (from 70 to 210 mg/L) and nitrogen additions made at 20 g/L of released CO_2 of different concentrations (between 50 and 150 mg/L). First, two models of the main kinetics were developed (sugar and nitrogen consumption and biomass, ethanol and CO_2 production) for fermentations at 24°C. These models consider the intracellular nitrogen, which allows to have a residual growth in spite of the nitrogen deficiency, and the cellular activity which allows to consider the loss of metabolic activity during fermentation. A model was selected based on fit to validation data and model sensitivity. Then the temperature effect on the main kinetics was integrated in this model. This model allows to simulate correctly the main kinetics during anisothermal oenological fermentations. An aroma synthesis model was then built to complete the main kinetics model. For the five aromas, the model developed shows a discontinuity upon the addition of nitrogen. For isoamyl acetate, a model without discontinuity was also proposed but it presents less good prediction capabilities than the model with discontinuity. The complete model (main kinetics + aroma production) allows to simulate correctly the production of CO_2, ethanol, isoamyl acetate, isobutanol, isoamyl alcohol and ethyl hexanoate for isothermal fermentations between 18 and 28°C. However, it should be improved for the prediction of ethyl octonoate concentrations and also for considering the temperature variation during the fermentation.

Table des matières

Résumé....1
Abstract....3
Liste des Figures....9
Liste des Tableaux....13
I. Introduction générale....15
II. Synthèse bibliographique....21
II.A. Fermentation alcoolique en conditions œnologiques....23
II.A.1. Généralités....23
II.A.1.a) Vinification....23
II.A.1.b) Milieu de fermentation....26
II.A.1.c) Suivi de fermentation....27
II.A.1.d) Fermentations lentes ou bloquées....27
II.A.2. Levures en conditions œnologiques....28
II.A.2.a) Généralités....28
II.A.2.b) Transporteurs des sucres....29
II.A.2.c) Impact de l'oxygène....29
II.A.2.d) Produits de la fermentation....29
II.A.3. Cinétique de fermentation....30
II.A.4. Impact de la température....32
II.A.5. Impact de l'azote....33
II.A.5.a) Azote dans le moût....33
II.A.5.b) Métabolisme de l'azote chez la levure....34
II.A.5.b.(1) Assimilation de l'azote....34
II.A.5.b.(2) Catabolisme de l'azote....35
II.A.5.b.(3) Importance de l'azote assimilable sur la cinétique fermentaire....35
II.B. Synthèse des arômes en condition œnologique....37
II.B.1. Voies de biosynthèse des arômes....38
II.B.1.a) Synthèse des alcools supérieurs....38
II.B.1.b) Synthèse des esters....39
II.B.2. Paramètres influençant la synthèse des arômes....39
II.B.2.a) Influence de la température....40
II.B.2.b) Influence de l'azote....40
II.B.2.b.(1) Formation des alcools supérieurs et des esters d'acétate....40

II.B.2.b.(2) Formation des esters d'éthyle....40
II.B.2.b.(3) Influence de l'azote sur la régulation des gènes ATF1 et ATF2....41
II.B.2.c) Influence de l'oxygène et des acides gras....41
II.B.3. Synthèse des arômes en fonction du temps....41
II.C. Modélisation....42
II.C.1. Présentation générale de la modélisation des cinétiques microbiennes....42
II.C.1.a) Différentes approches de modélisation....42
II.C.1.b) Modèles phénoménologiques....42
II.C.1.b.(1) Cinétiques de croissance de la biomasse....42
II.C.1.b.1.(a) Equation en fonction du substrat....43
II.C.1.b.1.(b) Equations qui prennent en compte une inhibition par les produits de fermentation 43
II.C.1.b.1.(c) Equations permettent d'intégrer la température (T) dans le taux de croissance 44
II.C.1.b.1.(d) Equations qui intègrent le pH....44
II.C.1.b.1.(e) Equations qui prennent en compte les composants du milieu de culture autre que le substrat carboné ou les produits....44
II.C.1.b.1.(f) Equations qui prennent en compte la lyse cellulaire....45
II.C.1.b.(2) Cinétique de production de métabolites....45
II.C.2. Modélisation de la fermentation alcoolique par la levure....46
II.C.3. Modèles de la production d'éthanol par *Saccharomyces cerevisiae*....47
II.C.3.a) Modèles en conditions œnologiques....47
II.C.3.a.(1) Modèle de Cramer....48
II.C.3.a.(2) Modèle de Malherbe....51
II.C.3.a.(3) Modèle de Brou....53
II.C.3.a.(4) Intégration de la saturation du milieu en CO_2....55
II.C.3.b) Modélisation de la production des arômes....57
II.C.3.b.(1) Production totale des arômes....57
II.C.3.b.(2) Pertes d'arômes par évaporation....59
II.C.3.b.(3) Concentrations liquides en arômes....60
II.D. Conclusion....61
III. Matériels et Méthodes....63
III.A. Levures....65
III.B. Milieu de culture....65
III.C. Conditions de fermentations....65
III.C.1. Réacteur 1L (SPO)....65
III.C.2. Réacteur 10L (PR)....65

III.D. Méthodes analytiques 66
III.D.1. Dégagement du CO_2 66
III.D.1.a) Réacteurs 1L (SPO) 66
III.D.1.b) Réacteur 10L (PR) 66
III.D.2. Biomasse 66
III.D.3. Azote assimilable 66
III.D.4. Arômes (PR) 66
III.E. Traitement des données expérimentales 66
III.E.1. Calcul de la vitesse de dégagement du CO_2 66
III.E.2. Calcul du CO_2 dégagé 66
III.E.3. Calcul de la concentration en arômes liquide 66
III.E.4. Calcul des pertes gazeuses en arômes 67
III.E.5. Calcul de la quantité d'arôme produit 67
III.F. Récapitulatif des fermentations 67
III.F.1. Fermentations utilisées pour le modèle de la cinétique principale 67
III.F.2. Fermentations utilisées pour le modèle de la production des arômes 68
III.G. Méthodes utilisées pour la modélisation 70
III.G.1. Calibration des paramètres 70
III.G.2. Analyse statistique 70
III.G.3. Analyse de la sensibilité 71
IV. Modèle de la cinétique principale 73
IV.A. Article de la cinétique principale 75
V. Abstract 77
V.A. Résultats supplémentaires à l'article 103
V.A.1. Résultats complémentaires pour la validation 103
V.A.2. Prédiction des valeurs de V_{max} et de t_{max} 110
V.A.2.a) Fermentations de calibration 111
V.A.2.b) Fermentations de validation 112
V.A.3. Choix du modèle 116
V.B. Intégration de l'effet de la température 117
V.B.1. Equations cinétiques du sucre et des transporteurs 117
V.B.2. Equation cinétique de l'azote 119
V.B.3. Activité cellulaire 120
V.B.4. Analyse de la calibration du modèle 120
V.B.5. Validation du modèle 129
V.B.5.a) Prédiction du CO_2 129

V.B.5.b) Prédiction des valeurs de V_{max} et de t_{max} 130
V.B.6. Conclusion 131
V.C. Conclusion 131
VI. Modélisation de la synthèse des arômes 133
VI.A. Modélisation de la synthèse de l'acétate d'isoamyle 136
VI.A.1. Construction des modèles 136
VI.A.1.a) Modèle avec discontinuité 136
VI.A.1.b) Modèle sans discontinuité 138
VI.A.2. Comparaison des données simulées aux données expérimentales des fermentations de calibration 140
VI.A.2.a) Simulation des fermentations de calibration 140
VI.A.2.a) Adéquation des modèles aux données de calibration 143
VI.A.3. Validation et comparaison des modèles 143
VI.A.4. Conclusion 145
VI.B. Modélisation de la synthèse des autres arômes 145
VI.B.1. Construction du modèle 145
VI.B.2. Simulation des fermentations de calibration 147
VI.B.1. Adéquation du modèle aux données de calibration 156
VI.B.2. Validation du modèle 158
VI.B.1. Conclusion 159
VI.C. Conclusion générale 161
VII. Conclusions et perspectives 163
VIII. Références bibliographiques 173

Liste des Figures

Figure II.1 Procédé de vinification pour les vins rouges (Penot, 2021) 24
Figure II.2 Procédé de vinification pour les vins blancs (Penot, 2021) 25
Figure II.3 Cinétique d'une fermentation réalisée pour une température de 23°C, une concentration initiale en azote de 210 mg/L et une concentration en sucre de 180 g/L avec la biomasse (en 109cellules/L) représentée en orange, l'azote (en g/L) en bleu, le CO2 dégagé (en g/L) en gris et la vitesse de dégagement de CO2 (en g/(L.h)) en jaune 31
Figure II.4 Variabilité, selon les moûts, de la vitesse maximale de production de CO2 (diagramme en barre) et de la vitesse spécifique maximale de production de CO2 (points) à 24°C (Bely et al., 1990b) 31
Figure II.5 Simulation de l'effet de la température de fermentation sur la vitesse de consommation du sucre. Les températures considérées sont 15°C, 18°C, 21°C, 24°C et 27°C (Goelzer et al., 2009) 32
Figure II.6 Variabilité de la concentration totale en azote de différents moûts issus de différentes régions viticoles françaises (Bely et al., 1990a) 34
Figure II.7 Interactions du métabolisme azoté avec d'autres voies métaboliques (Hough et al., 1982). 35
Figure II.8 Relation entre la vitesse maximale de production de CO2 et la teneur en azote assimilable à 24°C (Bely, 1990) 36
Figure II.9 Modification de la vitesse de production de CO2 par l'ajout de 300 mg/L de (NH4)2HPO4 à différents dégagement de CO2 (0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 et 70 g/L). L'azote initial est de 70 mg/L. (Malherbe et al., 2004) 36
Figure II.10 Schéma simplifié des voies métaboliques de production des arômes 38
Figure II.11 Voie de synthèse de l'alcool isoamylique et de l'isobutanol (Crépin et al., 2017; Zhang et al., 2008) 39
Figure II.12 Voie métabolique de formation d'esters d'éthyle (Hirst et al., 2016) 39
Figure II.13 Relations entre la température de fermentation et les valeurs de µmax (premier graphe), de k'd (deuxième graphe) et de βmax (troisième graphe). Chaque point représente l'estimation du paramètre pour chaque fermentation de calibration avec l'intervalle de confiance à 95% (barre verticale), La ligne continue représente la surface de régression et les lignes pointillées l'intervalle de confiance à 95% de la surface de régression (Coleman et al., 2002) 50
Figure II.14 Relation entre l'azote initial et la valeur de YX/N. Chaque point représente l'estimation de YX/N pour chaque fermentation de calibration avec l'intervalle de confiance à 95% (barre verticale), La ligne continue représente la surface de régression et les lignes pointillées l'intervalle de confiance à 95% de la surface de régression (Coleman et al., 2002). 50
Figure II.15 Relations entre la température de fermentation et les valeurs de KN (premier graphe), de KS (deuxième graphe) et de YES (troisième graphe). Chaque point représente l'estimation du paramètre pour chaque fermentation de calibration avec l'intervalle de confiance à 95% (barre verticale). (Coleman et al., 2002) 51
Figure II.16 Solubilité du CO2 (en taux molaire) dans l'eau à la pression atmosphérique (101,325 kPa) en fonction de la température (Carroll et al., 1991). Les deux graphes représentent le modèle de Carroll et al. (1991) avec des données expérimentales issues de publications différentes. 56
Figure II.17 Production total de trois arômes (l'alcool isoamylique (a), l'acétate d'isoamyle (b) et l'octanoate d'éthyle (c)) (point blanc) et la concentration cellulaire (point noir) en fonction de la concentration en sucre consommé. Les résultats proviennent d'une fermentation réalisée avec une concentration initiale en azote de 410 mg/L et une température de 24°C (Mouret et al., 2014). 58
Figure III.1 Profils de température des trois fermentations de validation du modèle de synthèse des arômes 70
Figure 1 Diagram of nitrogen forms 82

Figure 2 Dynamic evolution of biomass, nitrogen, CO2 and CO2 production rate for the experimental data (in red) and data simulated by models 1 (in black), model 2 (in blue), Malherbe's model (in pink) and Brou's model (in green) for the four calibration fermentatations 91
Figure 3 Sensitivity coefficients for each model 1 parameters and for CO2 release 95
Figure 4 Sensitivity coefficients for each model 2 parameters and for CO2 release 96
Figure 5 Dynamic evolution for CO2 production, biomass production and CO2 production rate for the experimental data (in red) and data simulated by models 1 (in black), 2 (in blue), Malherbe's model (in green) and Brou's model (in magenta). The first line represents the CO2 production, the second line the biomass production and the third line the CO2 production rate. 98
Figure IV.1 Comparaison entre les données de CO2 produit expérimentales (en rouge), et simulées par les modèles 1 (en noir) et 2 (en bleu) pour les fermentations de validation avec un ajout d'azote à 20 g/L de CO2 dégagé. 103
Figure IV.2 Comparaison entre les données de CO2 produit expérimentales (en rouge), et simulées par les modèles 1 (en noir) et 2 (en bleu) pour les fermentations de validation avec un ajout d'azote à 35 g/L de CO2 dégagé. 104
Figure IV.3 Comparaison entre les données de CO2 produit expérimentales (en rouge), et simulées par les modèles 1 (en noir) et 2 (en bleu) pour les fermentations de validation du quadruplicat. 104
Figure IV.4 Comparaison entre les données de CO2 produit expérimentales (en rouge), et simulées par les modèles 1 (en noir) et 2 (en bleu) pour les fermentations de validation avec un ajout d'azote à 50 g/L de CO2 dégagé. 105
Figure IV.5 Comparaison entre les données de vitesse de production de CO2 expérimentales (en rouge) et simulées par les modèles 1 (en noir) et 2 (en bleu) pour les fermentations avec un ajout d'azote à 20 g/L de CO2 dégagé. 105
Figure IV.6 Comparaison entre les données de vitesse de production de CO2 expérimentales (en rouge) et simulées par les modèles 1 (en noir) et 2 (en bleu) pour les fermentations avec un ajout d'azote à 35 g/L de CO2 dégagé. 106
Figure IV.7 Comparaison entre les données de vitesse de production de CO2 expérimentales (en rouge) et simulées par les modèles 1 (en noir) et 2 (en bleu) pour les fermentations du quadruplicat. 106
Figure IV.8 Comparaison entre les données de vitesse de production de CO2 expérimentales (en rouge) et simulées par les modèles 1 (en noir) et 2 (en bleu) pour les fermentations avec un ajout d'azote à 50 g/L de CO2 dégagé. 107
Figure IV.9 Comparaison entre les données de biomasse expérimentales (en rouge) et simulées par les modèles 1 (en noir) et 2 (en bleu) pour les fermentations avec un ajout d'azote à 20 g/L de CO2 dégagé. 107
Figure IV.10 Comparaison entre les données de biomasse expérimentales (en rouge) et simulées par les modèles 1 (en noir) et 2 (en bleu) pour les fermentations avec un ajout d'azote à 35 g/L de CO2 dégagé. 108
Figure IV.11 Comparaison entre les données de biomasse expérimentales (en rouge) et simulées par les modèles 1 (en noir) et 2 (en bleu) pour les fermentations du quadruplicat. 108
Figure IV.12 Comparaison entre les données de biomasse expérimentales (en rouge) et simulées par les modèles 1 (en noir) et 2 (en bleu) pour les fermentations avec un ajout d'azote à 50 g/L de CO2 dégagé. 109
Figure IV.13 Valeurs expérimentales (en bleu) et prédites par les modèles 1 (en orange) et 2 (en gris) de Vmax pendant la première phase de croissance pour les seize fermntations de validation. 113
Figure IV.14 Valeurs expérimentales (en bleu) et prédites par les modèles 1 (en orange) et 2 (en gris) de tmax pendant la première phase de croissance pour les seize fermntations de validation. 114
Figure IV.15 Valeurs expérimentales (en bleu) et prédites par les modèles 1 (en orange) et 2 (en gris) de Vmax pendant la deuxième phase de croissance pour les seize fermntations de validation. 114
Figure IV.16 Valeurs expérimentales (en bleu) et prédites par les modèles 1 (en orange) et 2 (en gris) de tmax pendant la deuxième phase de croissance pour les seize fermntations de validation. 115

Figure IV.17 Variation de la valeur de k2 en fonction de la température 118
Figure IV.18 Variation de la valeur de knst avec la température 118
Figure IV.19 Relation entre k3 et la température 119
Figure IV.20 Relation entre κ et la température 120
Figure IV.21 Simulations et données expérimentales pour le triplicat (23°C, azote initial 140 mg/L, ajout d'azote 100 mg/). Le CO2 est représenté en haut à gauche, la vitesse de dégagement de CO2 en haut à droite, la concentration en azote en bas à gauche et la concentration en biomasse en bas à droite. 121
Figure IV.22 Simulations et données expérimentales des fermentations à 18°C. Sur la première ligne, le CO2 est représenté ; sur la deuxième ligne, la vitesse de dégagement de CO2 ; sur la troisième ligne, la concentration en azote et sur la quatrième ligne, la concentration en biomasse. 123
Figure IV.23 Simulations et données expérimentales pour les fermentations à 23°C. Sur la première ligne, le CO2 est représenté ; sur la deuxième ligne, la vitesse de dégagement de CO2 ; sur la troisième ligne, la concentration en azote et sur la quatrième ligne, la concentration en biomasse. 124
Figure IV.24 Simulations et données expérimentales pour les fermentations à 28°C. Sur la première ligne, le CO2 est représenté ; sur la deuxième ligne, la vitesse de dégagement de CO2 ; sur la troisième ligne, la concentration en azote et sur la quatrième ligne, la concentration en biomasse. 125
Figure IV.25 Valeurs expérimentales et prédites par le modèle pour le Vmax pendant la première phase de croissance. 126
Figure IV.26 Valeurs expérimentales et prédites par le modèle pour le tmax pendant la première phase de croissance.....127
Figure IV.27 Valeurs expérimentales et prédites par le modèle pour le Vmax pendant la deuxième phase de croissance. 127
Figure IV.28 Valeurs expérimentales et prédites par le modèle pour le tmax pendant la deuxième phase de croissance. 128
Figure IV.29 Données expérimentales et simulées pour les trois fermentations de validation 130
Figure V.1 Relation entre Ymax et la température. 139
Figure V.2 relation entre αIAA et la température 139
Figure V.3 relation entre KrCO2 et la température 140
Figure V.4. Données expérimentales (en noir) et simulées par les modèles avec discontinuité (en rouge) et sans discontinuité (en bleu) pour les fermentations de calibration avec une concentration initale en azote de 70 mg/L. 141
Figure V.5 Données expérimentales (en noir) et simulées par les modèles avec discontinuité (en rouge) et sans discontinuité (en bleu) pour les fermentations de calibration avec une concentration initale en azote de 140 mg/L. 141
Figure V.6 Données expérimentales (en noir) et simulées par les modèles avec discontinuité (en rouge) et sans discontinuité (en bleu) pour les fermentations de calibration du triplicat. 142
Figure V.7 Données expérimentales (en noir) et simulées par les modèles avec discontinuité (en rouge) et sans discontinuité (en bleu) pour les fermentations de calibration avec une concentration initale en azote de 210 mg/L 142
Figure V.8 Données expérimentales (points rouges) et simulées par les modèles avec discontinuité (ligne continue noire) et sans discontinuité (ligne continue bleue) de la production totale en acétate d'isoamyle pour les trois fermentations anisothermes de validation. 144
Figure V.9 Données expérimentales (points rouges) et simulées (ligne bleue continue) par le modèle avec discontinuité de la production totale d'isobutanol pour les fermentations de calibration avec une concentration initiale en azote de 70 mg/L.....147
Figure V.10 Données expérimentales (points rouges) et simulées (ligne bleue continue) par le modèle avec discontinuité de la production totale d'isobutanol pour les fermentations de calibration avec une concentration initiale en azote de 140 mg/L.....148

Figure V.11 Données expérimentales (points rouges) et simulées (ligne bleue continue) par le modèle avec discontinuité de la production totale d'isobutanol pour les fermentations de calibration du triplicat. 148
Figure V.12 Données expérimentales (points rouges) et simulées (ligne bleue continue) par le modèle avec discontinuité de la production totale d'isobutanol pour les fermentations de calibration avec une concentration initiale en azote de 210 mg/L. 149
Figure V.13 Données expérimentales (points rouges) et simulées (ligne bleue continue) par le modèle avec discontinuité de la production totale d'alcool isoamylique pour les fermentations avec une concentration initiale en azote de 70 mg/L 150
Figure V.14 Données expérimentales (points rouges) et simulées (ligne bleue continue) par le modèle avec discontinuité de la production totale d'alcool isoamylique pour les fermentations avec une concentration initiale en azote de 140 mg/L. 150
Figure V.15 Données expérimentales (points rouges) et simulées (ligne bleue continue) par le modèle avec discontinuité de la production totale d'alcool isoamylique pour les fermentations du triplicat. .. 151
Figure V.16 Données expérimentales (points rouges) et simulées (ligne bleue continue) par le modèle avec discontinuité de la production totale d'alcool isoamylique pour les fermentations avec une concentration initiale en azote de 210 mg/L. 151
Figure V.17 Données expérimentales (points rouges) et simulées (ligne bleue continue) par le modèle avec discontinuité de la production totale d'hexanoate d'éthyle pour les fermentations de calibration pour une concentration initiale en azote de 70 mg/L. 152
Figure V.18 Données expérimentales (points rouges) et simulées (ligne bleue continue) par le modèle avec discontinuité de la production totale d'hexanoate d'éthyle pour les fermentations de calibration pour une concentration initiale en azote de 140 mg/L. 152
Figure V.19 Données expérimentales (points rouges) et simulées (ligne bleue continue) par le modèle avec discontinuité de la production totale d'hexanoate d'éthyle pour les fermentations de calibration du triplicat. 153
Figure V.20 Données expérimentales (points rouges) et simulées (ligne bleue continue) par le modèle avec discontinuité de la production totale d'hexanoate d'éthyle pour les fermentations de calibration pour une concentration initiale en azote de 210 mg/L. 153
Figure V.21 Données expérimentales (points rouges) et simulées (ligne bleue continue) par le modèle avec discontinuité de la production totale d'octanoate d'éthyle pour les fermentations de calibration avec une concentration initiale en azote de 70 mg/L. 154
Figure V.22 Données expérimentales (points rouges) et simulées (ligne bleue continue) par le modèle avec discontinuité de la production totale d'octanoate d'éthyle pour les fermentations de calibration avec une concentration initiale en azote de 140 mg/L. 155
Figure V.23 Données expérimentales (points rouges) et simulées (ligne bleue continue) par le modèle avec discontinuité de la production totale d'octanoate d'éthyle pour les fermentations de calibration du triplicat. 155
Figure V.24 Données expérimentales (points rouges) et simulées (ligne bleue continue) par le modèle avec discontinuité de la production totale d'octanoate d'éthyle pour les fermentations de calibration avec une concentration initiale en azote de 210 mg/L. 156
Figure V.25 Données expérimentales (point rouge) et simulées par le modèle avec discontinuités (ligne bleue continue) de la production d'isobutanol (première ligne), d'alcool isoamylique (deuxième ligne), d'hexanoate d'éthyle (troisième ligne) et d'octanoate d'éthyle (quatrième ligne). La première colonne représente les données pour la fermentation S11, la deuxième les données pour la fermentation S13 et la troisième pour la fermentation S13. 160

Liste des Tableaux

Tableau II.1 Caractéristiques des cinq arômes considérés (Convention, 1975) 37
Tableau II.2 Equations du Modèle de Sevely 47
Tableau II.3 Equations du modèle de Cramer 48
Tableau II.4 Paramètres du modèle de Cramer 48
Tableau II.5 Relation entre les paramètres du modèle de Cramer et les conditions expérimentales 49
Tableau II.6 Equations du modèle de Malherbe 52
Tableau II.7 Paramètres du modèle de Malherbe 52
Tableau II.8 Paramètres du modèle de Brou 55
Tableau II.9 Coefficients du modèle de synthèse des arômes 59
Tableau II.10 Paramètres du modèle de perte des arômes 60
Tableau III.1 Conditions expérimentales des fermentations de calibration du modèle de la cinétique principale 68
Tableau III.2 Conditions expérimentales des fermentations de validation du modèle de la cinétique principale 68
Tableau.III.3 Conditions expérientales des fermentations de calibration du modèle de synthèse des arômes 69
Tableau III.4 Conditions expérimentales des fermentations de validation du modèle de synthèse des arômes 69
Table 1 Experimental conditions of calibration fermentations 81
Table 2 Two models equations 87
Table 3 Model 1 and 2 and Malherbe's model parameters 89
Table 4 NRMSE values applied to each variable for each fermentation, to all of the variables for each fermentation, to each variable for all of the fermentations and to all of the variables for all of the fermentations and for Models 1 and 2. 92
Table 5 AIC values applied to each variable for each fermentation and for Models 1, 2, of Brou and of Malherbe. 93
Table 6 NRMSE calculated for CO_2, CO_2 production rate and biomass for models 1 and 2, Brou and Malherbe 99
Tableau 7 AIC values calculated for CO_2, CO_2 production rate and biomass for models 1 and 2, of Brou and of Malherbe 100
Tableau IV.1 Valeurs desRMSE pour le CO_2, la vitesse de production de CO_2 et la biomasse pour les onze fermentations de validation non présentées dans la publication 109
Tableau IV.2 Valeurs moyennes de NRMSE pour le CO_2, le r_{CO2} et la biomasse en fonction de la concentration initiale en azote 110
Tableau IV.3 Valeurs moyennes de NRMSE pour le CO_2, le rCO_2 et la biomasse en fonction du timing d'ajout d'azote 110
Tableau IV.4 Valeurs des V_{max} et t_{max} pour les données expérimentales et prédites par les modèles 1 et 2. 111
Tableau IV.5 Ecarts des valeurs de V_{max} et t_{max} entre les données prédites par les modèles 1 et 2 et les données expérimentales en pourcentage. 112
Tableau IV.6 Moyenne et écart-type des valeurs expérimentales et prédites par les modèles 1 et 2 de V_{max} et de t_{max} pour les deux phases de croissance pour le point central du plan d'expérience (concentration initial en azote de 140 mg/L, concentration en azote ajouté de 100 mg/L et ajout réalisé pour un CO_2 dégagé de 35 g/L) réalisé en quadruplicat. 113

Tableau IV.7 Moyenne de l'écart relatif des valeurs prédites par les modèles 1 et 2 aux valeurs expérimentales de V_{max} et de t_{max} pour les deux phases de croissance. La moyenne est calculée pour toutes les fermentations et pour chaque valeur prise par les conditions expérimentales (concentration initiale en azote, concentration d'azote ajouté et CO_2 produit à l'ajout d'azote). Les valeurs ne sont pas indiquées pour la première phase de croissance et pour l'azote ajouté car l'ajout d'azote est effectué après la première phase de croissance. 116
Tableau IV.8 Valeurs des paramètres des équations du sucre et des transporteurs après calibration pour chaque condition de température 117
Tableau IV.9 Valeurs des paramètres des équations du sucre et des transporteurs 119
Tableau IV.10 Ecarts-types et écarts relatifs par rapport à la moyenne pour les valeurs de V_{max} et de t_{max} pour le triplicat des fermentations de calibration. 121
Tableau IV.11 Valeurs de NRMSE pour les fermentations de calibration 122
Tableau IV.12 Valeurs moyennes de l'écart relatif à la valeur expérimentale pour V_{max} et t_{max} pour chaque phase de croissance pour toutes les fermentations et pour chaque valeurs des conditions expérimentales. Les valeurs ne sont pas indiquées pour la première phase de croissance et pour l'azote ajouté car l'ajout d'azote est effectué après la première phase de croissance. 129
Tableau IV.13 Valeurs de NRMSE pour les fermentations de validation 129
Tableau IV.14 Valeurs expérimentales et prédites par le modèle de V_{max} et de t_{max} pour les deux phases de croissance et écart relatif de la valeur prédite par le moyenne à la valeur expérimentale pour les trois fermentations de validation. 130
Tableau V.1 Valeurs des paramètres du modèle avec discontinuité comparées aux valeurs des paramètres du modèle de Mouret et al. (2015) pour l'acétate d'isoamyle 138
Tableau V.2 Valeurs du coefficient NRMSE pour les deux modèles construits et pour les quinze fermentations de calibration. 143
Tableau V.3 Valeurs de NRMSE pour la production totale de l'acétate d'isoamyle pour les modèles discontinu et continu pour les fermentations de validation. 145
Tableau V.4 Comparaison des valeurs des paramètres du modèle avec discontinuité avec les valeurs des paramètres du modèle de Mouret et al. (2015)pour l'isobutanol, l'alcool isoamylique, l'hexanoate d'éthyle et l'octanoate d'éthyle. 146
Tableau V.5 Valeurs de NRMSE du modèle avec discontinuité de production de l'isobutanol, l'alcool isoamylique, de l'hexanoate d'éthyle et de l'octanoate d'éthyle pour les fermentations de calibration 157
Tableau V.6 Valeurs moyennes de NRMSE pour le modèle avec discontinuité de production de l'isobutanol, l'alcool isoamylique, de l'hexanoate d'éthyle et de l'octanoate d'éthyle pour les différentes conditions expérimentales (concentration initiale en azote, concentration en azote ajouté et température). 157
Tableau V.7 Valeurs de NRMSE pour le modèle avec discontiuité de production totale d'isobutanol, d'alcool isoamylique, d'hexanoate d'éthyle et d'octanoate d'éthyle pour les trois fermentations de validation. 159
Tableau VI.1 Paramètres du modèle de la cinétique principale 170
Tableau VI.2 Paramètres du modèle de la synthèse des arômes 171

I. Introduction générale

Le vin est une boisson alcoolisée produite à partir de raisin, fruit de la vigne. Actuellement, la vigne ne représente qu'une faible part de la surface agricole utilisée : en 2020 la vigne s'étend sur 7,3 millions d'hectares dans le monde (Viti Veille, 2021) alors qu'en 2010 les terres arables s'étendent sur 1,6 milliards d'hectares (Jardiner Autrement, 2021). En France, selon le dernier recensement agricole en 2020, la viticulture représente 779 mille hectares sur 26,9 millions d'hectares pour l'ensemble de l'agriculture soit 2,90% de la surface agricole utile (Agreste, 2020).

En 2021, la production mondiale de vin est de 250,3 millions d'hectolitres (Kumor, 2021) et le premier producteur mondial est l'Italie avec 44,5 millions d'hectolitres. l'Espagne est le deuxième producteur avec 35,0 millions d'hectolitres et la France est troisième avec 34,9 millions d'hectolitres (Kumor, 2021). Cependant, la productivité viticole française de vin a été mauvaise en 2021 à cause des conditions météorologiques (épisodes tardifs de gel notamment) et la production en 2022 est estimée à 44 millions d'hectolitres.

Malgré le faible pourcentage de terres agricoles consacrées à cette production, le vin représente une part importante de la valeur économique de la production agricole : en France, il représente 17% de la valeur économique de la production agricole française soit 12 milliards d'euros dont 8,7 milliards d'euros d'exportation (Ministère de l'agriculture et de la souveraineté alimentaire, 2022). Cependant, le marché mondial du vin devient de plus en plus concurrentiel. Selon la Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database (FAOSTAT) (2020), plusieurs pays ont grandement augmenté leur production de vin entre 1960 et 2019 : l'Afrique du Sud, le Brésil et le Chili ont augmenté leur production par 2,5, les Etats-Unis par 5, l'Australie par 6 et la Nouvelle-Zélande par 68 alors que dans la même période les pays historiquement producteurs ont vu leurs production rester stable comme l'Espagne, ou diminuer comme l'Italie et la France dont les productions ont diminué de 30% et de 35% respectivement.

Par ailleurs, les consommateurs recherchent de plus en plus des vins avec de meilleures qualités organoleptiques, notamment un profil aromatique plus fruité. En France, depuis 1960, la consommation des vins de consommation courante a diminué de 2,4% par an en moyenne mais la consommation de vin de qualité a augmenté de 2,7% par an en moyenne selon l'Institut National des Statistiques et des études économiques (INSEE) (2020). De ce fait, dans un contexte de forte compétitivité internationale, l'industrie viticole française a besoin de solutions pour améliorer les qualités aromatiques de ses vins pour maintenir sa compétitivité et des investissements sont effectués dans la recherche pour améliorer la qualité du vin.

Dans ce contexte, plusieurs aspects de la fermentation alcoolique en conditions œnologiques sont l'objet de recherche depuis les années 1980. La recherche a d'abord eu pour objectif d'éviter l'arrêt prématuré de la fermentation. Il a été montré que l'arrêt prématuré de la fermentation est notamment dû à la carence en azote du milieu de fermentation (Bisson, 1999). Pour pallier à ce problème, l'ajout d'azote en cours de fermentation est autorisé par les législations française et européenne et l'ajout d'azote est une pratique répandue chez les vignerons.

A partir de la fin des années 1990, le métabolisme et la production des arômes fermentaires ont été étudiés par plusieurs équipes de recherche (Cordente et al., 2012; Swiegers et al., 2005) et quelques modèles mathématiques de la cinétique de la fermentation alcoolique en conditions œnologiques ont été publiés (Brou et al., 2020; Cramer et al., 2002; Malherbe et al., 2004).

Récemment, la recherche se penche sur l'intérêt des fermentations réalisées en cultures mixtes de micro-organismes pour améliorer les qualités organoleptiques du vin (Belda et al., 2017; Guerrini et al., 2021). De nombreuses souches de levures œnologiques ont été sélectionnées pour éviter l'arrêt prématuré de la fermentation puis pour la production des arômes. Actuellement, plus de deux cents souches différentes de *Saccharomyces cerevisiae* sont commercialisées.

L'azote et la température sont les principaux paramètres influant sur la synthèse des arômes, mais leurs interactions n'ont jamais été évaluées. A ce jour, les viticulteurs ne disposent pas de méthode pour déterminer le timing et la concentration en azote pour un ajout ayant un effet optimal sur la synthèse des arômes. De plus, l'évolution de la température dans la cuve de fermentation n'est pas toujours mesurée et contrôlée pendant la fermentation. Pour répondre à ce besoin, le projet Starwine, dont cette thèse fait partie, propose d'étudier la fermentation alcoolique en conditions œnologiques pour avoir une meilleure compréhension de celle-ci et pour améliorer les qualités organoleptiques du vin. L'objectif du projet Starwine est de contrôler le profil aromatique fruité par un développement de stratégies innovantes de contrôle en temps réel du procédé de fermentation.

Ce projet est financé par l'Agence National de la Recherche (ANR) et il est suivi par la maison de champagne Moët & Chandon, premier vignoble de champagne et membre du groupe LVMH.

Cinq laboratoires de recherche sont impliqués dans le projet Starwine :

- Science Pour l'Œnologie (SPO), unité mixte de recherche de l'université de Montpellier, l'INRAE (Institut National de la Recherche pour l'Agriculture, pour l'Alimentation et pour l'Ecologie) et de l'Institut Agro, basée à Montpellier
- Unité Expérimentale de Pech Rouge (UEPR), unité expérimentale de l'INRAE basée à Gruissan
- Toulouse Biotechnology Institute (TBI), unité mixte de recherche sous la tutelle de l'INSA (Instituts National des Sciences Appliquées) de Toulouse, du CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) et de l'INRAE, basée sur le campus de l'INSA à Toulouse.
- Mathématiques, Informatique et Statistique pour l'Environnement et l'Agronomie (MISTEA), unité mixte de recherche de l'université de Montpellier, l'INRAE et de l'Institut Agro, basée à Montpellier
- Sayfood, unité mixte de recherche sous la tutelle d'AgroParisTech, de l'INRAE et de l'université Paris-Saclay basée à Saclay.

La première partie du projet, réalisée à l'échelle laboratoire (SPO et UEPR), se propose de déterminer l'impact sur la production d'arômes d'une gestion combinée : (1) des ajouts d'azote en cours de fermentation et (2) des profils anisothermes de température. Parallèlement, les données obtenues doivent servir à construire un modèle mécanistique de la production des arômes, représentatif des principales réactions du métabolisme levurien et prenant en compte l'ajout d'azote et les variations de température (TBI). Sur la base de ce modèle mathématique, une stratégie de contrôle en temps réel (détermination de la dose d'azote à ajouter et contrôle de la température après ajout d'azote) sera proposée et validée à l'échelle laboratoire en utilisant un outil de laboratoire basée sur un équipement de CPG (chromatographie en phase gazeuse) en ligne (MISTEA). En parallèle de cette première partie, les performances d'un capteur physique seront évaluées pour tester la faisabilité industrielle d'un suivi en ligne des arômes fermentaires (Sayfood). A la fin du projet, l'ensemble des résultats obtenus – à l'échelle laboratoire et avec le capteur physique – sera intégré pour évaluer la pertinence de cette stratégie de contrôle en conditions industrielles.

Le projet Starwine se concentre sur cinq arômes fermentaires présentant une grande importance sur le profil aromatique du vin et considérés comme représentatifs des composés aromatiques de la fermentation : deux alcools supérieurs (isobutanol et alcool isoamylique), un acétate d'esters (acétate d'isoamyle) et deux esters d'éthyle (hexanoate d'éthyle et octanoate d'éthyle).

Cette thèse a été effectuée dans l'équipe FAME (Fermentation Advances and Microbial Engineering) de TBI sous la direction de Dr. Carine Bideaux et de Dr. César Arturo Aceves Lara. Son objectif est de construire un modèle mathématique de la cinétique fermentaire. Il est divisé en deux sous-objectifs : d'abord construire un modèle de la cinétique principale de la fermentation (production de la biomasse, de l'éthanol et du CO_2 et consommation du sucre et de l'azote) puis élaborer un modèle de la synthèse des arômes. Le modèle construit doit prendre en compte l'ajout d'azote en cours de fermentation car c'est une pratique couramment utilisée par les vignerons mais qui n'a été pris en compte par aucun modèle de la littérature. De plus, la température sera intégrée dans le modèle construit car les fermentations alcooliques en conditions œnologiques réalisées en conditions industrielles sont le plus souvent anisothermes avec une température qui est comprise entre 18 et 30°C.

Le manuscrit est organisé en quatre chapitres.

La première partie est une synthèse bibliographique présentant une vue d'ensemble de la fermentation alcoolique en conditions œnologiques et des voies métaboliques de synthèse des arômes fermentaires. Enfin, l'état de l'art de la modélisation de la fermentation alcoolique en conditions œnologiques est présenté.

La deuxième partie décrit le matériel et les méthodes de la thèse. Cette partie comprend à la fois le matériel et méthodes des fermentations qui n'ont pas été réalisées dans cette thèse mais qui ont été utilisée pour la calibration et la validation du modèle construit et les méthodes de calibration et d'analyse statistique des performances du modèle.

La troisième partie présente la construction du modèle de la cinétique principale. Deux modèles ont d'abord été construits pour simuler des fermentations isothermes à 24°C. Après comparaison des performances de prédiction de ces deux modèles, la température a été intégrée dans le modèle de la cinétique principale sélectionné.

La quatrième partie expose la construction du modèle de la synthèse des arômes. Dans un premier temps, la synthèse de l'acétate d'isoamyle a été modélisée. Dans un second temps, le modèle a été élargie aux quatre autres arômes.

Enfin, une conclusion générale soulignera les principaux résultats obtenus au cours de cette thèse et présentera les perspectives identifiées pour l'amélioration et la valorisation de ces travaux.

II. Synthèse bibliographique

Ce chapitre présente une synthèse bibliographique sur la production d'arômes lors de la fermentation en condition œnologique et sur la modélisation de cette dernière. La première partie décrit les caractéristiques de la fermentation alcoolique œnologique, notamment l'importance de l'azote dans ce processus. La deuxième partie porte sur la production des arômes : quelles sont les voies métaboliques impliquées dans ces productions ? Quels sont les paramètres qui peuvent influencer ces productions ? Enfin, dans la troisième partie sont présentés les différents types de modèles utilisés pour décrire mathématiquement les procédés de fermentation en conditions œnologiques.

II.A. Fermentation alcoolique en conditions œnologiques

La consommation de produits fermentés est un des comportements avec une grande incidence dans l'humanité. En effet, la fermentation est un processus largement utilisé dans l'agro-alimentaire (boissons alcoolisées, choucroute, kéfir, yaourts, fromages, pains ...) depuis des millénaires pour la conservation des aliments, et plus récemment dans le domaine de la santé (productions d'antibiotiques, insuline, protéines thérapeutiques…) et dans le domaine de l'énergie (production de bio-carburant ou méthanisation). Une étude mentionne la fabrication et la consommation de boissons alcoolisées à partir de céréales il y a 13 000 ans à Raqefet dans l'actuel Israël soit avant le début de l'agriculture et l'invention de la roue (Liu et al., 2018). De plus, l'utilisation de boissons alcoolisées dans les rites de plusieurs religions est attestée depuis le début de l'agriculture : vin dans le judaïsme, le christianisme et les religions grecques et romaines, saké dans le shintoïsme, huangjiu dans le culte des ancêtres en Chine, chouchen dans les religions celtes, bière de mil dans des rituels pour les ancêtres, les génies et les esprits en Afrique subsaharienne et chicha dans les religions incas et des tribus d'Amazonie. Cependant, ce n'est qu'en 1838 que les travaux de Charles Cagniard de la Tour ont montré que la fermentation implique des micro-organismes (Cagniard-Latour, 1838). Au cours de ce processus microbiologique, les microorganismes (bactéries, champignons ou levures) dégradent la matière organique (sucres, lipides, protéines…) pour produire l'énergie qu'il leur est nécessaire pour leur survie.

Dans cette partie, la fermentation en conditions œnologiques est présentée : d'abord des généralités sur la fermentation en conditions œnologiques (vinification, équation chimique de la fermentation alcoolique, milieu, suivi, problèmes de fermentation et législation) puis les levures et les cinétiques de fermentation et enfin l'importance de la température et de l'azote.

II.A.1. Généralités

II.A.1.a) Vinification

La vinification est le processus de transformation du raisin en vin sous l'action de microorganismes, majoritairement des levures. Elle implique des étapes différentes en fonction du type de vin produit (cf. Figure II.1 et Figure II.2 pour les vins rouges et blancs respectivement) (Léglise, 2003).

Dans un premier temps, les étapes pré-fermentaires sont effectuées : l'éraflage (séparation du grain de raisin de la rafle, support pédonculaire et ligneux du raisin) et le foulage (extraction de la pulpe et du jus de raisin sans écraser les pépins). Pour les vins blancs, une étape supplémentaire, le pressage, est réalisée pour séparer le jus de raisin liquide des résidus solides (pépins ...) (Léglise, 2003).

Suite aux étapes pré-fermentaires, la fermentation alcoolique se déroule soit dans un moût avec des particules solides pour les vins rouges, soit dans un moût entièrement liquide pour les vins blancs. Pour les vins rouges, la macération permet d'extraire les composés aromatiques des particules solides présentes dans le moût ainsi que la couleur ; une étape supplémentaire, l'égouttage, est réalisée en fin de fermentation, pour séparer par écoulement ou soutirage la partie liquide, appelé vin de goutte, d'un résidu solide, le marc, duquel on peut extraire le vin de presse par pressurage. Ce vin de presse est plus riche en tanins, pigments et sucres, et peut être ajouté au vin de goutte en fonction des qualités finales recherchées (Fugelsang et al., 2007; Léglise, 2003).

Une fermentation malolactique est parfois ensuite réalisée pour réduire l'acidité du vin en transformant l'acide malique en acide lactique par la bactérie *Oenococcus oeni*. Elle permet une stabilisation et un assouplissement du vin et est plus souvent réalisée pour les vins rouges que pour les vins blancs. La fermentation malolactique peut être précoce, c'est-à-dire réalisée simultanément à la fermentation alcoolique, soit tardive, effectuée plusieurs mois après la fermentation alcoolique et peut se faire en cuve ou en fût (Fugelsang et al., 2007).

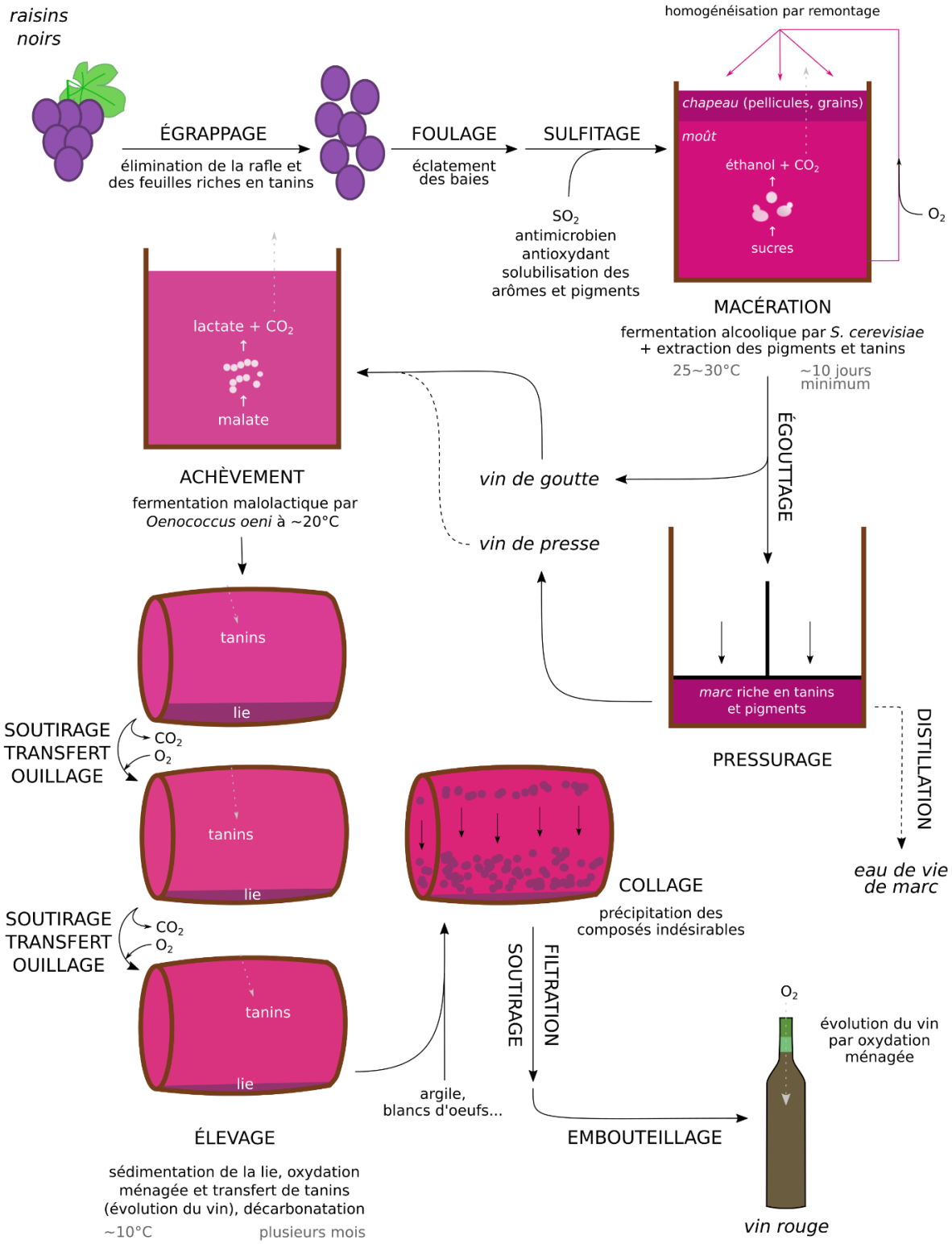


Figure II.1 Procédé de vinification pour les vins rouges (Penot, 2021)

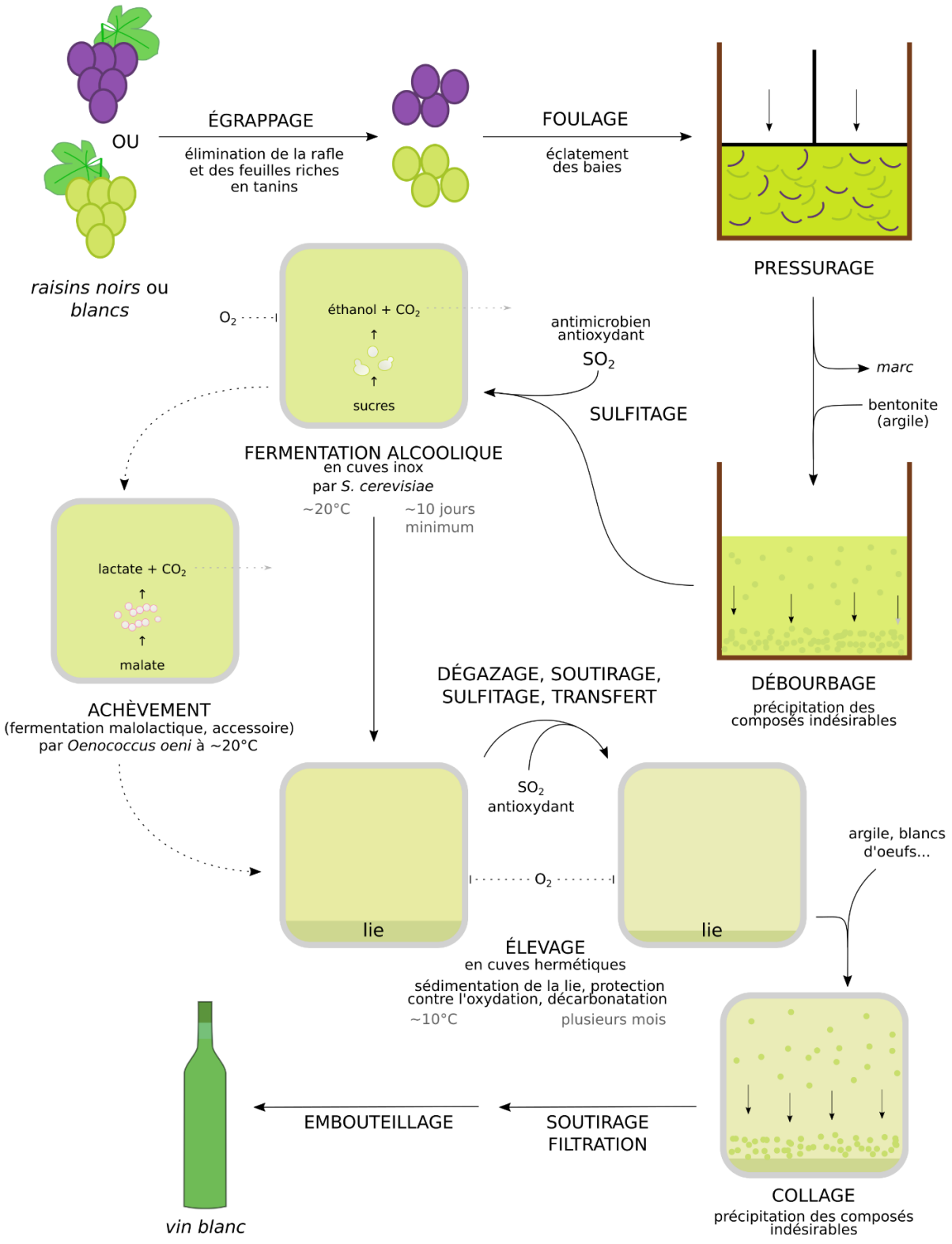


Figure II.2 Procédé de vinification pour les vins blancs (Penot, 2021)

L'étape de fermentation est suivie par la phase d'élevage qui permet la maturation du vin. Elle se déroule soit en fût soit en bouteille et transforme le profil aromatique en modifiant les concentrations d'arômes déjà présents dans le vin ou en ajoutant de nouveaux arômes au vin (venant des fûts en chêne par exemple). Enfin, après précipitation des composés indésirables (étape de collage), le vin est mis en bouteille (Léglise, 2003).

Pour les vins pétillants, une deuxième fermentation alcoolique est réalisée en bouteille après ajout de sucre et de levures. A la fin de cette fermentation, une décantation à l'envers permet d'accumuler la lie dans le haut de la bouteille. Celui-ci est alors congelé et le débouchage de la bouteille permet l'expulsion du glaçon contenant les résidus solides. La bouteille est alors rebouchée rapidement pour garder le CO_2 à l'état dissout et donner le caractère pétillant aux vins (Zoecklein, 1998).

La fermentation alcoolique est une phase importante de la vinification. C'est un procédé microbiologique pendant lequel les sucres présents dans le raisin, généralement des hexoses (fructose et glucose), sont convertis par des levures en éthanol selon l'équation stœchiométrique globale suivante :

$$C_6H_{12}O_6 + 2ADP + 2Pi \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 + 2ATP$$

Cette voix métabolique est utilisée par les levures lorsqu'elles n'ont plus d'oxygène disponible pour produire de l'énergie sous forme d'Adénosine TriPhosphate (ATP). La fermentation alcoolique libère moins d'énergie que la respiration car la dégradation des sucres est incomplète : par oxydation complète trente-six molécules d'ATP sont produites à partir d'une molécule de glucose alors que par fermentation alcoolique deux molécules d'ATP sont métabolisées à partir d'une molécule de glucose (Hinkle, 2005).

Durant la fermentation, il y a un dégagement important de CO_2 et de chaleur. Lorsque tous les sucres ont été consommés par les levures, le processus de fermentation alcoolique s'arrête naturellement. L'éthanol en excès étant toxique pour les levures, la fermentation alcoolique ne peut pas être utilisée pour la fabrication d'alcools à haut degré (au-delà de 14% à 16%). Ces derniers sont donc produits par distillation (Deluzarche, 2021).

II.A.1.b) Milieu de fermentation

Le moût contient une concentration élevée en sucre, entre 150 et 300 g/L, composé de glucose et fructose à part égale (Mendes-Ferreira et al., 2011) servant de substrat carboné aux levures. Cette concentration élevée en sucre représente un stress osmotique pour les levures et peut être inhibitrice de la fermentation, en particulier de la croissance des micro-organismes (Malherbe, 2003).

Le pH du moût est acide, entre 3 et 3,5 ; il représente un stress acide pour les levures et peut inhiber la croissance cellulaire (Nielsen et al., 2011).

Plusieurs nutriments sont en quantité limitante pour l'activité cellulaire. Les limitations en oxygène et en azote ne sont pas présentées dans ce paragraphe et seront traitées dans les paragraphes II.A.2.c) et II.A.5. Les autres principaux composés limitants sont les vitamines, notamment la thiamine (vitamine B1). Cette carence en thiamine est due à des processus pré-fermentaires et non à une carence dans le raisin (Cabanis et al., 1993; Peynaud et al., 1957). En effet, la thiamine est consommée très rapidement, notamment par des levures indigènes, et peut être quasiment épuisée lors de l'inoculation de levures sèches actives. La carence en thiamine, ou en biotine (vitamine B8) (Winter et al., 1989), perturbe fortement la croissance des micro-organismes et par conséquent le métabolisme des levures et donc la production d'éthanol et de CO_2 ainsi que la production des arômes. Cette perturbation conduit à des fermentations ralenties et souvent incomplètes. Le magnésium est aussi un nutriment pouvant être limitant, il a un rôle positif sur la résistance des levures à différents stress (Walker et al., 1996). Enfin les lipides peuvent être limitant. Du fait de ces limitations, la législation autorise des ajouts de nutriments limitants (azote sous forme NH_4^+, vitamines et sels minéraux) (Commission, 2019) .

Le moût contient également des composés chimiques pouvant inhiber la cinétique microbienne tel que le dioxyde de soufre (SO_2) ou l'éthanol qui s'accumule en cours de fermentation.

II.A.1.c) Suivi de fermentation

Plusieurs mesures permettent de suivre l'évolution de la fermentation au cours du temps. Cependant la plupart de ces mesures sont réalisées en laboratoire et peu à l'échelle industrielle. En laboratoire, les mesures hors-ligne les plus courantes sont les mesures de la biomasse, de l'éthanol et des concentrations en arômes.

La mesure en ligne la plus utilisée, aussi bien en laboratoire qu'en cave, pour le suivi de fermentation est le dégagement du CO_2 (El Haloui et al., 1987). A partir de cette mesure, la vitesse de dégagement de CO_2 $\left(\frac{dCO_2}{dt}\right)$ peut être déterminée. Elle est corrélée à plusieurs paramètres (Malherbe, 2003) :

- biologiques : proportionnelle pendant la majorité de la fermentation à l'activité biologique des levures et proportionnelle à la quantité d'éthanol produit
- technologiques : proportionnelle à l'énergie à fournir pour refroidir la cuve de fermentation.

Colombié et al. (2007) ont montré que la concentration en azote pouvait être également suivi en ligne par mesure de la conductivité électrique.

La mesure de la masse volumique du moût offre une information approximative sur l'état de la transformation des sucres en alcool. Le dosage de l'azote assimilable (et d'autres nutriments) avant le début de la fermentation peut être réalisé pour effectuer un ajout en cas de concentration trop basse. Ces mesures sont majoritairement effectuées en laboratoire et rarement à l'échelle industrielle.

II.A.1.d) Fermentations lentes ou bloquées

Les fermentations peuvent être lentes, c'est-à-dire durer un mois ou plus quand le temps de fermentation « normale » est de l'ordre de 1 à 2 semaines. Ces fermentations diminuent généralement les qualités organoleptiques du vin (Bisson, 1999). Dans certains cas, les fermentations lentes peuvent être bloquées, cela survient quand les levures cessent de métaboliser le sucre prématurément, laissant une concentration résiduelle supérieure à celle d'une fermentation « complète ». Le blocage de la fermentation est dû à l'arrêt de l'entrée du sucre dans les cellules de levure (Bisson, 1999).

Il existe de nombreuses raisons pour lesquelles les fermentations sont lentes ou bloquées (Bisson, 1999) ; les principales sont :

- des concentrations trop faibles en azote, en oxygène, en phosphate, ou autres nutriments
- une concentration élevée en sucre
- une concentration élevée en éthanol
- des conditions de pH et/ou de température extrêmes
- la présence de toxines dans le moût
- la présence de populations de levures non-*Saccharomyces* (Alexandre, 1998) .

Les fermentations bloquées sont un problème pour les vignerons car les réglementations française et européenne imposent une teneur minimale en éthanol dans le vin de 9% (v/v) (ou de 8,5% pour les vins d'Alsace, de Lorraine, de Champagne, du Jura de la Savoie et du Val de Loire) (Parliament et al., 2013), critères que les fermentations bloquées ne parviennent pas à atteindre.

La législation européenne permet aux vignerons de faire des ajouts pendant la fermentation pour diminuer le risque de fermentation lente ou bloquée (Commission, 2019). Le principal ajout autorisé par la législation et effectué par les vignerons est l'ajout d'azote. Cet ajout est réalisé sous forme d'ions $(NH_4)_2HPO_4$ ou $(NH_4)_2SO_4$, de 1 g/L au maximum, soit 212 mg/L d'azote assimilable ou sous forme d'ions $(NH_4)HSO_3$, de 0,2 g/L au maximum, soit 28,3 mg/L d'azote assimilable. La législation autorise des ajouts d'autres nutriments comme l'oxygène, les lipides ou les sels minéraux. Elle permet aussi l'ajout de produits chimiques pour améliorer les conditions du milieu (régulateur de l'acidité, conservateur, antioxydants, séquestrant et clarifiants) et de produits activateurs de fermentations (enzymes, levures et bactéries lactiques, ...).

II.A.2. Levures en conditions œnologiques

Cette partie n'a pas vocation à présenter toutes les voies métaboliques ni tous les phénomènes physiologiques des levures mais à présenter ceux qui ont un impact sur la fermentation alcoolique en conditions œnologiques.

II.A.2.a) Généralités

Jusqu'au début des années 1980, toutes les fermentations étaient réalisées grâce à des souches indigènes, c'est-à-dire des souches de levures ou de bactéries présentes sur le raisin (Malherbe, 2003). Elles présentent une grande variabilité dans l'espace (parcelles), dans le temps et dans les pratiques des vignerons. Une étude mentionne que seul un grain de raisin sur mille est porteur de *Saccharomyces cerevisiae* (Mortimer et al., 1999).

Seules quelques espèces en dehors de *Saccharomyces cerevisae* sont susceptibles d'avoir un impact non négligeable sur la qualité du vin. Ainsi, les espèces *Saccharomyces pastorianus*, *Hanseniospora uvarum*, *Candida pulcherrima*, *Candida stellata* et *Debaryomyces hansenii* sont les espèces avec le plus d'importance dans la fermentation (Ciani et al., 2010), (Liu et al., 2016; Whitener et al., 2017). Sur les grappes et en début de fermentation, les levures n'appartenant pas au genre *Saccharomyces*, en particulier les espèces des genres *Hanseniaspora* et *Candida*, sont majoritaires (Albertin et al., 2014). Cependant ces espèces sont moins tolérantes à l'éthanol (leur seuil de tolérance est entre 3 et 5 % volumique d'éthanol alors que le seuil de tolérance de *Saccharomyces cerevisiae* est entre 12 et 15 % volumique d'éthanol) et deviennent moins compétitives à cause du manque d'oxygène dans le moût. De ce fait, les levures autres que *Saccharomyces cerevisiae* disparaissent en cours de fermentation. Mais ce n'est pas toujours le cas, et certaines populations de levures non-*Saccharomyces* peuvent survivre jusqu'à la fin de la fermentation (Andorrà et al., 2012) et peuvent avoir un impact positif sur les qualités organoleptiques (Liu et al., 2016; Whitener et al., 2017), notamment par la production de métabolites secondaires dont les esters, les alcools supérieurs, les acides et les thiols (Ciani et al., 2006; Swiegers et al., 2005; Viana et al., 2008; Zott et al., 2011).

La compétition entre espèces de levures pour la consommation d'azote, nutriment limitant, peut avoir un impact négatif en conduisant à des fermentations lentes ou qui s'arrêtent prématurément (Lleixà et al., 2016). Ces fermentations conduisent à des vins avec des concentrations en sucre élevées, des temps de fermentation longs et des risques de contaminations microbiennes (Jiménez-Marti et al., 2007). Cependant une interaction positive entre deux espèces de levures ou plus peut intervenir : Anfang et al. (2009) ont ainsi montré que la co-fermentation de *Saccharomyces cerevisiae* avec *Pichia kluyveri* augmente les concentrations en thiols variétaux pour le Sauvignon blanc et Cheraiti et al. (2005) que les interactions redox entre *Saccharomyces cerevisiae* et *Saccharomyces uvarum* influencent la cinétique fermentaire et les productions de biomasse et d'acétaldéhyde.

Depuis les années 1980, *Saccharomyces cerevisiae* est devenue la principale levure d'intérêt œnologique et environ 80 % des fermentations sont réalisées majoritairement en souche pure de *Saccharomyces cerevisiae* ajoutée au moût de fermentation sous forme de levure sèche active. De ce fait, *Saccharomyces cerevisiae* est une levure très étudiée et l'une des rares levures commercialisée sous forme de levures sèches actives (Bely et al., 2008). Depuis quelques années, une sélection de souches indigènes de *Saccharomyces cerevisiae* est effectuée pour la fermentation œnologique. Les souches indigènes sélectionnées confèrent des propriétés chimiques et sensorielles distinctes au vin qui peuvent être associées au terroir (Guerrini et al., 2021).

Dans un premier temps les levures ont été sélectionnées sur leur capacité à « fiabiliser » les fermentations, c'est-à-dire diminuer les risques de difficultés fermentaires (Bertolini et al., 1991) (notamment l'arrêt de la fermentation ou les fermentations lentes) mais aussi d'éviter le développement de levures indigènes pouvant être néfastes pour les qualités organoleptiques du vin. Dans un second temps, des critères sur l'amélioration des qualités organoleptiques du vin sont apparus (Fleet, 2008; Guerrini et al., 2021) . Cela a conduit à l'augmentation du nombre de souches de levure proposées sur le marché, avec plus de 200 actuellement.

Ce nombre important de souches conduit à une grande variabilité des caractéristiques : besoins nutritionnels, résistance aux stress de la fermentation œnologiques, productions de composés aromatiques (Gutiérrez et al., 2012; Julien et al., 2000).

Des études ont montré que les capacités des levures peuvent être élargies en les modifiant génétiquement, notamment par transgénèse (Pretorius, 2000). Ainsi une souche OGM de *Saccaromyces cerevisiae* (la souche ML01) est autorisée aux Etats-Unis, au Canada et en Australie depuis 2001 et est utilisée pour la majorité des vins

nord-américains (Septime, 2011). Elle permet la transformation de l'acide malolactique en acide lactique et ainsi de se passer de la fermentation malolactique.

Dans le cadre de cette thèse, les fermentations alcooliques réalisées en souches pures non-modifiées de *Saccharomyces cerevisiae* seront uniquement considérées.

II.A.2.b) Transporteurs des sucres

Les sucres présents dans le moût sont principalement deux hexoses, le glucose et le fructose, présents à part égale, pour une concentration totale comprise entre 150 et 300 g/L (Mendes-Ferreira et al., 2011). Le transport de sucre est considéré comme l'étape limitante de la fermentation œnologique (Malherbe et al., 2004). Les levures produisent des transporteurs à haute et basse affinité. Étant données les concentrations élevées en sucre, les transporteurs à haute affinité sont saturés et seuls les transporteurs à basse affinité peuvent avoir un rôle (Bisson et al., 1993; Ozcan et al., 1995). Il existe 20 transporteurs codés par la famille de gènes Hxt. Leurs propriétés ont été caractérisées par Reifenberger et al. (1997). Il a été démontré par disruption de tous les gènes et réintroduction des gènes un par un dans les mutants que seul un petit nombre de transporteurs jouent un rôle dans la fermentation œnologique (Luyten et al., 2002) :

- Hxt3 joue un rôle majeur pendant toute la fermentation œnologique
- Hxt1 a un rôle majeur mais uniquement au début de la fermentation œnologique
- Hxt2 diminue la phase de latence de la fermentation
- Hxt6 et Hxt7 interviennent en fin de fermentation. Ces deux transporteurs sont à haute affinité (Km autour de 2 mM, c'est-à-dire 0.36g/L). Ils sont produits en fin de fermentation quand la concentration en sucre dans le moût est faible.

Les transporteurs Hxt présentent une plus grande affinité pour le glucose (Bisson et al., 1983) et celui-ci peut réprimer l'expression du transporteur spécifique de fructose Fsy1p (Gonçalves et al., 2000; Rodrigues de Sousa et al., 2004). Cette préférence pour le glucose est dépendante de la souche de levure et des conditions de fermentation (Berthels et al., 2004).

De plus la synthèse des transporteurs est fonction de la quantité initiale d'azote assimilable et de l'ajout d'azote en cours de fermentation (Malherbe et al., 2004).

II.A.2.c) Impact de l'oxygène

Les fermentations œnologiques n'étant pas aérée, une faible quantité d'oxygène est disponible en début de fermentation et va être rapidement utilisée par les levures via leurs mitochondries (Fornairon-Bonnefond et al., 2002).

Pour les fermentations présentant un risque d'arrêt prématuré, un ajout d'oxygène peut réduire ce risque. Ces ajouts sont estimés entre 5 et 10 mg/L (Sablayrolles et al., 1986) et l'ajout est d'autant plus efficace en début de fermentation et en fin de croissance cellulaire (Ribéreau-Gayon et al., 2017). Ces ajouts d'oxygène entraînent une baisse des risques de mortalité des levures en particulier en fin de fermentation (Lafon-Lafourcade, 1980). L'ajout d'oxygène peut être combiné avec l'ajout d'azote (Blateyron et al., 2001). Par contre, si la fermentation ne présente pas de risque d'arrêt prématuré, un ajout d'oxygène n'a aucun effet.

II.A.2.d) Produits de la fermentation

L'éthanol est le métabolite majoritaire de la fermentation : il représente plus de 90 % du volume des métabolites produits et peut atteindre une concentration de 13 à 15 % (v/v) en fin de fermentation.

Le métabolite le plus produit après l'éthanol est le glycérol avec une concentration finale entre 5 et 9 g/L. Il participe à la sensation de moelleux du vin. Sa production permet l'équilibre redox des levures en oxydant l'excès de NADH produit pendant la croissance (Hohmann, 1997) et il joue également un rôle de protecteur dans les mécanismes d'osmorégulation (Remize et al., 1999).

Pendant la fermentation, les levures synthétisent plusieurs composés soufrés qui peuvent avoir un effet négatif sur la qualité du vin. Le composé le plus connu est le sulfure d'hydrogène H_2S mais des composés comme le mercaptan et certains thiols ont un impact négatif non négligeable. La production de sulfure d'hydrogène dépend de plusieurs facteurs comme la concentration en azote assimilable, la concentration des différents acides aminés, la souche de levure et la teneur en oxyde de soufre SO_2 (Rauhut, 1993).

L'éthanol est la molécule dont l'effet inhibiteur est le plus fort sur les levures. L'inhibition par l'éthanol agit principalement sur l'activité des transporteurs d'hexoses (Malherbe et al., 2004), avec un effet plus important pour les transporteurs de fructose que pour les transporteurs de glucose (Mendes-Ferreira et al., 2011). Plusieurs autres produits du métabolisme ont un rôle inhibiteur (Strehaiano, 1984) : les acides gras à courtes chaînes (C6 à C10) (Larue et al., 1984) et l'acide acétique (Edwards et al., 1999).

Certaines souches de *Saccharomyces cerevisiae* sécrètent des toxines « killer », qui sont des protéines toxiques pour d'autres souches de levure présentes dans le milieu et qui vont éliminer les souches les plus sensibles en dénaturant par exemple leur paroi cellulaire (de Ullivarri et al., 2014; Maqueda et al., 2012). Elles peuvent provoquer un arrêt prématuré de la fermentation, une acidité volatile, la production de H_2S et la production de composés diminuant les qualités organoleptiques du vin comme l'acide lactique, l'acétaldéhyde et les huiles de fusel (Barre, 1982; Van Vuuren et al., 1992).

Une concentration excessive en acétate (plus de 700 mg/L) est néfaste pour les qualités organoleptiques du vin. Les souches sélectionnées produisent moins d'acétate mais une production excessive peut arriver dans des conditions spécifiques comme des moûts très clarifiés. Le mécanisme de production de l'acétate est directement corrélé à la déficience en lipides du moût.

Plusieurs sous-produits de fermentation, sont susceptibles d'avoir un impact positif sur les qualités organoleptiques du vin tels que les composés aromatiques (cf. partie II.B).

II.A.3. Cinétique de fermentation

Durant la fermentation alcoolique, la cinétique de croissance peut être divisée en trois phases (cf. Figure II.3) (Bely et al., 1990a) :

- La phase de latence : elle correspond à la reprise de l'activité fermentaire et la saturation du milieu en CO_2. Le dégagement de CO_2 n'est pas détecté par les appareils de mesure pendant cette phase. Elle dépend de la température. Sa durée n'excède pas 24h en condition « normale » de température (entre 18 et 30°C).
- La phase de croissance cellulaire : la population de levure va croître jusqu'à atteindre son maximum. Pendant cette phase, la vitesse spécifique de production de CO_2 et la vitesse de production de CO_2 augmentent rapidement jusqu'à des maximas. Ces maximas sont atteints quand l'azote présent dans le moût est entièrement consommé, mais ils sont toujours atteints avant la concentration maximale en biomasse.
- La phase stationnaire de croissance : la concentration en biomasse reste stable. L'activité des levures diminuent progressivement pendant cette phase jusqu'à s'annuler en fin de fermentation quand la concentration en sucre devient faible. Cette diminution peut être brutale ou plus progressive en fonction du profil de température. La répartition des levures dans le milieu peut devenir hétérogène en fin de fermentation à cause de la décantation. Pendant cette phase, il y a production d'éthanol et de CO_2.

La cinétique fermentaire dépend plus de la composition de moût de fermentation que de la souche de levure utilisée. Ainsi, Bely et al. (1990b) ont montré que la variabilité de la vitesse maximale de production de CO_2 et de la durée de fermentation induite par la souche de levure reste faible : pour un même moût et pour 10 souches industrielles ensemencées de façon similaire, $\left(\frac{dCO_2}{dt}\right)_{max}$ varie entre 1,8 et 2,22 g_{CO2}/(L.h) et la durée de fermentation varie entre 102 à 132 heures.

La Figure II.4 montre les vitesses maximales de production de CO_2 observées sur une centaine de moûts issus de plusieurs régions viticoles françaises pour une même souche de levure. La gamme des vitesses maximales de production de CO_2 à 24°C s'étend de 0,4 à 2,8 g_{CO2}/(L.h) ce qui correspond à des vitesses de consommation de sucre comprises entre 0.85 à 6 g_{sucre}/(L.h). Cependant la vitesse spécifique maximale de production de CO_2 variant très peu, les différences de vitesse maximale de production de CO_2 s'expliquent par le nombre de levures et pas seulement par l'activité spécifique maximale de chaque cellule. Cette variabilité est d'abord due au cépage et au

terroir mais elle dépend également de l'année de récolte : des mesures faites sur 6 années successives montrent que la moyenne de $\frac{dCO_2}{dt}_{max}$ obtenues avec des moûts de 6 parcelles varie entre 0,73 g_{CO2}/(L.h) et 1,35 g_{CO2}/(L.h) (Dubois et al., 1996).

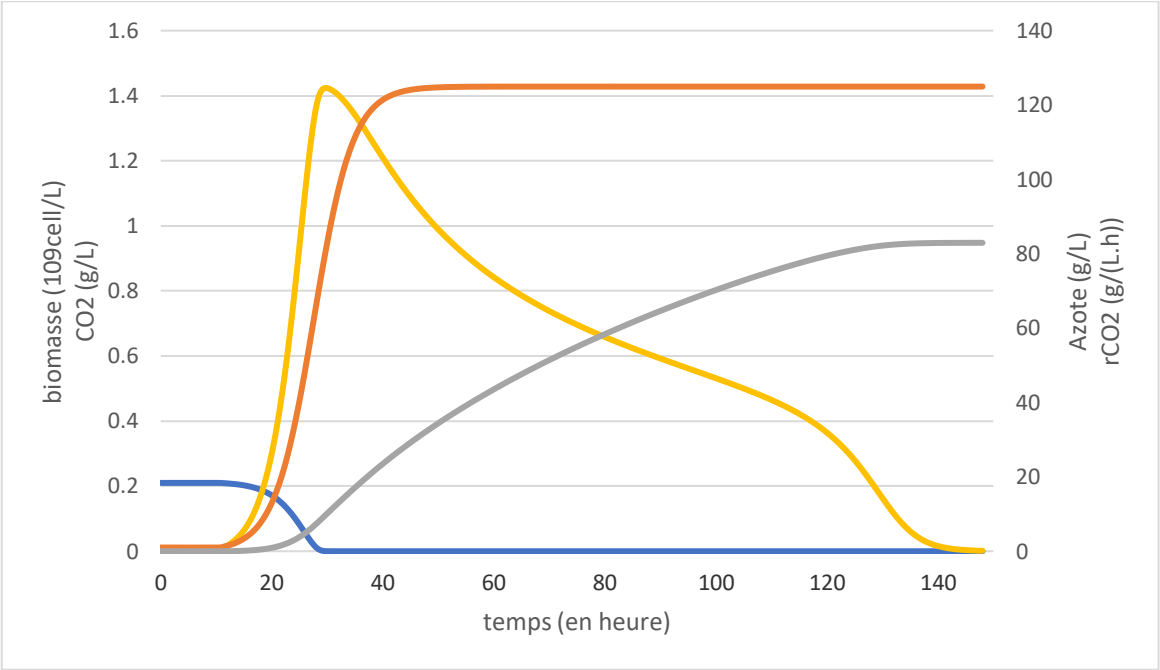


Figure II.3 Cinétique d'une fermentation réalisée pour une température de 23°C, une concentration initiale en azote de 210 mg/L et une concentration en sucre de 180 g/L avec la biomasse (en 10^9cellules/L) représentée en orange, l'azote (en g/L) en bleu, le CO_2 dégagé (en g/L) en gris et la vitesse de dégagement de CO2 (en g/(L.h)) en jaune

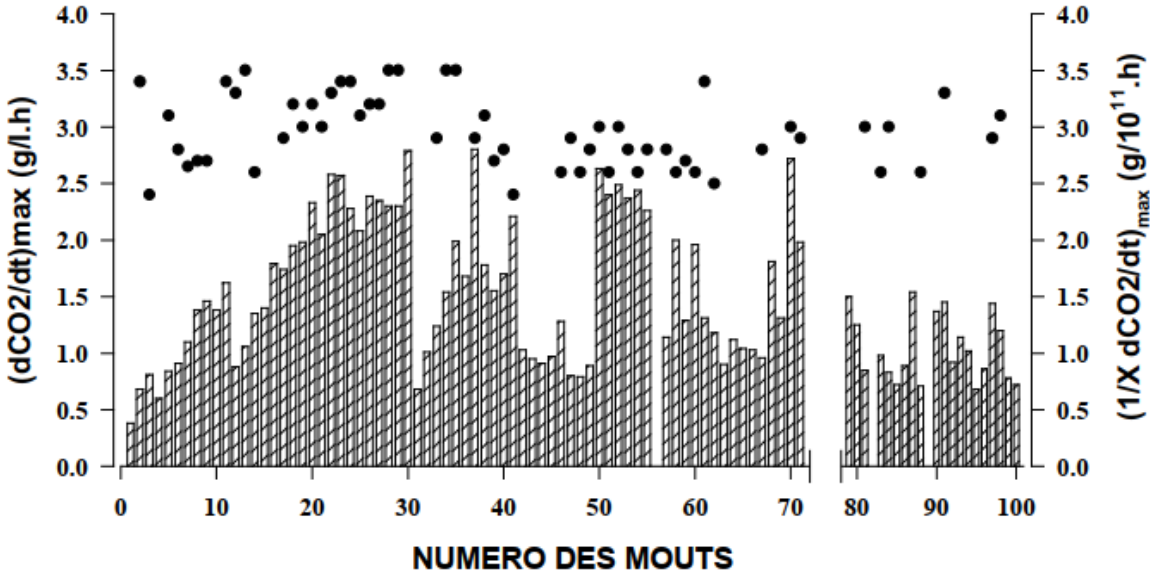


Figure II.4 Variabilité, selon les moûts, de la vitesse maximale de production de CO_2 (diagramme en barre) et de la vitesse spécifique maximale de production de CO_2 (points) à 24°C (Bely et al., 1990b)

II.A.4. Impact de la température

La fermentation est un processus exothermique. Elle génère une production de chaleur de 23.5 kilocalories par mole de sucre consommée (Williams, 1982). Dans des conditions industrielles, la cuve de fermentation va perdre une partie de cette chaleur produite par transfert au niveau de ses parois. Ces pertes ne représentent qu'une faible proportion de la chaleur produite. Il y a donc nécessité de contrôler la température de la fermentation car une température trop importante :

- conduit à une qualité moindre des vins : d'une part, la synthèse des composés aromatiques est favorisée par des températures faibles (Cottrell et al., 1986), d'autre part il y a une partie des composés aromatiques qui est perdue par évaporation (Morakul et al., 2011) .
- peut conduire à l'arrêt de la fermentation : la température a un rôle néfaste sur la viabilité des levures, et sur la tolérance à l'éthanol (Aldiguier et al., 2004; Torija et al., 2003).

Cependant certains les vignerons ne refroidissent pas les cuves de fermentation (coût des frigories), et la plupart des fermentations sont anisothermes.

La température est un des principaux facteurs influant le métabolisme et l'activité de *Saccharomyces cerevisiae* à l'échelle industrielle car la cuve de fermentation présente des hétérogénéités (températures, concentrations ...) (Torija et al., 2003). De plus, chaque espèce de levure présente des températures optimales pour la croissance et pour la production de métabolites (éthanol, arômes ...). Torija et al. (2003) ont étudié l'influence de la température sur la cinétique fermentaire : à basse température, le rendement en alcool est plus élevé mais la production en métabolites secondaires (le glycérol notamment) augmente avec la température. Ce résultat dépend de la souche de levure considérée (Torija et al., 2003).

Ainsi la température influence la cinétique fermentaire. La Figure II.5 montre que la vitesse de fermentation est fonction de la température et du profil de température de la fermentation. Plus la température de fermentation est élevée, plus la vitesse de consommation de sucre est grande en début de fermentation et plus la fermentation est rapide. Pour une fermentation isotherme dont la température est comprise entre 15°C et 25°C, la vitesse de fermentation double pour une augmentation de la température de 8°C (Bely et al., 1990b).

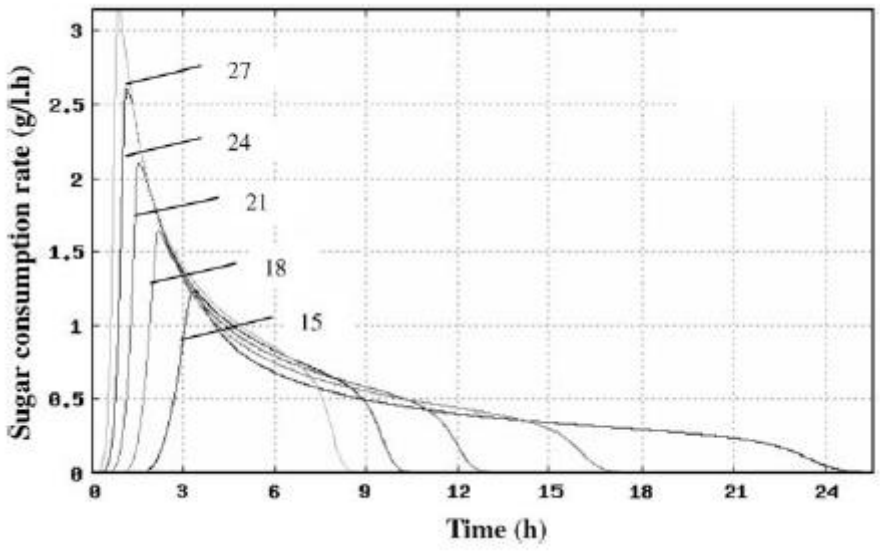


Figure II.5 Simulation de l'effet de la température de fermentation sur la vitesse de consommation du sucre. Les températures considérées sont 15°C, 18°C, 21°C, 24°C et 27°C (Goelzer et al., 2009)

L'évolution de la température est également importante. Sablayrolles et al. (1993) ont étudié l'évolution de la vitesse de production de CO_2 pour une fermentation isotherme à 18, 21, 24 et 30°C et des fermentations avec une température initiale de 18, 21 et 24°C et dont la température évolue librement jusqu'à 30°C. Pour les fermentations isothermes, la vitesse de production de CO_2 augmente jusqu'à atteindre un maximum puis diminue jusqu'à la fin de la fermentation où elle s'annule. Pour les fermentations anisothermes, pendant la phase d'évolution libre de la température, la vitesse de production de CO_2 est quasiment constante à cause de l'échauffement du milieu qui

augmente les activités des enzymes du métabolisme du carbone. En fin de fermentation, la vitesse de production du CO_2 est supérieure pour les fermentations anisothermes par rapport aux fermentations isothermes.

Enfin la vitesse de variation de température a un impact significatif sur la viabilité des levures : plus la vitesse de variation est importante plus la viabilité diminue (Beney et al., 2000; Gervais et al., 1995; Guyot et al., 2005; Guyot et al., 2015; Marechal et al., 1999). En cas de choc thermique (augmentation de la température de 25 à 50°C en une heure), la viabilité des levures est de 1 % de la population (Gervais et al., 1995). De plus, Gervais et al. (1995) ont montré qu'après des augmentations de la température jusqu'à 50°C avec des pentes respectives de 0,208 °C.min^{-1}, de 0,418 °C.min^{-1}, de 0,625°C.min^{-1} et de 1,04°C.min^{-1}, la viabilité cellulaire est respectivement de 5%, 34%, 25% et de 15% ; la faible viabilité après l'augmentation linéaire de la température de 0,208 °C.min^{-1} peut s'expliquer par le temps passé par les levures au-delà de la température critique de *Saccharomyces cerevisiae*, c'est-à-dire au-dessus de 45°C (Sanchez et al., 1992). De plus une diminution du volume cellulaire est observée allant jusqu'à 78 % du volume initial ; cette diminution du volume cellulaire peut être expliquée soit par l'augmentation de la pression osmotique soit par l'augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique (Gervais et al., 1995).

II.A.5. Impact de l'azote

II.A.5.a) Azote dans le moût

L'azote dans le moût se présente sous différentes formes : ion ammonium, acides aminés, peptides, protéines. Les levures assimilent principalement l'ion ammonium et les acides aminés (sauf la proline). Les acides aminés et l'ion ammonium sont présents en quantité équivalente dans le jus de raisin pressé (Henschke et al., 1993).

La teneur en azote assimilable des moûts de fermentation est très variable (cf. Figure II.6), en fonction des régions viticoles françaises, allant de 50 à 440 mg/L. Cette variabilité de la concentration en azote des moûts dépend de plusieurs paramètres (Dubois et al., 1996) :

- Les apports azotés à la vigne : les engrais d'origine naturelle sont mieux assimilés que les engrais chimiques,
- La situation géographique : les moûts des vignobles septentrionaux sont plus concentrés que les moûts des vignobles méridionaux,
- Les cépages : certains cépages sont systématiquement plus riches en azote,
- Le millésime : les conditions climatiques peuvent changer la concentration en azote du simple au double,
- La maturation : la maturation est la période de formation du raisin pendant laquelle la concentration en azote assimilable varie le plus. La concentration en azote a tendance à diminuer pendant la maturation. L'azote ammoniacal est le composé azoté dont la concentration diminue le plus.

Une concentration d'azote de 140 mg/L est considérée comme suffisante pour finir la fermentation d'un moût de raisin ayant une concentration d'environ 258 grammes de saccharose par litre (Agenbach, 1977) et une concentration six fois plus élevée est requise pour que l'azote ne soit plus limitant (Kunkee et al., 1972).

Mendes-Ferreira et al. (2011) ont montré qu'une concentration en azote de 267 mg/L était nécessaire pour réaliser une fermentation d'un moût de 200 g/L de sucre en un temps raisonnable industriellement (de l'ordre d'une à deux semaines) et une concentration plus faible en azote (en-dessous de 140 mg/L) peut conduire à une fermentation lente ou bloquée. Cette concentration minimale en azote pour réaliser une fermentation non lente ou non bloquée, varie en fonction de la souche utilisée (Manginot et al., 1998; Taillandier et al., 2007).

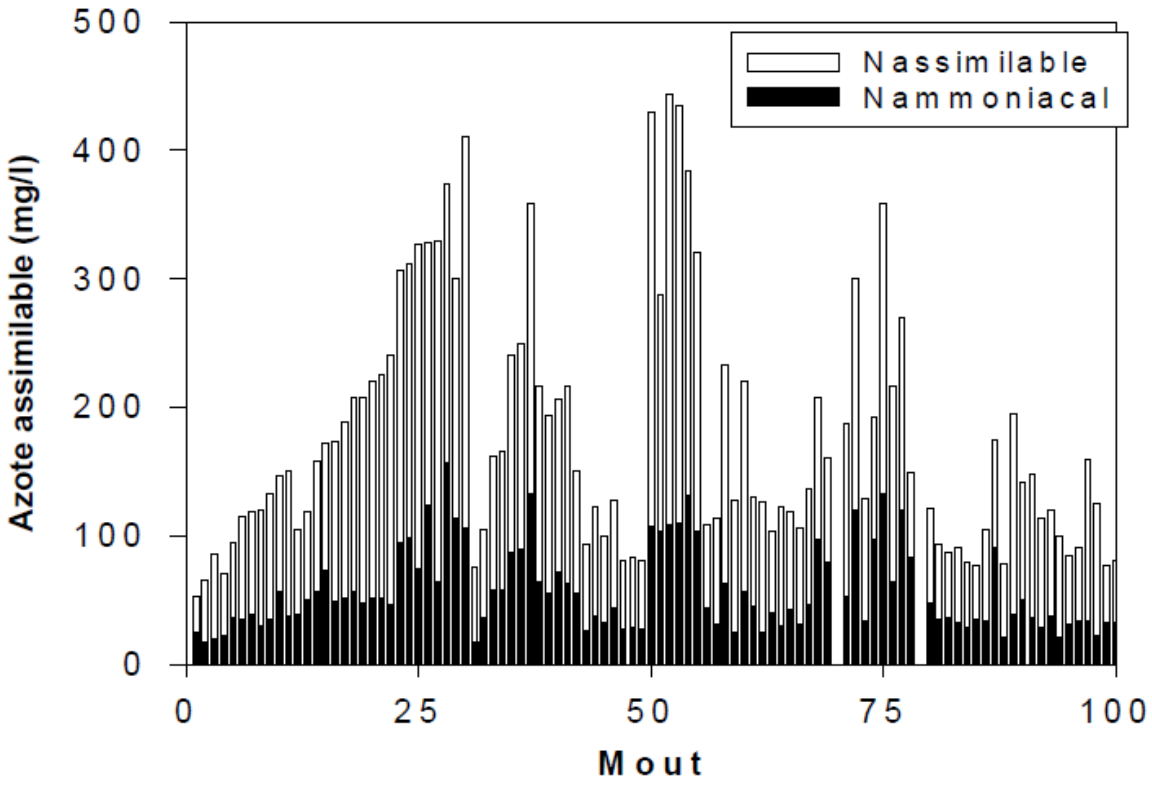


Figure II.6 Variabilité de la concentration totale en azote de différents moûts issus de différentes régions viticoles françaises (Bely et al., 1990a)

II.A.5.b) Métabolisme de l'azote chez la levure

L'azote assimilable du moût est indispensable pour les levures car l'azote intervient dans la synthèse de protéines et des acides nucléiques nécessaires pour sa croissance.

II.A.5.b.(1) Assimilation de l'azote

Les différentes sources d'azote ne sont pas assimilées de manière concomitante ni à la même vitesse par les levures. Elles sont assimilées dans cet ordre : lysine, asparagine, thréonine, glutamate, leucine, histidine, méthionine, isoleucine, serine, glutamine, phénylalanine, NH_4^+, valine, arginine, alanine, tryptophane, tyrosine et glycine (Jiranek et al., 1990).

Les acides aminés suivants lysine, asparagine, thréonine, glutamate, leucine, histidine, méthionine, isoleucine, serine, glutamine et phénylalanine sont consommés au début de la phase de croissance de la biomasse alors que les sources d'azote assimilable suivantes NH_4^+, valine, arginine, alanine, tryptophane, tyrosine et glycine sont consommées à la fin de la phase de croissance. Enfin la proline est très peu assimilée pendant la fermentation (Jiranek et al., 1990) car cette assimilation nécessite de l'oxygène et une chaîne d'électrons fonctionnelle pour ouvrir le cycle de la proline (Wang et al., 1986).

Cette assimilation séquentielle ne semble pas être liée à la concentration des différentes sources d'azote assimilable même si la concentration intervient dans les mécanismes de régulation des transporteurs des acides aminés. En effet la lysine est la première source d'azote assimilée alors qu'elle est l'acide aminé le moins abondant alors que la glutamine, acide aminé le plus abondant, est assimilée moins rapidement que la lysine (Crépin et al., 2012). La préférence pour les acides aminés dépend aussi de la souche de levure utilisée (Taillandier et al., 2007).

La plupart des acides aminés entrent dans les levures par transport actif et s'accumulent principalement dans la vacuole. Il existe plusieurs transporteurs d'acides aminés en fonction de la structure des acides aminés (Crépin et al., 2012).

Le transport des ions NH_4^+ est actif et couplé avec une sortie de protons qui conduit à une acidification du milieu fermentaire. Les ions ammonium sont stockés principalement dans le cytosol (85 %) et dans la vacuole (15 %) (Cueto-Rojas et al., 2016).

II.A.5.b.(2) Catabolisme de l'azote

Le métabolisme de l'azote est en relation avec d'autres métabolismes (cf. Figure II.7) : métabolisme des sucres, formation d'arômes fermentaires, de H_2S ... La régulation de l'activité des enzymes du métabolisme de l'azote est très complexe et assez mal connu (Henschke et al., 1993). L'azote intervient également dans la régulation du métabolisme des arômes, notamment dans la voie de synthèse des esters qui sera présentée dans la section II.B.1.b).

Les acides aminés peuvent être :

- intégrés directement dans les protéines
- désaminés pour fournir de l'azote à la levure.

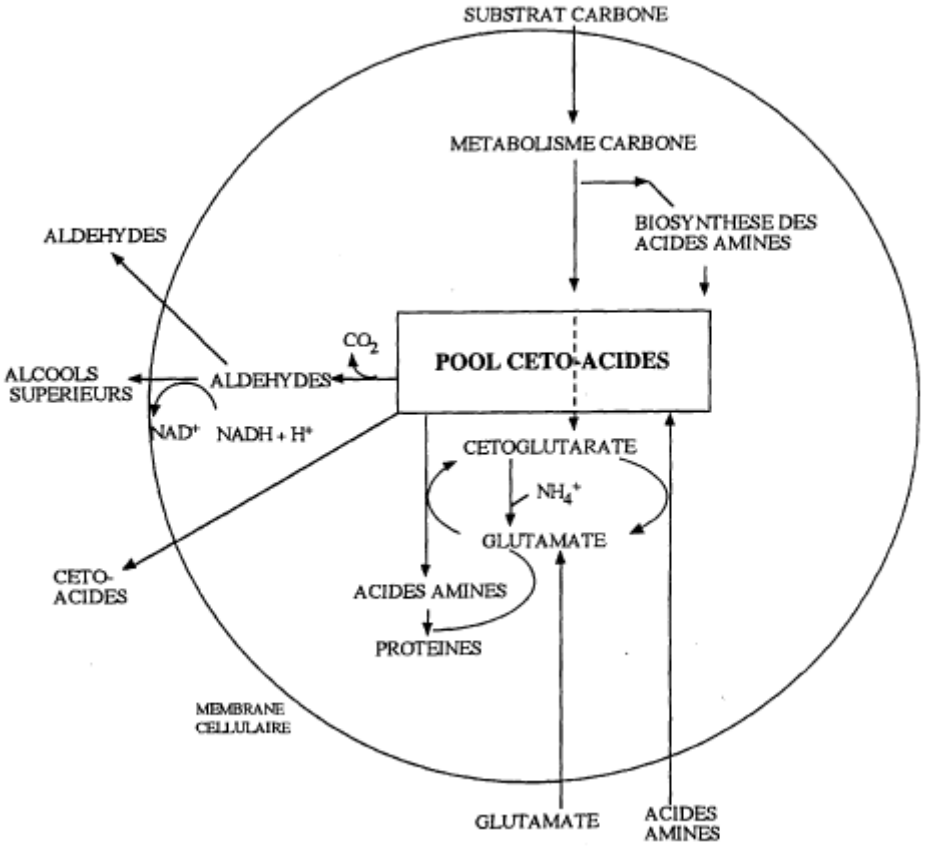


Figure II.7 Interactions du métabolisme azoté avec d'autres voies métaboliques (Hough et al., 1982)

II.A.5.b.(3) Importance de l'azote assimilable sur la cinétique fermentaire

L'azote assimilable semble être un des principaux facteurs influençant la cinétique fermentaire. Ainsi Bely (1990) a montré qu'il existe une corrélation entre la vitesse maximale de production de CO_2 et la concentration initiale en azote assimilable des moûts (cf. Figure II.8).

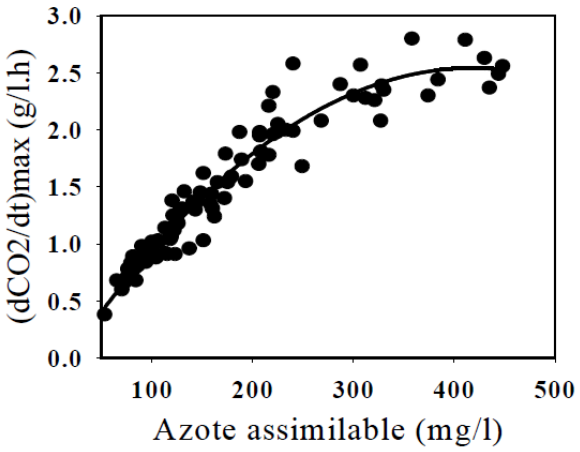


Figure II.8 Relation entre la vitesse maximale de production de CO2 et la teneur en azote assimilable à 24°C (Bely, 1990)

Lorsqu'un ajout d'azote est réalisé en cours de fermentation, la vitesse de production de CO_2 augmente (cf. Figure II.9) quel que soit le degré d'avancement au moment de l'ajout. De plus la durée de la fermentation est réduite avec cet ajout, et cette diminution est d'autant plus grande que l'ajout est précoce. Pour un ajout réalisé dans la première moitié de la fermentation, une recroissance de la population de levures est également observée (Malherbe et al., 2004).

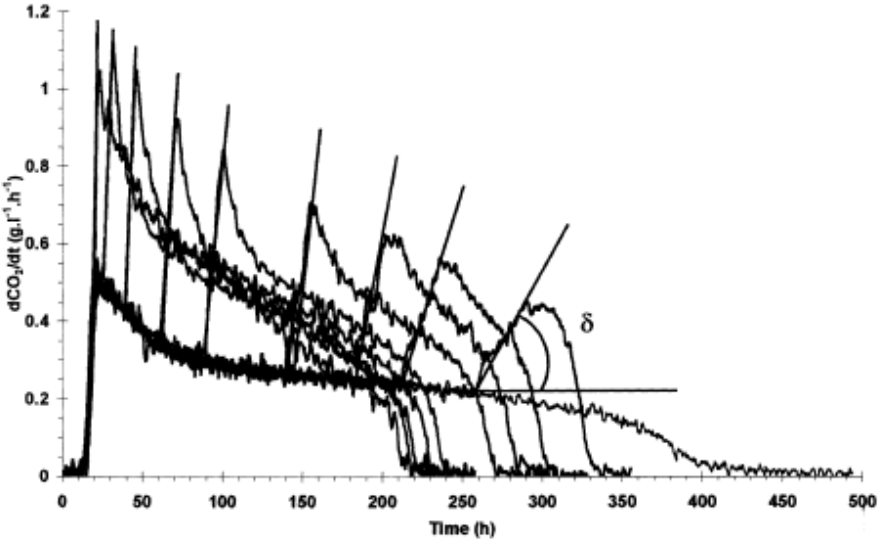


Figure II.9 Modification de la vitesse de production de CO_2 par l'ajout de 300 mg/L de $(NH_4)_2HPO_4$ à différents dégagement de CO_2 (0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 et 70 g/L). L'azote initial est de 70 mg/L. (Malherbe et al., 2004)

Certains moûts peuvent présenter un problème de conduite de la fermentation (fermentation lente ou bloquée) qui peut se corriger avec un ajout d'azote couplé à l'aération du moût (Bely, 1990).

D'un point de vue énergétique, le meilleur moment d'ajout d'azote est à la mi-fermentation car la demande maximale en frigorie est significativement plus faible et la diminution du temps de fermentation reste importante (Bely, 1990).

II.B. Synthèse des arômes en condition œnologique

Plusieurs centaines de composés aromatiques ont été identifiés dans le vin. Ils proviennent :

- du raisin : appelés arômes variétaux, ils dépendent du cépage (variété de la vigne). Les arômes variétaux sont principalement des monoterpènes. Le raisin contient également des précurseurs d'arômes qui seront convertis pendant la vinification en arômes (principalement en thiols volatils pour les cépages sauvignon et cabernet sauvignon) (Ruiz et al., 2019).
- de la fermentation : ils dépendent de la souche de levure et des conditions de fermentation. Leurs natures et leurs synthèses sont présenté dans cette partie.
- du vieillissement. Ce sont des arômes provenant du bois, si le vin est élevé en fût (ellagitanins du bois de chêne, lactones, …).

De plus, le terroir (sol, géologie, climat et relief), les pratiques de culture de la vigne (type d'engrais utilisé : biologique ou chimique, maturité du raisin à la vendange ...) ainsi que les conditions météorologiques vont influencer la composition du raisin (sucres, composés azotés, sels minéraux, arômes variétaux, ...) et donc la production des arômes de fermentation. Pendant le vieillissement, la concentration des arômes de fermentation peut diminuer et d'autres arômes apparaître.

Les deux principales familles d'arômes produits pendant la fermentation sont les alcools supérieurs et les esters. Elles seront décrites plus en détails dans les parties suivantes. L'éthanol n'a pas d'effet sur le goût du vin (Styger et al., 2011) mais d'autres molécules produites par les levures influencent également les qualités organoleptiques du vin : le glycérol, les acides gras et les composés soufrés. Le glycérol apporte au vin un caractère gras et moelleux. Une étude a montré que la concentration en glycérol n'a aucun impact sur la qualité d'un vin rouge alors que la relation statistique entre la concentration en glycérol et la qualité perçue de tous les types de vin blanc est significative (Nieuwoudt et al., 2002). Parmi les composés soufrés, certains ont une influence bénéfique sur le vin comme le sulfure de diméthyle (Du Plessis et al., 1974) mais son apport aux qualités organoleptiques du vin est complexe : à des concentrations élevées dans les vins très évolués, il apporte des notes de truffes tandis qu'à des concentrations faibles il apporte une note fruitée dans les vins rouges (Anocibar Beloqui, 1998; Escudero et al., 2007; Segurel et al., 2004). La plupart des composés soufrés ont une influence négative comme le sulfure d'hydrogène qui a une odeur d'œufs pourris et a un seuil de détection très faible (moins de 10 ppm). Certains thiols volatils ont un impact positif sur les qualités organoleptiques du vin comme le 4-mercapto-4-methylpentan-2-one, le 3-mercaptohexan-1-ol et l'acétate de 3-mercaptohexyl qui donne respectivement des caractères de fruits de la passion, de pamplemousse ou de citron (Fleet, 2008).

Le seuil de détection est une notion critiquée car il n'indique que la concentration pour laquelle le consommateur détecte un arôme mais il ne permet pas de savoir l'intensité de perception d'un arôme pour une concentration donnée (Pangborn, 1980) : un arôme peut avoir un seuil de détection bas et être faiblement ressenti par le consommateur à des concentrations élevées et à l'inverse un arôme peut avoir un seuil de détection élevé et être fortement ressenti par le consommateur pour des concentrations peu supérieure au seuil de détection.

Dans cette thèse, cinq arômes produits pendant la fermentation seront étudiés. Deux alcools supérieurs (l'isobutanol et l'alcool isoamylique), un acétate d'ester (l'acétate d'isoamyle) et deux esters d'éthyle (l'hexanoate d'éthyle et l'octanoate d'éthyle) car ces arômes ont une grande importance dans les qualités organoleptiques du vin et ce sont des arômes considérés comme représentatifs de leur famille d'arômes. Les concentrations, les seuils de détections et les contributions de ces cinq arômes sont présentés dans le Tableau II.1.

Tableau II.1 Caractéristiques des cinq arômes considérés (Convention, 1975)

Nom	Concentration (mg/L)	Seuil de détection (ppm)	Odeur
Alcool isoamylique	45 - 490	65	alcool, solvant
Isobutanol	40 - 140	200	fruité, alcool, solvant
Acétate d'isoamyle	0,03 - 8,1	1,6	banane, poire, fraise, framboise
Octanoate d'éthyle	1 - 3,5	0,9	fruit, doux, bière
Hexanoate d'éthyle	0,8 - 2,7	0,23	fraise, pomme, anis

II.B.1. Voies de biosynthèse des arômes

La Figure II.10 montre que les voies de biosynthèses des arômes considérés sont liées aux métabolismes du carbone et de l'azote. De plus, les alcools supérieurs sont des précurseurs des esters d'acétate ; parmi les cinq arômes considérés dans cette thèse, l'alcool isoamylique est précurseur de l'acétate d'isoamyle.

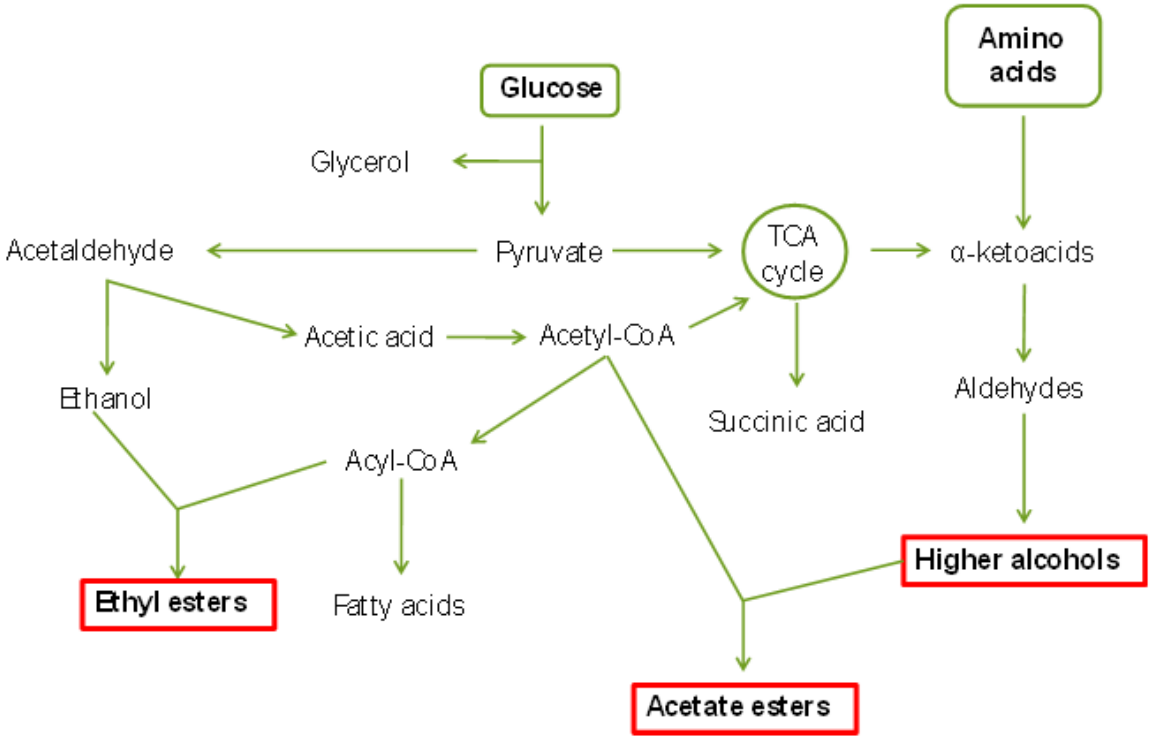


Figure II.10 Schéma simplifié des voies métaboliques de production des arômes

II.B.1.a) Synthèse des alcools supérieurs

Les alcools supérieurs sont une famille de molécules ayant une fonction alcool, plus de deux atomes de carbone et une masse moléculaire supérieure à celle de l'éthanol. Une concentration trop élevée (supérieure à 400mg/L) en alcools supérieurs peut avoir un effet négatif sur le goût du vin (Styger et al., 2011).

Plus de 90 % des alcools supérieurs sont produits à partir du pyruvate, via le métabolisme central du carbone ou l'α-acétolactate (Rollero et al., 2017; Swiegers et al., 2005) (cf. Figure II.10), le reste à partir des acides aminés par la voie de Ehrlich (Ehrlich, 1907; Neubauer et al., 1911). La formation des alcools supérieurs à partir du pyruvate est faite dans le cytosol alors qu'elle est réalisée dans la mitochondrie à partir des acides aminés (Wess et al., 2019). La voie de synthèse des alcools supérieurs comprend trois étapes (Hazelwood et al., 2008; Styger et al., 2011) :

- La formation d'un α-cétoacide à partir du pyruvate ou d'un acide aminé par une réaction de transamination. Cette étape est irréversible.
- L'α-cétoacide est décarboxylé pour former un aldéhyde.
- L'aldéhyde est réduit en alcool supérieur. Cette étape est dépendante du $NADH,H^+$.

Les acides aminés précurseurs de l'alcool isoamylique et de l'isobutanol sont respectivement la leucine et la valine. Ces deux acides aminés dérivent du glutamate (Ljungdahl et al., 2012) (cf. Figure II.11).

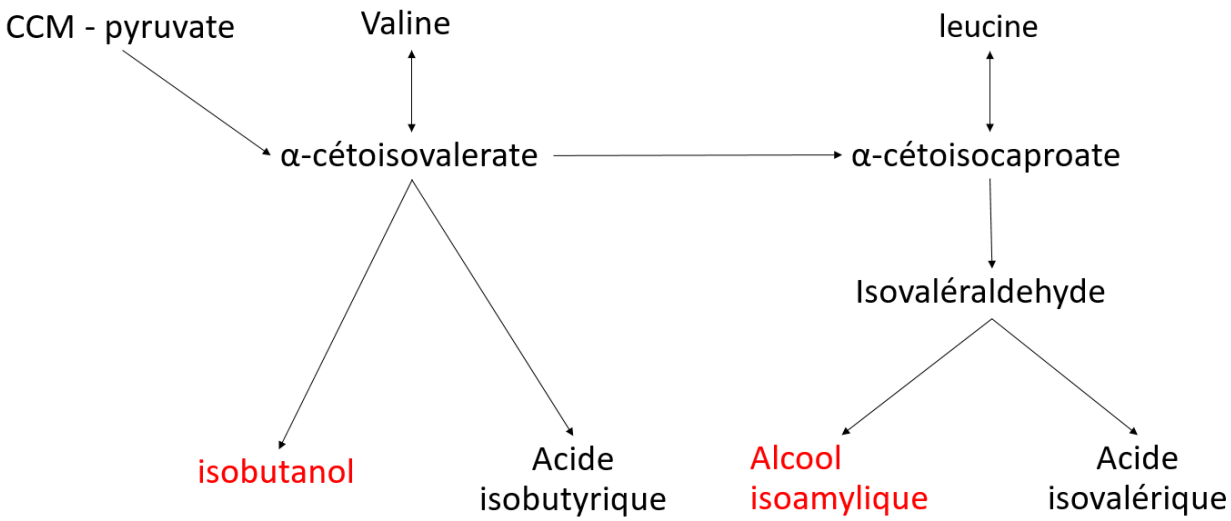


Figure II.11 Voie de synthèse de l'alcool isoamylique et de l'isobutanol (Crépin et al., 2017; Zhang et al., 2008)

II.B.1.b) Synthèse des esters

L'acétate d'isoamyle est formé par estérification de l'acétyl-coenzyme A et de l'alcool isoamylique. Cette réaction est catalysée par plusieurs alcool acétyltransferases dont les principales sont codées par les gènes ATF1 et ATF2 (Hirst et al., 2016).

Les esters d'éthyle comme l'hexanoate d'éthyle ou l'octanoate d'éthyle sont formés par la réaction d'estérification entre un acyl-coenzyme A et un éthanol (cf. Figure II.12). L'hexanoate d'éthyle est formé à partir de l'hexanoyl-CoA et l'octanoate d'éthyle est formé à partir de l'octanoyl-CoA. L'hexanoate d'éthyle et l'octanoate d'éthyle sont aussi formés pendant la fermentation malolactique et leurs concentrations peuvent varier pendant le vieillissement en bouteille (Styger et al., 2011).

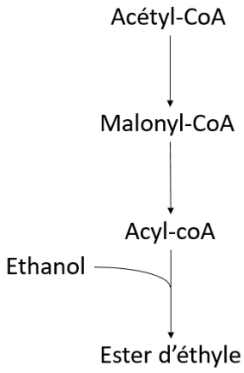


Figure II.12 Voie métabolique de formation d'esters d'éthyle (Hirst et al., 2016)

II.B.2. Paramètres influençant la synthèse des arômes

La synthèse des arômes dépend de la souche de levure utilisée ; celle-ci affecte la concentration en esters mais aussi la proportion relative de chaque ester (Zhang et al., 2008). Ainsi certaines souches de levure commercialisées ont été sélectionnées pour atteindre un profil aromatique donné. Plusieurs paramètres environnementaux peuvent également influer sur la synthèse des arômes.

II.B.2.a) Influence de la température

La température n'influence que très peu la synthèse des arômes (Fujiwara et al., 1999). Elle peut modifier l'expression des gènes ATF1 et ATF2 codant pour des alcools acétyltransferases catalysant l'estérification des alcools supérieurs (Fujiwara et al., 1999), le gène ATF2 étant plus tolérant à la température.

La température va surtout avoir un effet sur l'évaporation des arômes (Morakul et al., 2011). Cet effet sera détaillé dans la partie II.C.3.b.(2).

II.B.2.b) Influence de l'azote

Plusieurs études de SPO (Godillot et al., 2022; Mouret et al., 2014; Rollero et al., 2014) ont montré que l'influence de l'azote peut être décomposée entre la concentration initiale en azote, le timing d'ajout d'azote et la quantité d'azote ajouté en cours de fermentation. La nature de l'azote ajouté (ion ammonium ou acides aminés) peut aussi influer sur la production des arômes (Jiménez-Marti et al., 2007).

Pour étudier l'influence de la concentration initiale en azote, du timing d'ajout d'azote et de la concentration en azote ajouté sur la synthèse des arômes, Godillot et al. (2022) ont construit un modèle statistique à partir de données issues de fermentations provenant d'un plan d'expérience de type Box-Benkhen. Les résultats de Godillot et al. (2022) sont présentés ci-dessous.

II.B.2.b.(1) Formation des alcools supérieurs et des esters d'acétate

Pour la production des alcools supérieurs, un effet d'interaction positif entre l'azote initial et le timing d'ajout ainsi qu'un effet quadratique négatif de l'azote ajouté sont observés (Godillot et al., 2022). L'azote ajouté a un effet positif et le timing d'ajout un effet négatif sur la production de l'acétate d'isoamyle. Donc plus l'ajout d'azote est précoce et plus la quantité d'azote ajouté est importante, plus la production d'acétate d'isoamyle est importante (Godillot et al., 2022).

L'azote initial a un effet linéaire positif seulement pour la production d'isobutanol (Godillot et al., 2022).

Pour le ratio acétate d'isoamyle/alcool isoamylique, l'azote initial et l'azote ajouté ont des effets linéaires positifs (Godillot et al., 2022). Un effet négatif d'interaction entre le timing d'ajout et la concentration en azote ajouté sur le ratio acétate d'isoamyle/alcool isoamylique est observé (Godillot et al., 2022). Le timing d'ajout d'azote présente à la fois un effet linéaire négatif et un effet quadratique négatif sur le ratio acétate d'isoamyle/alcool isoamylique (Godillot et al., 2022). Donc, pour maximiser la conversion des alcools supérieurs en esters d'acétate, il faut augmenter la concentration initiale en azote ou ajouter de l'azote en cours de fermentation, l'effet maximum survenant pour un ajout précoce (Godillot et al., 2022).

II.B.2.b.(2) Formation des esters d'éthyle

Pour la production d'acide hexanoïque, l'azote initial a un effet linéaire significatif positif alors que le timing d'ajout a un effet linéaire négatif (Godillot et al., 2022). Des effets d'interaction négative entre les facteurs azote initial et timing d'ajout ainsi qu'entre l'azote ajouté et le timing sont observés.

Par contre, aucun des trois paramètres n'a d'effet sur la production d'hexanoate d'éthyle car les esters d'éthyle ne sont pas liés au métabolisme de l'azote mais au métabolisme des lipides (Godillot et al., 2022).

Pour les ratios entre hexanoate d'éthyle/acide hexanoïque et octanoate d'éthyle/acide octanoïque, l'azote initial a un effet linéaire négatif alors que l'azote ajouté et le timing d'ajout ont des effets linéaires positifs (Godillot et al., 2022). Ces effets sont opposés à ceux montrés pour les ratios acétate/alcool supérieur ce qui suggère des mécanismes de régulation différents (Godillot et al., 2022).

Un effet d'interaction positif est également observé entre la concentration initiale en azote et le timing d'ajout et entre l'azote ajouté et le timing d'ajout pour les ratios hexanoate d'éthyle/acide hexanoïque et octanoate d'éthyle/acide octanoïque (Godillot et al., 2022). Un effet quadratique positif du timing d'ajout et un effet quadratique négatif de la concentration initiale en azote sont observés pour les ratios hexanoate d'éthyle/acide hexanoïque et octanoate d'éthyle/acide octanoïque (Godillot et al., 2022).

II.B.2.b.(3) Influence de l'azote sur la régulation des gènes ATF1 et ATF2

Les gènes ATF1 et ATF2 codent pour des alcools acétyltransférases catalysant l'estérification des alcools supérieurs, dans le cadre de cette thèse la conversion de l'alcool isoamylique en acétate d'isoamyle et de l'isobutanol en acétate disobutyle (Fujiwara et al., 1999). L'azote assimilable régule l'expression des gènes ATF1et ATF2 mais la nature des composés azotés intervenant dans les mécanismes de cette régulation est encore mal connue (Fujiwara et al., 1999).

II.B.2.c) Influence de l'oxygène et des acides gras

La présence d'oxygène ou d'acide gras sont des facteurs influençant fortement les concentrations en alcools supérieurs et en esters (Quain, 1985; Taylor et al., 1979; Verstrepen et al., 2003). L'oxygène et les acides gras diminuent la production en esters car ils inhibent l'expression des gènes ATF1 et ATF2 codant pour les alcools acétyltransferases qui catalysent la conversion des alcools supérieurs en esters (Fujii et al., 1997). Cela expliquerait l'augmentation de la concentration en alcools supérieurs et la diminution en esters. L'influence de l'oxygène sur la production d'alcools supérieurs est dépendante de la souche de levure (Lilly et al., 2006).

L'inhibition de l'expression des gènes ATF1 et ATF2 est différente en fonction des acides gras : elle est particulièrement importante pour l'acide oléïque (18:1) et l'acide linoléique (18:3). Mais elle n'est pas observée pour l'acide stéarique (18:0). Une forte concentration en acides gras inhibe la production des acétate d'esters car les acides gras vont être activés par la CoenzymeA pour être intégrés dans la membrane ; cette consommation de la coenzyme A inhibe la production de l'acétyl-CoA et donc diminue la production d'acétate d'esters (Calderbank et al., 1994; Thurston et al., 1981).

Comme les cuves œnologiques ne sont pas équipées pour oxygéner le milieu de fermentation et que la réglementation n'autorise pas d'ajouts d'acides gras (Commission, 2019), les vignerons ne peuvent pas modifier ces paramètres. De plus, une concentration trop forte en alcools supérieurs a un effet négatif sur le goût du vin (Styger et al., 2011).

II.B.3. Synthèse des arômes en fonction du temps

Les données expérimentales montrent que la production d'arômes n'est pas constante au cours du temps : les arômes étudiés sont très peu produits au début de la fermentation et leur production est maximale quand la biomasse a atteint la phase stationnaire de la croissance (Mouret et al., 2014). La production des esters en début de fermentation est faible car l'acétyl-CoA est fortement utilisé pour la synthèse de biomasse par les levures et donc n'est pas disponible pour la synthèse d'esters (Peddie, 1990). La faible production en alcools supérieurs en début de fermentation peut également être expliquée par l'utilisation importante des précurseurs des alcools supérieurs (pyruvate et acides aminés) pour la synthèse de biomasse.

II.C. Modélisation

Dans cette partie, l'état de l'art sur la modélisation de la fermentation alcoolique sera présenté en focalisant en fin de partie sur les modèles que nous utiliserons comme base de travail pour la thèse :

- un modèle de la production d'éthanol par *Saccharomyces cerevisiae*,
- trois modèles en conditions œnologiques et
- un modèle de la synthèse des arômes.

II.C.1. Présentation générale de la modélisation des cinétiques microbiennes

II.C.1.a) Différentes approches de modélisation

Plusieurs approches de modélisation sont utilisées dans la littérature pour décrire les phénomènes biologiques :

- Modèles statiques ou dynamiques : les modèles dynamiques sont des modèles dont l'évolution des variables dépend du temps alors que dans le cadre des modèles statiques ou stationnaires, les variables des modèles sont invariantes au temps.
- Modèles discrets ou continus : les variables des modèles discrets sont simulées par des fonctions discontinues alors que les variables des modèles continus sont simulées par des fonctions continues.
- Modèles déterministes ou stochastiques : les modèles déterministes sont des modèles où chaque état des variables du modèle est uniquement déterminé par les états précédents des variables du modèle et par les paramètres du modèle. Au contraire, les modèles stochastiques sont des modèles où l'aléatoire est présent, c'est-à-dire que les états des variables du modèle ne sont pas décrits par des valeurs uniques mais par des distributions de probabilités.
- Modèles phénoménologiques : les modèles phénoménologiques décrivent les relations empiriques des phénomènes biologiques, physiques, chimiques ou autres entre eux, d'une manière qui est cohérente avec la théorie. Ils décrivent les phénomènes mis en jeu mais ne cherchent pas à les expliquer.
- Modèles « boites noires » ou modèles « boites blanches » : les modèles « boites noires » sont basés sur des équations empiriques et les modèles « boites blanches » sont basés sur des équations de connaissance (sur des relations stœchiométriques par exemple).
- Modèles de population : Les modèles de population sont des modèles où la population étudiée est divisée entre plusieurs classes en fonction d'un ou plusieurs paramètres : par exemple, diviser la population entre classes d'âge pour des espèces pluriannuelles ou selon l'état physiologique pour des micro-organismes.

Dans cette thèse, nous nous intéresserons aux modèles dynamiques phénoménologiques basés sur des fonctions continues et déterministes car les modèles développés devront pouvoir être utilisé dans une loi de commande.

II.C.1.b) Modèles phénoménologiques

II.C.1.b.(1) Cinétiques de croissance de la biomasse

La croissance de la biomasse est le principal processus biologique à modéliser du fait de son rôle central de catalyseur dans la fermentation. Elle est influencée par des conditions physiques, chimiques et biologiques de la fermentation. En écrivant le bilan matière, l'équation de la production de la biomasse dans un réacteur fermé (batch) peut être décrite de la façon suivante :

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \qquad (II.1)$$

avec X la concentration en biomasse et μ le taux de croissance. Le plus souvent l'expression mathématique permettant de calculer la valeur du taux de croissance fait intervenir un taux de croissance maximale (μ_{max}) qui dépend du microorganisme et des conditions environnementales.

Dans la littérature, plusieurs équations sont utilisées pour décrire le taux de croissance. Une liste non exhaustive présentée dans les paragraphes II.C.1.b.1.(a), II.C.1.b.1.(b), II.C.1.b.1.(c), II.C.1.b.1.(d), II.C.1.b.1.(e) et II.C.1.b.1.(f) donne les principales équations en fonction des phénomènes pris en compte.

II.C.1.b.1.(a) Equation en fonction du substrat

Le taux de croissance dépend de la concentration en substrat. Une concentration en substrat trop élevée peut entraîner un stress osmotique et donc une inhibition alors qu'une concentration trop faible rend le substrat moins assimilable pour la levure. Plusieurs équations intègre l'effet du substrat sur le taux de croissance :

- Modèle de Monod (1949) :

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S} \quad (II.2)$$

  K_S représente l'affinité des micro-organismes au substrat : plus K_S est faible, plus l'affinité est forte.
- Inhibition par le substrat (Andrews, 1968) :

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{S + K_S + \frac{S^2}{K_{SI}}} \quad (II.3)$$

  Le terme $\frac{S^2}{K_{SI}}$ représente l'inhibition de la croissance par le substrat.
- Modèle de Monod sur deux substrats (Carcano, 2009) :

$$\mu = \mu_{max,1} \frac{S_1}{K_{S1} + S_1} + \mu_{max,2} \frac{S_2}{K_{S2} + S_2} \quad (II.4)$$

  La levure croît sur deux substrats S_1 et S_2 indépendamment. Ce modèle est généralisable pour n substrats (n supérieur à 2).
- Modèle de Tessier (1942) :

$$\mu = \mu_{max} X \left(1 - e^{\frac{-S}{K}}\right) \quad (II.5)$$

  Avec K la constante cinétique.
- Modèle de Moser (1958) :

$$\mu = \mu_{max} \frac{S^n}{S^n + K_S} \quad (II.6)$$

  Avec K_S la constante d'affinité et n constant et strictement positif.
- Modèle de Hanson et al. (1972) :

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S - S} \quad (II.7)$$

  K_S est la constante d'affinité de la levure au substrat.

II.C.1.b.1.(b) Equations qui prennent en compte une inhibition par les produits de fermentation

Certains métabolites produits par les microorganismes sont des inhibiteurs de la croissance en agissant sur l'activité cellulaire. Pour les levures, le principal métabolite inhibant la croissance est l'éthanol qui agit sur les transporteurs de sucre et perméabilise la membrane plasmique. Plusieurs fonctions mathématiques existent pour introduire l'inhibition par un produit (P) de la fermentation :

- Inhibition linéaire par le produit (Holzberg et al., 1967) :

$$\mu = \mu_{max}(1 - \alpha P) \quad (II.8)$$

  Plus la concentration en produit est importante, plus l'inhibition est importante.
- Inhibition hyperbolique par le produit (Levenspiel, 1980) :

$$\mu = \mu_{max} \left(1 - \frac{P}{P_{max}}\right)^{\alpha} \quad (II.9)$$

  Avec α strictement positif. Le taux spécifique de croissance diminue hyperboliquement avec la concentration en produit P jusqu'à s'annuler quand la concentration en produit atteint P_{max}.
- Inhibition par le produit (Tayeb et al., 1984) :

$$\mu = \mu_{max} \frac{K_P}{K_P + P} \quad (II.10)$$

  K_P traduit l'inhibition par le produit, plus il est faible, plus l'inhibition du produit est forte.
- Inhibition exponentielle par le produit (Taniguchi et al., 1987) :

$$\mu = \mu_{max} e^{-aP+b} \quad (II.11)$$

a et b sont des constantes empiriques.

II.C.1.b.1.(c) Equations permettent d'intégrer la température (T) dans le taux de croissance

La température modifie le taux de croissance car une température élevée dénature les protéines et empêche l'activité cellulaire alors qu'une température trop faible diminue l'activité enzymatique et va diminuer le taux de croissance. Il existe donc une température optimale de croissance des levures.

- Modèle d'Arrhénius (Taoukis et al., 1999) :

$$\mu_{max} = \mu_{ref} exp\left(\frac{-E_{app}}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right) \quad (II.12)$$

T est la température absolue, μ_{ref} est le taux de croissance à la température T_{ref}, R est la constante des gaz parfaits et E_{app} l'énergie d'activation apparente.

- Modèle de Carcano (2009) :

$$\mu = Aexp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) + Bexp\left(\frac{-E_{a,high}}{RT}\right) \quad (II.13)$$

R est la constante des gaz parfait, T la température, E_a est l'énergie d'activation de la croissance cellulaire et $E_{a,high}$ est l'énergie d'activation de dénaturation de la biomasse.

- Modèle de Nielsen et al. (2011) :

$$\mu_{max} = \frac{Aexp\left(\frac{-E_a}{RT}\right)}{1 + Bexp\left(\frac{-\Delta G_d}{RT}\right)} \quad (II.14)$$

E_a est l'énergie d'activation de la croissance cellulaire et ΔG_d est l'énergie libre pour laquelle les protéines sont dénaturées par la température par une réaction chimique réversible et deviennent inactives.

II.C.1.b.1.(d) Equations qui intègrent le pH

Le pH peut intervenir dans le taux de croissance (Nielsen et al., 2011) car un pH trop faible ou trop élevé dénature les protéines :

$$\mu_{max} = \frac{ke_{tot}}{1 + \frac{[H^+]}{K_1} + \frac{K_2}{[H^+]}} \quad (II.15)$$

est la concentration en ion hydronium, et ke_{tot}, K_1 et K_2 sont trois constantes.

II.C.1.b.1.(e) Equations qui prennent en compte les composants du milieu de culture autre que le substrat carboné ou les produits

Une carence en nutriment conduit à limiter la croissance. Plusieurs modèles utilisent la notion de capacité maximale du milieu qui correspond à la biomasse maximale que le milieu peut contenir en fonction des ressources disponibles ou la notion de carence du milieu de culture :

- Modèle de Verhulst (1838) :

$$\mu = \mu_{max}\left(1 - \frac{X}{K}\right) \quad (II.16)$$

La biomasse croit jusqu'à atteindre K qui représente la capacité maximale du milieu. Ce modèle est aussi appelé modèle logistique. En microbiologie, K est souvent remplacé par X_{max}, la biomasse maximale que le micro-organisme peut atteindre. Elle dépend des conditions nutritionnelles et physico-chimiques du milieu.

- Modèle de Gompertz (1825) :

$$\mu = \mu_{max} X ln\left(\frac{K}{X}\right) \quad (II.17)$$

La biomasse croit jusqu'à K qui représente la capacité maximale du milieu.

- Modèle de Droop (1970) :

$$\mu = \mu_{max}\left(1 - \frac{k_G}{Q}\right) \quad (II.18)$$

Avec Q la concentration en nutriment limitant la croissance et k_G la concentration de nutriment au-dessous de laquelle aucune croissance ne peut avoir lieu.

II.C.1.b.1.(f) Equations qui prennent en compte la lyse cellulaire

Enfin, la lyse cellulaire peut être intégrée dans le taux de croissance :

$$\mu_{obs} = \mu - k_d \quad (II.19)$$

Ce modèle intègre la mort cellulaire par le terme k_d. Le terme de lyse cellulaire est souvent intégré dans le taux de croissance μ et est donc non apparent dans l'équation. La lyse cellulaire peut être constante ou peut dépendre des variables de la fermentation.

II.C.1.b.(2) Cinétique de production de métabolites

Plusieurs modèles permettent de décrire la vitesse spécifique de production ν d'un métabolite. Le plus connu est le modèle de Luedeking et al. (1959) :

$$\nu = \alpha\mu + \beta \quad (II.20)$$

avec ν la vitesse spécifique de production du métabolite, μ le taux de croissance et α et β deux constantes.

Cette équation traduit le couplage partiel entre la production du métabolite considéré et la croissance de la biomasse. Si β est nul, alors le couplage est total et le métabolite est produit uniquement pendant la phase de croissance. Si α est nul, la production du métabolite est complètement découplée de la croissance de la biomasse.

Plusieurs modèles de production d'un métabolite (P) dérivent du modèle de Luedeking-Piret :

- Modèle de Holzberg et al. (1967) :

$$\nu = \alpha ln\left(\frac{X}{\mu}\right) - \beta - \gamma P \quad (II.20)$$

avec α, β et γ des constantes. Ce modèle prend en compte la dégradation du produit au cours de la fermentation.

- Modèle de Wang et al. (2008) :

$$\nu = (\alpha\mu + \beta)\frac{K_i}{K_i + S} \quad (II.21)$$

Ce modèle intègre un terme d'inhibition par le substrat avec K_i la constante d'inhibition.

- Modèle de Gómez et al. (2013) :

$$\nu = Y_{\frac{P}{X}}\mu_{max}\frac{S}{S + K_S} + \alpha \quad (II.21)$$

Avec $Y_{P/X}$ le rendement en produit par rapport à la biomasse, K_S la constante de saturation et α une constante.

Il existe d'autres modèles de la production d'un métabolite qui ne dérivent pas du modèle de Luedeking-Piret :

- Modèle d'Aiba et al. (1968) :

$$\nu = \nu_{max} e^{-KP} \quad (II.23)$$

Avec ν_{max} le taux maximum de production du métabolite et K une constante empirique

- Modèle de Hanson et al. (1972) :

$$\nu = \alpha S \qquad (II.24)$$

Avec α le rendement produit substrat.

- Modèle de Bona Bona et al. (1997) :

$$\nu = \nu_{max}\left(1 - e^{\frac{t}{t_m}}\right) \qquad (II.25)$$

Avec t le temps et t_m le temps de début de production.

- Modèle de Kiviharju et al. (2006) :

$$\nu = \nu_{max}\left(1 - \frac{P}{P_c}\right) \qquad (II.26)$$

Avec P_c la concentration critique en métabolite au-dessus de laquelle le métabolite n'est plus produit.

- Modèle de Gelmi et al. (2002) :

$$\nu = \nu_{max}\frac{1}{1 + K_I S} - kP \qquad (II.27)$$

Avec K_I la constante d'inhibition par le substrat et k la constante de dégradation du produit.

- Modèle de Ohara et al. (2004) :

$$\nu = \nu_{max}\frac{S}{S + K_S}\frac{K_P}{K_P + P} \qquad (II.27)$$

Avec K_S la constante de saturation par le substrat et K_P la constante d'inhibition par le produit.

- Modèle de Luong (1985) :

$$\nu = \nu_{max}\frac{S}{S + K_S}\left(1 - \frac{P}{P_c}^n\right) \qquad (II.28)$$

Avec K_S la constante de saturation du substrat, P_c la concentration critique en métabolite au-dessus de laquelle le métabolite n'est plus produit.

- Modèle de Bajpai et al. (1981) :

$$\nu = \nu_{max}\frac{S}{K_P + S\left(1 + \frac{S}{K_I}\right)} - kP \qquad (II.29)$$

Avec K_P la constante de saturation par le substrat, K_I la constante d'inhibition par le substrat et k la constante de dégradation du produit.

Plusieurs équations ont été présentées pour la croissance de la biomasse et la production de métabolites dans cette partie. Dans la partie suivante, plusieurs modèles de la fermentation alcoolique par *Saccharomyces cerevisiae* sont présentés : un modèle de la fermentation pour la production d'éthanol et trois modèles de la fermentation en conditions œnologiques.

II.C.2. Modélisation de la fermentation alcoolique par la levure

La fermentation est un processus utilisé dans de nombreux domaines très divers : agro-alimentaire, pharmaceutique, dépollution, production de biocarburants ... Même si les conditions de fermentation peuvent être très différentes, les exigences sont similaires. Les industriels cherchent à contrôler la qualité des produits fermentaires, à réduire des coûts ou augmenter la productivité. La capacité de simulation des modèles pour mieux contrôler la conduite de la fermentation semble être une solution intéressante pour ces applications. Ainsi, les modèles de la fermentation ont deux principales utilisations :

- optimisation statique : il s'agit de déterminer par la simulation les conditions optimales de production. Dans ce cas, les modèles peuvent être plus complexes avec des temps de calcul plus longs car ces modèles sont utilisés hors-ligne.

- optimisation dynamique : les modèles sont utilisés en-ligne dans des lois de contrôle ou de commande . Dans ce cas, les modèles doivent avoir des temps de calcul assez courts compatibles avec le temps d'action de la loi de commande.

La modélisation peut être aussi utilisée pour améliorer la compréhension de phénomènes biologiques, dans notre cas la compréhension du métabolisme des levures.

II.C.3. Modèles de la production d'éthanol par *Saccharomyces cerevisiae*

La plateforme d'information scientifique et technique *Web of Science* renvoie 2 170 articles scientifiques pour une recherche sur la modélisation de la fermentation par *Saccharomyces cerevisiae*. Ces modèles ne simulent généralement que l'évolution temporelle de la biomasse, du substrat et du produit de la fermentation (l'éthanol) et ne prennent pas en compte d'éventuelles carences ou limitations en nutriments du milieu de culture. Le principal objectif de la construction de ces modèles est le contrôle automatique de la fermentation pour maîtriser la production du produit recherché. Un modèle, le modèle de Sevely et al. (1981), est présenté à titre d'exemple car ce modèle s'appuie sur des connaissances biologiques.

Le modèle de Sevely et al. (1981) a été développé pour simuler l'évolution temporelle de la biomasse (*Saccharomyces cerevisiae*), du substrat (glucose) et du produit (éthanol) dans un pilote constitué de 6 réacteurs en cascade. Il a pour objectif le contrôle en ligne par ordinateur d'une cascade de fermenteurs alimentés en continu. Les équations de bilan matière ainsi que les équations cinétiques de ce modèle sont présentées dans le Tableau II.2.

Tableau II.2 Equations du Modèle de Sevely

Variable	Equations
Biomasse	$\frac{dX_n}{dt} = DX_{n-1} - DX_n + [r_X]_n \quad (II.30)$
Substrat	$\frac{dS_n}{dt} = DS_{n-1} - DS_n - [r_S]_n \quad (II.31)$
Produit	$\frac{dP_n}{dt} = DP_{n-1} - DP_n + [r_P]_n \quad (II.32)$
Vitesse de production de biomasse	$r_X = \mu X \quad (II.33)$
Taux de croissance	$\mu = \mu_X \frac{K_P}{K_P + P} \frac{S}{K_S + S}\left(1 - \frac{P}{P_L}\right) \quad (II.34)$
Vitesse de production d'éthanol	$r_P = \alpha r_X + \beta X \quad (II.35)$
Vitesse de dégradation de substrat	$r_S = \frac{1}{Y_X} r_X + \frac{1}{Y_P} r_P \quad (II.36)$

X_n, S_n et P_n sont respectivement les concentrations en micro-organismes, en substrat et en produit dans le n-ième fermenteur. D est le taux de dilution et μ_{max}, K_P, K_S, P_L, α, β, Y_X et Y_P sont les paramètres du modèle.

Ce modèle est basé sur une production d'éthanol partiellement couplé à la croissance (cf. eq II.30) permettant la production d'éthanol même quand il n'y a plus de croissance. La consommation du sucre est calculée comme la somme de l'utilisation de celui-ci pour la production de biomasse et la production d'éthanol (cf. eq II.31). Quant à l'équation du taux de croissance (cf. eq II.34), elle prend en compte l'inhibition par l'éthanol. Ce modèle a été calibré sur des données expérimentales issues d'une fermentation de type batch et a été utilisé pour optimiser les conditions expérimentales à l'état stationnaire de la cascade de réacteur : taux de dilution (D), concentration du substrat de l'alimentation (S_0) et nombre de réacteurs (n).

II.C.3.a) Modèles en conditions œnologiques

La fermentation alcoolique réalisée pour la production d'éthanol est réalisée sans limitation en nutriments or la fermentation en conditions œnologiques est réalisée avec des carences, principalement en azote. La carence en

azote va limiter la croissance des levures et la conduite de la fermentation. Elle devra donc être prise en compte dans la modélisation des cinétiques en conditions œnologiques.

La plateforme d'information scientifique et technique *Web of Science* donne 93 résultats pour une recherche sur la modélisation de la fermentation œnologique. Cependant seulement trois modèles sont présentés dans cette partie car ce sont des modèles complets sur la fermentation en conditions œnologiques et car ils prennent en compte la carence en azote. Deux de ces modèles serviront de base aux modèles que nous développerons dans cette thèse.

II.C.3.a.(1) Modèle de Cramer

Ce modèle a été développé par Amanda Cramer en 2002 au laboratoire de viticulture et d'œnologie de l'université de Californie (Cramer et al., 2002). Il décrit l'évolution de la biomasse viable X_v, de l'azote N, du sucre S et de l'éthanol E. Il est basé sur trois phénomènes biologiques en utilisant des équations de type Monod (cf. Tableau II.3) : la croissance de la biomasse avec l'azote comme substrat limitant, la production de l'éthanol limité par le sucre et la consommation du sucre proportionnelle à la production d'éthanol. La lyse cellulaire est proportionnelle à la concentration en éthanol (cf. Tableau II.4). Les paramètres du modèle de Cramer sont présentés dans le Tableau II.4. L'objectif de ce modèle est de prédire la transition entre une fermentation normale et une fermentation lente ou bloquée.

Tableau II.3 Equations du modèle de Cramer

Variable	Equations
Biomasse viable	$\frac{dX_v}{dt} = \mu_{max}\frac{N}{N+K_N}X_v - k_d X_v \quad (II.37)$
Azote	$\frac{dN}{dt} = -\mu_{max}\frac{N}{N+K_N}\frac{X_v}{Y_{\frac{X}{N}}} \quad (II.38)$
Sucre	$\frac{dS}{dt} = -\beta_{max}\frac{S}{K_S+S}\frac{X_v}{Y_{\frac{E}{S}}} \quad (II.39)$
Éthanol	$\frac{dE}{dt} = \beta_{max}\frac{S}{K_S+S}X_v \quad (II.40)$

Tableau II.4 Paramètres du modèle de Cramer

Paramètres	Valeurs	Unités
μ_{max}	0,16	h^{-1}
K_N	0,010	g_N/L
k_d	$k_d = k'_d E$	h^{-1}
k'_d	0,0001	$(L/(g_E.h))$
$Y_{X/N}$	31	g_X/g_N
β_{max}	0,3	h^{-1}
K_S	10	g_S/L
$Y_{E/S}$	0,47	g_E/g_S

Ce modèle a été développé pour la gamme de conditions suivantes :

- Concentration en sucre : 260 à 300 g/L
- Concentration en azote : 70 à 350 mg/L
- Température : 23 ± 2°C

Coleman et al. (2002) ont intégré l'effet de la température au modèle de Cramer en recalculant les paramètres du modèle pour 18 fermentations réalisées à 6 conditions de température différentes (11, 15, 20, 25, 30, 35 °C) et 3 conditions de concentrations en sucre et en azote (concentrations en sucre et azote normales, concentrations élevée en sucre et normale en azote et concentrations normale en sucre et faible en azote) (Coleman et al., 2002). La température a une influence significative sur la valeur des paramètres μ_{max}, k'_d et β_{max} (μ_{max} et β_{max} augmente d'un facteur six quand la température augmente de 11 à 35°C et k'_d augmente quand la température augmente de 11 à 35°C mais une augmentation plus drastique est observée au-delà de 25°C) (cf. Figure II.13). L'azote initial a un effet significatif sur la valeur du paramètre $Y_{X/N}$ (cf. Figure II.14). Les valeurs des paramètres $Y_{E/S}$, K_S et K_N ne sont pas modifiées par la température (cf. Figure II.15). Les relations entre les paramètres et les conditions expérimentales sont présentées dans le Tableau II.5 où T représente la température et N_0 la concentration en azote initiale.

Tableau II.5 Relation entre les paramètres du modèle de Cramer et les conditions expérimentales

Paramètres	Valeurs	Unités
$\log(\mu_{max})$	$-3{,}92 + 7{,}82T$	h^{-1}
$\log(K_N)$	$-4{,}73$	g_N/L
$\log(k'_d)$	$-9{,}81 - 1{,}08.10^{-3}T + 4{,}78.10^{-3}T^2$	$(L/(g_E.h))$
$\log(Y_{X/N})$	$3{,}50 - 3{,}61N_0$	g_X/g_N
$\log(\beta_{max})$	$-2{,}3 + 7{,}71.10^{-2}T$	h^{-1}
$\log(K_S)$	$2{,}33$	g_S/L
$\log(Y_{E/S})$	$-5{,}98.10^{-1}$	g_E/g_S

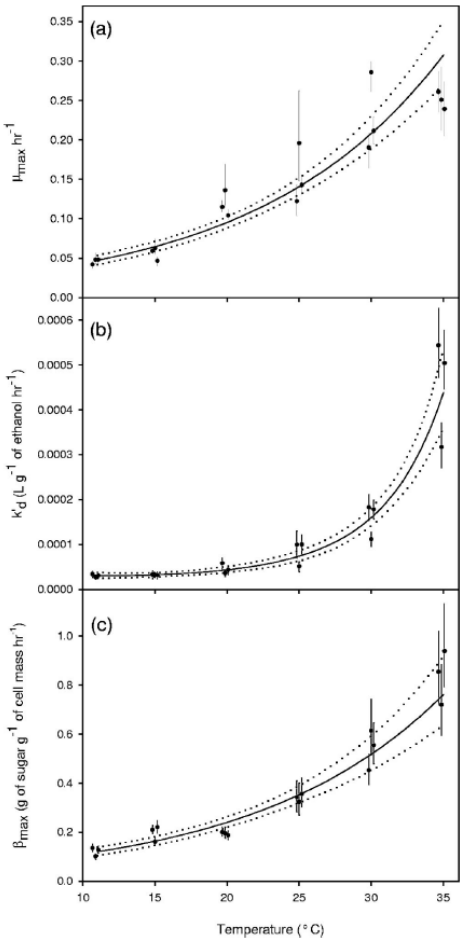


Figure II.13 Relations entre la température de fermentation et les valeurs de μ_{max} (premier graphe), de k'_d (deuxième graphe) et de β_{max} (troisième graphe). Chaque point représente l'estimation du paramètre pour chaque fermentation de calibration avec l'intervalle de confiance à 95% (barre verticale), La ligne continue représente la surface de régression et les lignes pointillées l'intervalle de confiance à 95% de la surface de régression (Coleman et al., 2002)

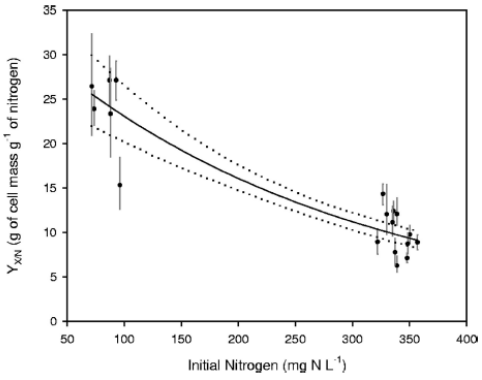


Figure II.14 Relation entre l'azote initial et la valeur de $Y_{X/N}$. Chaque point représente l'estimation de $Y_{X/N}$ pour chaque fermentation de calibration avec l'intervalle de confiance à 95% (barre verticale), La ligne continue représente la surface de régression et les lignes pointillées l'intervalle de confiance à 95% de la surface de régression (Coleman et al., 2002).

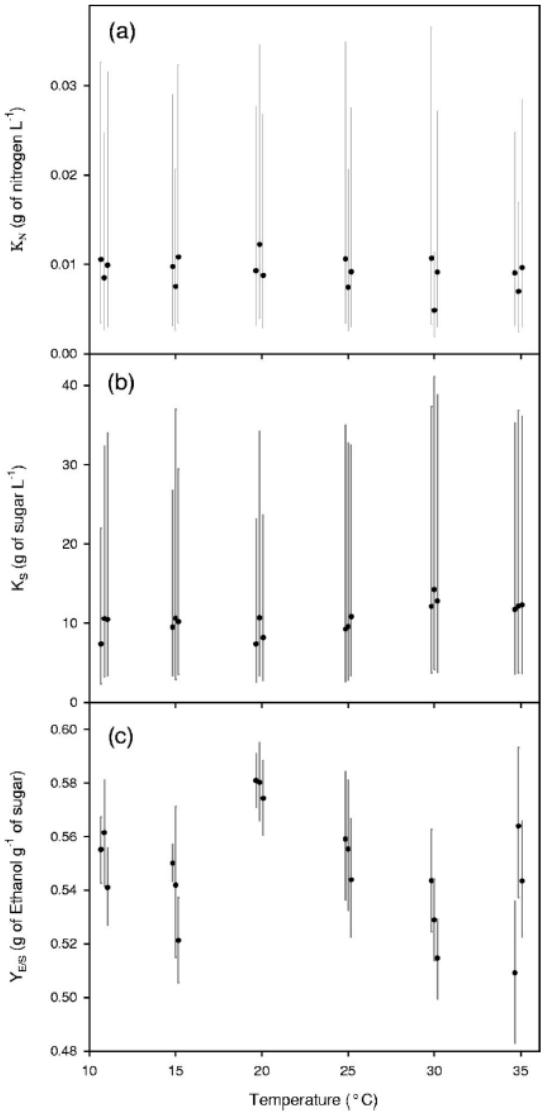


Figure II.15 Relations entre la température de fermentation et les valeurs de K_N (premier graphe), de K_S (deuxième graphe) et de Y_{ES} (troisième graphe). Chaque point représente l'estimation du paramètre pour chaque fermentation de calibration avec l'intervalle de confiance à 95% (barre verticale). (Coleman et al., 2002)

II.C.3.a.(2) Modèle de Malherbe

Ce modèle a été développé par Sophie Malherbe (Malherbe et al., 2004) en 2003 au laboratoire Sciences Pour l'Œnologie à Montpellier. Il modélise l'activité cellulaire pendant la fermentation pour prédire les phénomènes macroscopiques : les consommations de sucre (S) et d'azote (N) et les productions de biomasse (X), d'éthanol (E) et de CO_2. Il prend en compte les principaux phénomènes physiologiques affectant les cinétiques considérées dans l'élaboration des équations :

- Un temps de latence existe entre l'inoculation du milieu et le début de l'activité cellulaire.
- Les vitesses de production d'éthanol et de CO_2 sont calculées à partir de la vitesse de consommation du sucre en utilisant la stœchiométrie globale de la fermentation (un gramme de sucre produit 0,48 gramme d'éthanol et 0,48 gramme de CO_2).
- L'inhibition par l'éthanol de l'activité cellulaire est prise en compte dans les équations de consommation de sucre et d'azote
- La limitation en azote est prise en compte dans le calcul de la biomasse maximale atteignable (loi logistique de croissance) et dans le calcul de consommation du sucre par le terme des transporteurs de sucre (N_{ST}).

- La température est prise en compte dans le calcul du taux de croissance de la biomasse et le calcul des transporteurs de sucre N_{ST}.

Les équations du modèle sont données dans le Tableau II.6 et les paramètres associés dans le Tableau II.7.

Tableau II.6 Equations du modèle de Malherbe

Variables	Equations
Latence	$Latence = 188e^{-0,125T_0}$ $(II.41)$
Biomasse	$\frac{dX}{dt} = k_1 X\left(1 - \frac{X}{X_{max}}\right)$ $(II.42)$
Azote	$\frac{dN}{dt} = -X\nu(N,E)$ $(II.43)$ Avec $\nu(N,E) = \frac{k_3 N}{N+K_N+K_{NI}NE^{\alpha_N}}$ $(II.44)$
Sucre	$\frac{dS}{dt} = -X\nu_{ST}(S,E)N_{ST}$ $(II.45)$ avec $\mu(S,E) = \frac{k_3 S}{S+K_S+K_{SI}SE^{\alpha_S}}$ $(II.46)$
Transporteur	$N_{ST} = \lambda_1 T_{UCD}\frac{N_{conso}}{X} + \lambda_2 T\frac{N_{conso}}{X} + \lambda_3 T + \lambda_4 T_{UCD} + \lambda_5\frac{N_{conso}}{X} + \lambda_6$ $(II.47)$
CO_2	$\frac{dCO_2}{dt} = \frac{-1}{2.17}\frac{dS}{dt}$ $(II.48)$
Ethanol	$\frac{dE}{dt} = \frac{-1}{2.17}\frac{dS}{dt}$ $(II.49)$

Tableau II.7 Paramètres du modèle de Malherbe

Paramètres	Valeurs	Unités
k_1	0,0287T-0,3762 avec T la température	h^{-1}
X_{max}	$-649N_0^2 + 698N_0 + 7$ avec N_0 l'azote initial	10^9 cell/L
k_3	$1,10^{-3}$	$g_N/(10^9 cell.h)$
K_N	0,03	g_N/L
K_{NI}	0,035	$(L/g_E)^{\alpha N}$
α_N	1,5	sans dimension
k_2	$3,5.10^{-2}$	$g_S/(nbtransporteur.h)$

K_S	15	g_S/L
K_{SI}	0,012	g_S/L
α_S	1,25	$(L/g_E)^{\alpha S}$
λ_1	-0,36	nbtransporteur/(K.g_N)
λ_2	3,3	nbtransporteur/(K.g_N)
λ_3	0,09	nbtransporteur/(K.10^9cell)
λ_4	-0,03	nbtransporteur/(K.10^9cell)
λ_5	335	nbtransporteur/g_N
λ_6	-1	nbtransporteur/10^9cell

Le modèle de Malherbe a été développé et calibré pour la gamme de conditions suivantes :

- Température : 18-30°C
- Concentration initiale en azote : 70-410 mg/L
- Concentration initiale en sucre : 170-260 g/L
- Concentration initiale en cellules : de l'ordre de 10^9 cellules/L.

II.C.3.a.(3) Modèle de Brou

Ce modèle a été développé par Paul Brou (Brou et al., 2020) au laboratoire de Génie Chimique de Toulouse. Il permet de simuler l'évolution de la biomasse, du sucre, de l'azote, de l'éthanol et du glycérol pendant la fermentation. La croissance de la biomasse se base sur la consommation d'azote ; l'azote du milieu est assimilé et se répartit entre deux compartiments : le compartiment constitutif et le compartiment de stockage. L'azote constitutif est la quantité minimale d'azote pour remplir les fonctions vitales de la cellule. Le compartiment de stockage permet d'assurer les autres fonctions de la cellule et il constitue la réserve d'azote pour réaliser la croissance de la biomasse.

Le modèle est basé sur cinq réactions stœchiométriques globales dont les vitesses sont fonction des concentrations :

- La croissance r_1 : $C_6H_{12}O_6 + g_1N_S \rightarrow g_2CH_xO_yN_z + g_3CO_2 + g_4H_2O$

$$r_1 = X_n k_\mu \left(1 - \frac{X}{X_{max}}\right)\left(\frac{K_E}{K_E + E}\right)\left(\frac{\frac{N_S}{X}}{\frac{N_S}{X} + K_X}\right) \qquad (II.50)$$

  La vitesse de croissance prend en compte l'inhibition par l'éthanol et la limitation par l'azote stockée.

- La production d'éthanol r_2 : $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CO_2 + 2C_2H_5OH$

$$r_2 = X_n k_S \left(\frac{S}{S + K_S}\right)\left(\frac{K_{ES}}{K_{ES} + E}\right)\left(\frac{\frac{N_S}{X}}{\frac{N_S}{X} + K_{NS}}\right) \qquad (II.51)$$

  La vitesse de production d'éthanol prend en compte l'inhibition par l'éthanol et la limitation par l'azote stockée et le sucre.

- L'absorption d'azote r_3 : $N \rightarrow N_S$

$$r_3 = X_n k_N N \qquad (II.52)$$

La vitesse de consommation de l'azote est proportionnelle à la concentration en azote dans le milieu et à la concentration en cellules.

- La mort cellulaire r_4 : $CH_xO_yN_z(vivant) \rightarrow CH_xO_yN_z(mort)$

$$r_4 = X_n e^{(E-E_{lim})/10} \qquad (II.53)$$

Le décès cellulaire est lié à la concentration en éthanol.

- La production de glycérol r_5 : $C_6H_{12}O_6 + 4H^{++4e^-} \rightarrow 2C_3H_8O_3$

$$r_5 = X_n k_G \left(\frac{S}{S + K_{SG}}\right)\left(\frac{K_{EG}}{K_{EG} + E}\right) \qquad (II.54)$$

La vitesse de production de glycérol prend en compte l'inhibition par l'éthanol et la limitation par le sucre.

Le bilan matière suivant permet de décrire l'évolution des concentrations des variables d'état pour un réacteur batch :

$$\begin{cases} \dfrac{dX}{dt} = g_2 r_1 - r_4 \\ \dfrac{dS}{dt} = -(r_1 + r_2 + r_5) \\ \dfrac{dN}{dt} = -r_3 \\ \dfrac{dN_S}{dt} = r_3 - g_1 r_1 \\ \dfrac{dE}{dt} = 2r_2 \\ \dfrac{dG}{dt} = r_5 \end{cases} \qquad (II.55)$$

Avec X la concentration en biomasse, S la concentration en sucre, N la concentration en azote, N_S la concentration en azote de stockage, E la concentration en éthanol et G la concentration en glycérol.

Les valeurs des paramètres du modèle de Brou sont présentées dans le Tableau II.8.

Tableau II.8 Paramètres du modèle de Brou

Paramètres	Valeurs	Unités
X_n	$\frac{X}{aM'}$	mol_X/L
a	$37{,}6.10^9$	$cell/g_X$
M’	25,0689	g_X/mol_X
k_μ	0,032±0,003	h^{-1}
X_{max}	305±40	10^6cell/mL
K_X	$(1±1).10^{-3}$	$mg_N/10^6$ cell
g_1	0,41±0,06	-
g_2	5,25	-
K_E	20±7	g/L
k_S	0,18±0,03	h^{-1}
K_S	71±66	g/L
K_{ES}	102±74	g/L
K_{NS}	$(5±3).10^{-3}$	$mg_N/10^9$
k_N	6,1±4	L/(mol.h)
E_{lim}	155±14	g/L
k_G	1,58±1,26	h^{-1}
K_{SG}	140±124	g/L
K_{EG}	1,6±1,4	g/L

Le modèle de Brou a été développé et calibré pour la gamme de conditions suivantes :

- Température : 24°C
- Concentration initiale en azote : 170 ou 300 mg/L
- Concentration initiale en sucre : 220 g/L
- Concentration initiale en cellules : de l'ordre de 10^9 cellules/L.

II.C.3.a.(4) Intégration de la saturation du milieu en CO_2

En début de fermentation, un temps de retard est observé entre le temps d’inoculation et le temps de détection du dégagement du CO_2. Ce temps de retard est dû à la saturation du milieu de fermentation en CO_2 avant que celui-ci ne soit dégagé sous forme gazeuse. Quelques publications prennent en compte ce phénomène dans la modélisation : Carroll et al. (1991) a étudié la solubilité du CO_2 dans l’eau à faible pression et Bales et al. (2016) modélise la cinétique de la fermentation alcoolique du vin en prenant en compte un délai de dégagement du CO_2. L’équation du dégagement de CO_2 est donnée par l’équation II.56 (Bales et al., 2016) :

$$F_{CO_2} = \left[\left(\frac{\mu}{Y_{\frac{X}{CO_2}}} + \frac{\beta_G + \beta_F}{Y_{\frac{E}{CO_2}}} + m\right) X_v H A_F\right] - \left[k_L \alpha_{TF} H \left(c_{sat} - c_{CO_2 L}\right) A_F\right] \qquad (II.56)$$

Avec F_{CO_2} le débit massique de CO_2 libéré, μ le taux de croissance, Y_{X/CO_2} le rendement biomasse/CO_2, Y_{E/CO_2} le rendement éthanol/CO_2, β_G et β_F les vitesses spécifiques de production d'éthanol à partir du glucose et du fructose, m le coefficient de maintenance, X_v la biomasse, H la hauteur de la cuve, A_F l'aire de la base de la cuve, k_L le coefficient de transfert du CO_2, α_{TF} l'aire des bulles de gaz, c_{sat} la concentration de saturation du CO_2 dissout et $c_{CO_2 L}$ la concentration liquide du CO_2 dans le moût.

Le premier terme correspond à la production de CO_2 au cours de la fermentation et le deuxième terme correspond au transfert liquide-gaz du CO_2. Tant que le CO_2 ne sature pas le moût, le CO_2 produit reste dans le milieu liquide ; dès que la concentration saturante en CO_2 dissout est atteinte, celui-ci est dégagé sous forme CO_2 gazeux. La Figure II.16 montre le lien entre la solubilité du CO_2 dans l'eau à température atmosphérique en fonction de la température. Cette solubilité du CO_2 dans l'eau diminue avec la température (Carroll et al., 1991).

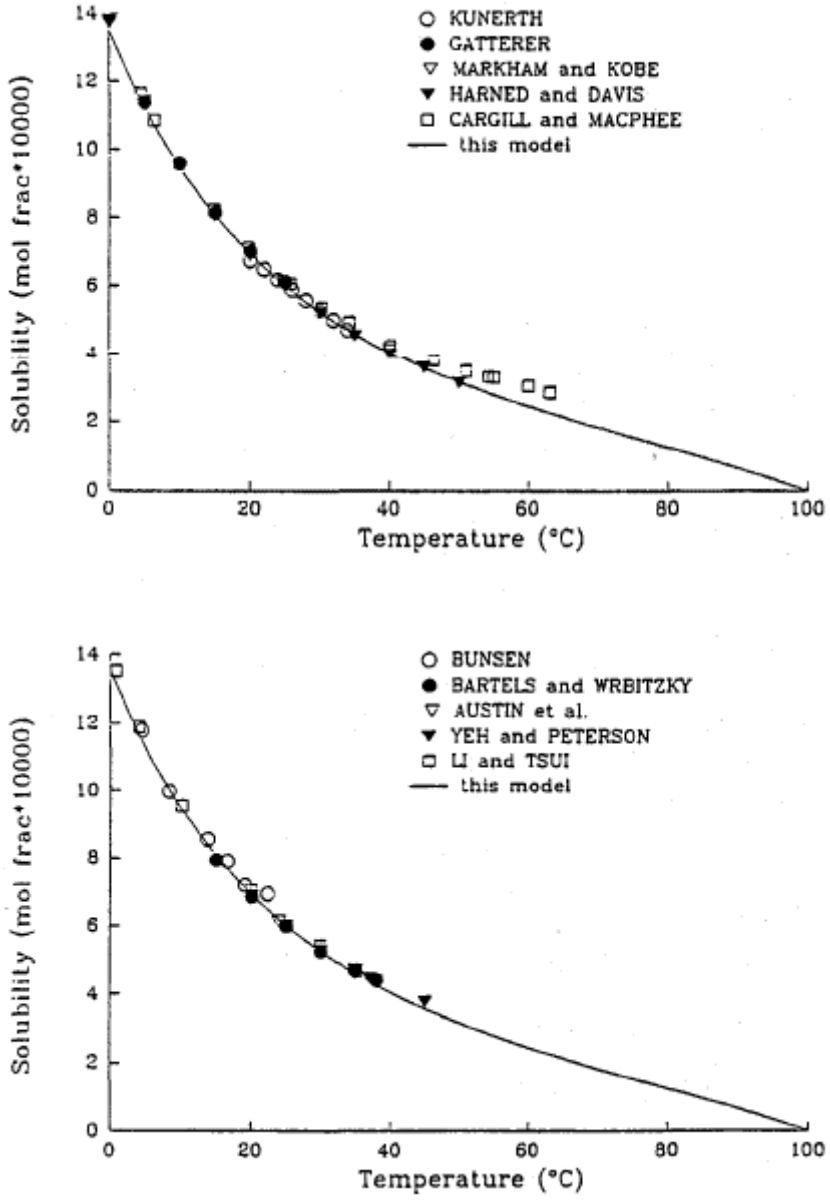


Figure II.16 Solubilité du CO_2 (en taux molaire) dans l'eau à la pression atmosphérique (101,325 kPa) en fonction de la température (Carroll et al., 1991). Les deux graphes représentent le modèle de Carroll et al. (1991) avec des données expérimentales issues de publications différentes.

La saturation du milieu en CO_2 est rapidement atteinte en début de fermentation. Elle ne sera donc pas prise en compte dans le travail de modélisation de la fermentation alcoolique en conditions œnologiques.

II.C.3.b) Modélisation de la production des arômes

Le modèle de Mouret (Mouret et al., 2014; Mouret et al., 2015) permet de calculer la production totale des arômes et les pertes gazeuses en arômes au cours de la fermentation. La concentration liquide des arômes est déduite à partir de ces deux variables.

Pour calculer les concentrations des composés aromatiques, le modèle de Mouret procède en deux étapes :

- La première étape calcule la production totale de chaque arôme (Mouret et al., 2014; Mouret et al., 2015)
- La deuxième étape calcule la concentration liquide de chaque arôme après évaporation (Morakul et al., 2011).

En effet, les arômes sont des composés volatils et une partie de la production en arômes est perdue par évaporation. La production totale en arômes se décompose entre la concentration liquide et les pertes gazeuses :

$$Production(T) = C_{liq}(L) + Perte(P) \qquad (II.57)$$

II.C.3.b.(1) Production totale des arômes

Les bilans matières pour la production totale de chaque arôme sont :

- Pour l'isobutanol :

$$\frac{dIBOH}{dt} = -Y_{IBOH}\frac{dS}{dt} \qquad (II.58)$$

- Pour l'alcool isoamylique :

$$\frac{dIAOH}{dt} = -Y_{IAOH}\frac{dS}{dt} \qquad (II.59)$$

- Pour l'acétate d'isoamyle :

$$\frac{dIAA}{dt} = -Y_{IAA}\frac{dS}{dt} \qquad (II.60)$$

- Pour l'hexanoate d'éthyle :

$$\frac{dEH}{dt} = -Y_{EH}\frac{dS}{dt} \qquad (II.61)$$

- Pour l'octanoate d'éthyle :

$$\frac{dEO}{dt} = -Y_{EO}\frac{dS}{dt} \qquad (II.62)$$

Mouret et al. (2014) identifient dans les données expérimentales deux phases linéaires pour la quantité d'arômes produits en fonction du sucre consommé : une première phase de production avec un rendement faible et une deuxième phase avec un rendement plus élevé (cf. Figure II.17). La séparation entre les deux phases de production est fonction de la concentration en sucre et elle dépend de l'arôme considéré.

Mouret et al. (2015) ont montré que les rendements Y_{arome} (Y_{IAOH}, Y_{IBOH}, Y_{IAA}, Y_{EH}, Y_{EO}) pour les cinq composés aromatiques pouvaient être calculés suivant l'équation (II.63).

$$ln(Y_{arome}) = \begin{cases} D_1 + D_2N_0 + D_3T + D_4N_0^2 + D_5T^2 + D_6N_0T & si \quad S_0 - S_{trans} < S_{trans} \\ D_7 + D_8N_0 + D_9T + D_{10}N_0^2 + D_{11}T^2 + D_{12}N_0T & si \quad S_0 - S_{trans} \geq S_{trans} \end{cases} \qquad (II.63)$$

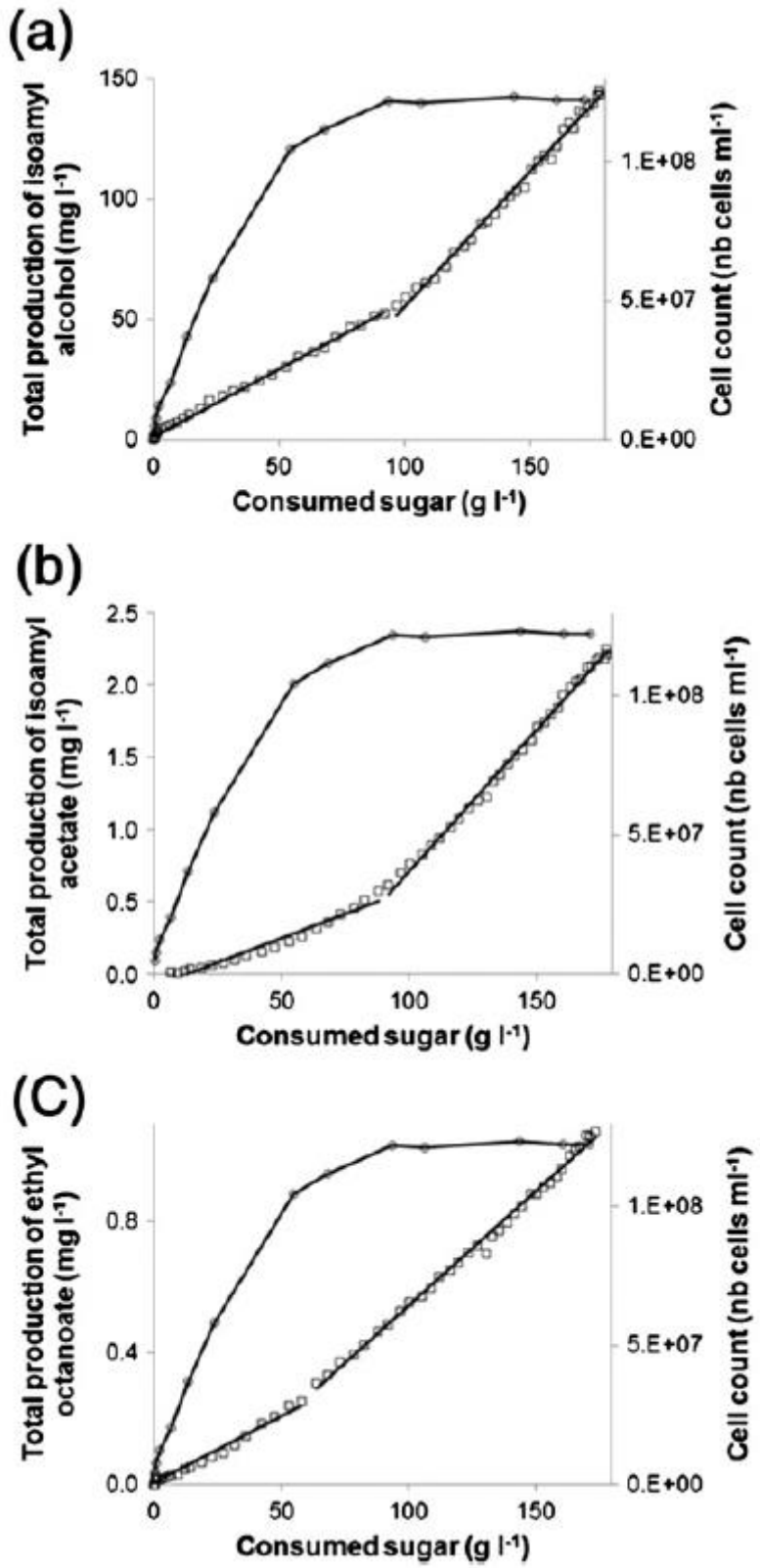


Figure II.17 Production total de trois arômes (l'alcool isoamylique (a), l'acétate d'isoamyle (b) et l'octanoate d'éthyle (c)) (point blanc) et la concentration cellulaire (point noir) en fonction de la concentration en sucre consommé. Les résultats proviennent d'une fermentation réalisée avec une concentration initiale en azote de 410 mg/L et une température de 24°C (Mouret et al., 2014).

Les valeurs des paramètres dépendent du composé aromatique considéré et sont présentés dans le Tableau II.9.

Tableau II.9 Coefficients du modèle de synthèse des arômes

Paramètres	Isobutanol	Alcool Isoamylique	Acétate d'isoamyle	Hexanoate d'éthyle	Octanoate d'éthyle
S_{trans}	$\begin{cases} 55 si N_0 < 230\ mg/L \\ 11{,}4 + 0{,}186 N_0 si N_0 \geq 230\ mg/L \end{cases}$			20	60
D_1	-3,35	-1,24	-5,33	-15,7	-3,68
D_2	$-2{,}64.10^{-3}$	$-6{,}4.10^{-3}$	$3{,}3.10^{-3}$	$-1{,}5.10^{-3}$	$-2{,}04.10^{-3}$
D_3	0,1	0,161	-0,108	0,846	-0,142
D_4	$-3{,}2.10^{-6}$	$1{,}24.10^{-5}$	0	0	0
D_5	0	$-2{,}67.10^{-3}$	$2{,}15.10^{-3}$	$-2{,}3.10^{-2}$	$1{,}74.10^{-3}$
D_6	$-1{,}44.10^{-4}$	$-1{,}14.10^{-4}$	0	$9{,}37.10^{-4}$	$1{,}41.10^{-3}$
D_7	-9,02	-4,26	-13,6	-7,97	-9,87
D_8	$2{,}05.10^{-2}$	$8{,}14.10^{-4}$	$2{,}48.10^{-2}$	$4{,}72.10^{-3}$	$8{,}48.10^{-3}$
D_9	0,368	0,314	0,458	0,156	0,308
D_{10}	$-2{,}25.10^{-5}$	$-1{,}78.10^{-5}$	$-2{,}00.10^{-5}$	0	$-1{,}06.10^{-5}$
D_{11}	$-4{,}28.10^{-3}$	$-6{,}25.10^{-3}$	$-7{,}58.10^{-3}$	$-2{,}48.10^{-3}$	$-6{,}19.10^{-3}$
D_{12}	$-3{,}45.10^{-5}$	0	$-3{,}74.10^{-4}$	$-1{,}55.10^{-4}$	$-5{,}78.10^{-5}$

Ce modèle présente quelques désavantages :

- Il présente une discontinuité : le rendement Y_{arome} est discontinu par rapport à la quantité de sucre consommé. Cela rend son utilisation compliquée pour une loi de contrôle.
- Il utilise un grand nombre de paramètres : 12 paramètres par arôme donc 60 paramètres pour les 5 arômes considérés.

II.C.3.b.(2) Pertes d'arômes par évaporation

Morakul et al. (2011) ont constaté et modélisé des pertes en arômes par évaporation pendant la fermentation œnologique. En effet, les arômes considérés sont des composés volatils. De plus, le dégagement de CO_2 crée un flux gazeux sortant qui facilite les pertes en arômes.

Le modèle introduit le ratio entre les concentrations en gaz et en liquide : $k = \frac{C_{gaz}}{C_{liq}}$. Ce ratio correspond à l'équilibre gaz-liquide. Il a été montré qu'il pouvait être calculé par la relation de l'équation (II.64).

$$ln(k_{arome}) = F_1 + F_2 E - \frac{F_3 + F_4 E}{R}\left(\frac{1000}{T} - \frac{1000}{T_{ref}}\right) \qquad (II.64)$$

Avec R la constante des gaz parfaits, T la température en K et T_{ref} la température de référence valant 293K.

Les constantes F_1, F_2 F_3 et F_4 sont définies en fonction des composés aromatiques et sont présentées dans le Tableau II.10.

Tableau II.10 Paramètres du modèle de perte des arômes

Paramètres	Isobutanol	Alcool isoamylique	Acétate d'isoamyle	Hexanoate d'éthyle	Octanoate d'éthyle
F_1	-8,03	-7,82	-3,74	-3,19	-3,14
F_2	$-5{,}5.10^{-3}$	$-4{,}8.10^{-3}$	$-1{,}13.10^{-2}$	$-1{,}29.10^{-2}$	$-1{,}65.10^{-2}$
F_3	43	56	51	40	52
F_4	$6{,}62.10^{-2}$	$-2{,}5.10^{-2}$	0,132	0,137	$-3{,}6.10^{-3}$

Les pertes en arômes à un instant t sont calculées par la formule :

$$Pertes(t) = Q_{CO2} k_{arome} C_{liq} \quad (II.65)$$

Avec Q_{CO2} la vitesse spécifique de dégagement de CO_2 en (L_{CO2}/L_{mout})/h calculée par :

$$Q_{CO2} = \frac{1000RT}{M_{CO2} P_{ATM}} \frac{dCO_2}{dt} \quad (II.66)$$

Avec R la constante des gaz parfaits (R = 8.314 J/(mol.K)), M_{CO2} = 44g/mol et P_{atm} = 101325 Pa.

II.C.3.b.(3) Concentrations liquides en arômes

L'évolution de la concentration liquide en arômes est calculée par bilan matière. La concentration liquide est calculée par l'équation suivante :

$$\frac{dC_{liq}}{dt} = \frac{dC_{tot}}{dt} - Q_{CO2} k_{arome} C_{liq} \quad (II.67)$$

Les équations décrivant les bilans matière des concentrations liquides des arômes sont les suivantes :

- Pour l'isobutanol :

$$\frac{dIBOH_{liq}}{dt} = \frac{dIBOH_{tot}}{dt} - Q_{CO2} k_{IBOH} IBOH_{liq} \quad (II.68)$$

- Pour l'alcool isoamylique :

$$\frac{dIAOH_{liq}}{dt} = \frac{dIAOH_{tot}}{dt} - Q_{CO2} k_{IAOH} IAOH_{liq} \quad (II.69)$$

- Pour l'acétate d'isoamyle :

$$\frac{dIAA_{liq}}{dt} = \frac{dIAA_{tot}}{dt} - Q_{CO2} k_{IAA} IAA_{liq} \quad (II.70)$$

- Pour l'hexanoate d'éthyle :

$$\frac{dEH_{liq}}{dt} = \frac{dEH_{tot}}{dt} - Q_{CO2} k_{EH} EH_{liq} \quad (II.71)$$

- Pour l'octanoate d'éthyle :

$$\frac{dEO_{liq}}{dt} = \frac{dEO_{tot}}{dt} - Q_{CO2} k_{EO} EO_{liq} \quad (II.72)$$

Le modèle de Mouret et al. (2015) est à ma connaissance le seul modèle de la synthèse des arômes dans la fermentation alcoolique en conditions œnologiques. Il présente une bonne adéquation aux données expérimentales

(erreur moyenne inférieure à 10%). Il prend également en compte l'effet de la concentration initiale en azote et de la température.

II.D. Conclusion

Cette synthèse bibliographique a d'abord présenté une vue générale de la fermentation alcoolique en conditions œnologiques. C'est un processus bien documenté qui présente plusieurs limites du fait du moût qui est un milieu peu favorable au développement des levures. Ce processus tend à être de plus en plus contrôlé pour réduire les risques de fermentations lentes ou bloquées, en utilisant *Saccharomyces cerevisiae* sous forme de levures sèches actives et en effectuant des ajouts de nutriments comme l'azote.

Les composés influençant les qualités organoleptiques du vin sont bien connus ainsi que les vois métaboliques de production des arômes mais les mécanismes de contrôle de ces voies métaboliques sont encore méconnus. Parmi les facteurs expérimentaux modifiant la synthèse des composés aromatiques, seuls la température et l'ajout d'azote peuvent être modifiés par les vignerons pour atteindre un profil aromatique cible.

Il existe de nombreux modèles sur la cinétique principale (biomasse, substrat, éthanol ...) de la fermentation alcoolique pour la production d'éthanol mais peu de modèles sont en condition œnologiques. Parmi les modèles de la fermentation en condition œnologique, les modèles de Cramer et al. (2002), de Malherbe et al. (2004) et de Brou et al. (2020) sont les plus complets en prenant en compte la limitation en azote pendant la fermentation et l'inhibition par l'éthanol. Cependant, aucun modèle de la cinétique principale ne prend en compte l'ajout d'azote en cours de fermentation, alors que c'est une pratique fréquente dans la vinification. ***Est-il possible de développer un modèle de la cinétique principale qui intègre l'ajout d'azote ?***

De plus, il n'existe que très peu de modèles sur la synthèse des arômes. Le modèle le plus complet de la synthèse des arômes a été développé à SPO (Mouret et al., 2014; Mouret et al., 2015) mais il présente une discontinuité ce qui est un désavantage dans l'optique du contrôle. ***Un modèle continu de la production des arômes peut-il être construit ?***

Les modèles de la production des arômes existant ne prennent pas en compte un ajout d'azote en cours de fermentation et la recroissance de la population de levure possible après l'ajout. Comme le montrent Seguinot et al. (2018), l'ajout d'azote modifie parfois grandement la cinétique de la production des arômes, notamment l'acétate d'isoamyle. ***Un modèle de production des arômes prenant en compte l'ajout d'azote peut-il être construit ?***

Dans le premier chapitre de résultats, la question de l'intégration de l'ajout d'azote dans le modèle de la cinétique principale sera traitée. Le modèle de la cinétique principale sera construit à partir des modèles publiés de la cinétique principale en conditions œnologiques présentés dans cette partie bibliographique. Il intègrera les connaissances biologiques de la fermentation alcoolique en conditions œnologiques.

Dans le second chapitre de résultats, les questions de l'intégration de l'ajout d'azote dans le modèle de la synthèse des arômes et de la construction d'un modèle continu de la production des arômes seront étudiées. Ce travail a pour base le modèle de la cinétique principale construit dans le premier chapitre. Ce travail, basé sur le modèle de la synthèse en arômes publié, intègrera les connaissances du métabolisme des arômes, notamment les facteurs expérimentaux influençant la cinétique de production des arômes et la production finale en arôme.

III.Matériels et Méthodes

Ce chapitre présente en premier lieu, les conditions expérimentales et les méthodes de mesure utilisées pour les fermentations qui ont permis de générer les données utilisées lors de calibration et de la validation des modèles. Ces fermentations ont été réalisées par Joséphine Godillot, étudiante en thèse dans le projet Starwine, à SPO (Montpellier) de mars 2019 à novembre 2020 et à Pech Rouge (Gruissan) de novembre 2020 à juin 2021. Les méthodes d'optimisation et d'analyse utilisées pour la construction, et la validation des modèles de la cinétique principale et de la production des arômes sont explicitées à la fin de ce chapitre.

III.A. Levures

La souche de *Saccharomyces cerevisiae* utilisée est la souche Lalvin EC-1118 (Lallemand SA, Montréal, Canada). Les fermenteurs ont été inoculés avec 10g/hL de levure sèche active soit environ 10^9 cellules/L. Les levures ont été préalablement réhydratées pendant 30 minutes à 37°C dans une solution de glucose à 50 g/L.

III.B. Milieu de culture

Toutes les fermentations ont été conduites avec des moûts synthétiques simulant un moût naturel standard (Bely et al., 1990b). Ces milieux contiennent des concentrations en azote assimilable différentes, les autres concentrations étant identiques (Mouret et al., 2014) : 90g/L de glucose, 90 g/L de fructose, 6 g/L d'acide malique, 6 g/L d'acide citrique, sels (0,75 g/L de KH_2PO_4 ; 0,50 g/L de K_2SO_4 ; 0,25 g/L $MgSO_4$; 0,155 g/L de $CaCl_2$; 0,2 g/L de NaCl), vitamines (20 mg/L de myo-inositol ; 1,5 mg/L d'acide pantothenic ; 0,25 mg/L de thiamine ; 2 mg/L d'acide nicotinique ; 0,25 mg/L de pyridoxine et 0,003 mg/L de biotine), oligo-éléments (4 mg/L de $MnSO_4$; 4 mg/L de $ZnSO_4$; 1 mg/L de $CuSO_4$; 1mg/L de KI ; 0,4 mg/L de $CoCl_2$; 1 mg/L de H_3BO_3 et 1 mg/L de $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$) et de facteurs anaérobiques (0,05% v/v de Tween 80, 15 mg/L d'ergostérol et de 0,0005% v/v d'acide oléique). Le pH est de 3,3.

L'azote assimilable est constitué de chlorure d'ammonium et d'un mélange d'acides aminés. Trois concentrations initiales d'azote sont utilisées pour les fermentations de calibration : 70, 140 et 210 mg/L correspondant aux moûts synthétiques appelés MS70, MS140 et MS210. La proportion des différentes sources d'azote assimilable, la même dans les trois moûts synthétiques, est définie par Mouret et al. (2014) : 30% de l'azote assimilable est de l'ammonium et 70% des acides aminés. Pour le moût MS210, la concentration en chaque acide aminé est la suivante : acide aspartique 22 mg/L, acide glutamique 60,8 mg/L, alanine 71,8 mg/L, arginine 185 mg/L, cystéine 6,5 mg/L, glutamine 249,7 mg/L, glycine 3.9 mg/L, histidine 16,1 mg/L, isoleucine, 16,1 mg/L, leucine 23,9 mg/L, lysine 8,4 mg/L, méthionine 15,5 mg/L, phénylalanine 18,8 mg/L, proline 302,7 mg/L, sérine 38,8 mg/L, thréonine 37,5 mg/L, tryptophane 88,6 mg/L, tyrosine 9,1 mg/L et valine 22 mg/L.

III.C. Conditions de fermentations

III.C.1. Réacteur 1L (SPO)

Les fermentations sont réalisées dans des fermenteurs en verre de 1,2 L avec 1 L de moût. La température est régulée à 24°C par des lampes infra-rouges sur un seul côté du fermenteur. Le milieu de fermentation est homogénéisé par une agitation magnétique (600 tours par minute).

Un ajout d'azote est réalisé automatiquement par une pompe à différents temps de fermentation : 20, 35 et 50 g/L de CO_2 produit (correspondant, respectivement, à 24, 42 et 60 % de l'avancement de la fermentation) avec trois concentrations différentes d'azote minéral (phosphate di-ammonique) : 50, 100 et 150 mg/L.

III.C.2. Réacteur 10L (PR)

Les fermentations sont réalisées à l'échelle pilote, dans un fermenteur en inox d'un volume de 10 L avec 8 L de moût. La température est régulée par deux serpentins (l'un pour le refroidissement et l'autre pour le réchauffement). Le milieu est homogénéisé par une agitation magnétique (600 tours par minute).

Un ajout d'azote est réalisé à 20 g/L de CO_2 dégagé (correspondant à 24% de l'avancement de la fermentation) avec différentes concentrations d'azote (50, 100 et 150 mg/L) sous forme de di-ammonium phosphate. L'ajout d'azote a été effectué automatiquement au moyen d'une pompe péristaltique.

III.D. Méthodes analytiques

III.D.1. Dégagement du CO_2

III.D.1.a) Réacteurs 1L (SPO)

Le CO_2 dégagé est déterminé par une mesure de la perte de poids du fermenteur grâce à une balance précise au centième de gramme (Sablayrolles et al., 1987). Une mesure est effectuée toutes les vingt minutes. La vitesse de dégagement est déterminée suivant la procédure décrite au paragraphe III.E.1.

III.D.1.b) Réacteur 10L (PR)

Le débit de CO_2 dégagée est mesuré automatiquement avec un débitmètre massique. Une mesure est effectuée toutes les cinquante minutes. Le CO_2 dégagé est calculé suivant la procédure décrite au paragraphe III.E.2.

III.D.2. Biomasse

Lors des fermentations en réacteur de 1L, la population totale de cellules a été mesurée par un compteur électronique de particules (Model Z2, Beckman-Coulter, Mergency, France) équipé d'une sonde d'ouverture de 100 µm. L'échantillon est préalablement dilué et a subi une sonication (Sonifier 250 Branson) afin de séparer les cellules éventuellement agglomérées.

III.D.3. Azote assimilable

La concentration en ammonium est mesurée enzymatiquement (R-Biopharm, Darmstadt, Allemagne). La concentration en acides aminées est déterminée par chromatographie d'échange de cation, avec une dérivatisation à la ninhydrine post-colonne (Biochrom 30, Biochrom, Camridge, Royaume-Uni) par la méthode décrite par Crépin et *al.* (Crépin et al., 2012).

III.D.4. Arômes (PR)

Les arômes sont dosés par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC MS). Le gaz de l'espace de tête du réacteur est pompé à un débit de 10 $mL.min^{-1}$ à travers une ligne de transfert chauffée. Les composés carbonés sont concentrés dans un piège froid (Tenax TM) pendant trois minutes, désorbés à 310°C pendant une minute. Les données sont mesurées avec une colonne Thermo, GC-TRACE 1300 avec un détecteur de masse ISQ 7000 et analysées avec un Perichrom PR2100 GC couplé à un détecteur à ionisation de flamme (Alpha MOS, Toulouse, France).

Le programme du four GC est le suivant : 38°C pendant sept minutes, une montée de 3°C par minute jusqu'à 65°C, puis une montée de 6°C par minute jusqu'à 160°C, enfin une montée de 8°C par minute jusqu'à 210°C. La température est maintenue à 210°C pendant quatre minutes. Les aires des pics ont été acquises avec le logiciel Chromeleon et la concentration de chaque arôme est calculée à partir de la droite d'étalonnage déterminée au préalable pour chaque composé. Le procédé d'étalonnage a été effectuée comme décrit précédemment par Mouret et al. (2013).

III.E. Traitement des données expérimentales

III.E.1. Calcul de la vitesse de dégagement du CO_2

Dans le cas des réacteurs de 1L, la vitesse de dégagement de CO_2 est calculée à partir des données de CO_2 dégagé. Celles-ci sont lissées avec une fonction polynomiale de degré deux prenant en compte les onze dernières valeurs et la vitesse de dégagement est estimée au point médian par le calcul de la valeur de la dérivée du polynôme en ce point.

III.E.2. Calcul du CO_2 dégagé

Dans le cas des réacteurs de 10L, la vitesse de dégagement du CO_2 est mesurée au cours du temps par débitmètre. La quantité de CO_2 dégagé est estimé par intégration de cette vitesse par un logiciel développé par l'INRAE.

III.E.3. Calcul de la concentration en arômes liquide

La concentration liquide (C_{liq}) en arômes (en mg/L) est calculée à partir de la concentration gazeuse (C_{gaz}) en arôme (en mg/L) déterminée par GC MS selon l'équation suivante :

$$C_{liq}(t) = \frac{C_{gaz}(t)}{k_{arôme}} \quad (III.1)$$

Avec $k_{arôme}$ le coefficient de partition entre la phase gazeuse et la phase liquide de l'arôme considéré (sans dimension). k_i est défini par Morakul et al. (2011) et dépend de la concentration en éthanol et de la température de fermentation.

$$ln(k_i) = F_1 + F_2E - \frac{F_3 + F_4E}{R}\left(\frac{1000}{T} - \frac{1000}{T_{ref}}\right) \quad (III.1)$$

Avec E la concentration en éthanol (en g/L) recalculée à partir du CO2 produit, T la température de fermentation, T_{ref} la température de référence (20°C dans cette étude) et R est la constante des gaz parfaits (en kg.m2 /(s2.°C.mol)). F_1, F_2, F_3 et F_4 sont des constantes dont les valeurs pour chaque arômes ont été déterminés par Mouret et al. (2014) et sont présentées dans le paragraphe II.C.3.b.(2).

III.E.4. Calcul des pertes gazeuses en arômes

Les pertes gazeuses en arômes P_{gaz} à un instant t (en mg/L) sont calculées à partir des concentrations gazeuses C_{gaz} en arômes (en mg/L) et du flux de dégagement de CO_2.

$$P_{gaz} = \int C_{gaz} Q_{CO2} dt \quad (III.3)$$

Avec Q_{CO2} le flux de dégagement de CO_2 calculé par l'équation (4).

$$Q_{CO2} = \frac{1000RT}{M_{CO2}P_{ATM}} \frac{dCO_2}{dt} \quad (III.4)$$

Avec T la température de fermentation (en °C), $\frac{dCO_2}{dt}$ la vitesse de production en CO2 (en g/(L.h)), R la constante des gaz parfaits (en kg.m2 /(s2.°C.mol)), M_{CO2} la masse molaire du CO2 (en g/mol), et P_{ATM} la pression atmosphérique (en Pa).

III.E.5. Calcul de la quantité d'arôme produit

La quantité totale en arômes C_{tot} (en mg/L) est calculée par la somme de la concentration liquide en arômes C_{liq} (en mg/L) et des pertes gazeuses en arômes P_{gaz} (en mg/L) :

$$C_{tot}(t) = C_{liq}(t) + P_{gaz}(t) \quad (III.5)$$

III.F. Récapitulatif des fermentations

III.F.1. Fermentations utilisées pour le modèle de la cinétique principale

Le Tableau III.11 résume les conditions expérimentales des quatre fermentations, réalisées à SPO, utilisées pour la calibration du modèle de la cinétique principale. Elles présentent des mesures de CO_2 produit, faites toutes les vingt minutes, et des mesures de biomasse et d'azote (sept points pour les deux phases de croissance : en début de fermentation et après ajout d'azote).

Tableau III.11 Conditions expérimentales des fermentations de calibration du modèle de la cinétique principale

Fermentations	Azote initial (mg/L)	Azote ajouté (mg/L)	CO_2 dégagé à l'ajout d'azote (g/L)	Temps à l'ajout d'azote (h)
MS70+100	70	100	20	71,412
MS140+50	140	100	20	37,51
MS140+150	140	100	20	37,52
MS210+100	210	100	20	33,72

Le Tableau III.12 montre les conditions expérimentales des seize fermentations, réalisées à SPO, utilisées pour la validation du modèle de la cinétique principale. Les fermentations de validation sont issues d'un plan d'expérience de type Box-Benkhen à trois facteurs (concentration initiale en azote, timing d'ajout d'azote et concentration en azote ajouté). Elles présentent les mêmes concentrations initiales d'azote et d'azote ajouté que les fermentations de calibration mais présentent des valeurs supplémentaires de CO_2 dégagé à l'ajout (35 et 50 g/L de CO_2 dégagé). Les fermentations de validation présentent des données de CO_2 produit, effectuées toutes les vingt minutes, et deux points de biomasse (après chaque phase de croissance).

Tableau III.12 Conditions expérimentales des fermentations de validation du modèle de la cinétique principale

Fermentations	Azote initial (mg/L)	Azote ajouté (mg/L)	CO_2 dégagé à l'ajout d'azote (g/L)	Temps à l'ajout d'azote (h)
MS70+100_20	70	100	20	67,2
MS70+50_35	70	50	35	110,38
MS70+150_35	70	150	35	111,04
MS70+100_50	70	100	50	156,94
MS140+50_20	140	50	20	34,94
MS140+50_20	140	50	20	35,14
MS140+150_20	140	150	20	35,97
MS140+100_35	140	100	35	57,88
MS140+100_35	140	100	35	57,96
MS140+100_35	140	100	35	58,68
MS140+100_35	140	100	35	58,83
MS140+50_50	140	50	50	81,91
MS210+100_20	210	100	20	29,85
MS210+50_35	210	50	35	43,66
MS210+150_35	210	150	35	42,93
MS210+100_50	210	100	50	62,36

III.F.2. Fermentations utilisées pour le modèle de la production des arômes

Le Tableau.III.13 présente les conditions expérimentales des quinze fermentations, faites à Pech rouge, utilisées pour la calibration du modèle de synthèse des arômes. Les fermentations de calibration sont issues d'un plan d'expériences de type Box-Benkhen à trois facteurs (température, concentration initiale en azote et concentration en azote ajouté). L'ajout d'azote était programmé à une valeur de CO_2 dégagé de 20 g/L mais présente un retard dû au temps de mesure et de calcul du CO_2 dégagé. Les fermentations présentent des mesures, faites toutes les cinquante minutes, de CO_2 produit et des concentrations totales, liquides et gazeuses des cinq arômes considérés.

Tableau.III.13 Conditions expérientales des fermentations de calibration du modèle de synthèse des arômes

Fermentations	Azote initial (mg/L)	Azote ajouté (mg/L)	CO_2 dégagé à l'ajout d'azote (g/L)	Temps à l'ajout d'azote (mg/L)	Température (°C)
MS70_50_23C	70	50	21	79,618	23
MS70_100_18C	70	100	22,6	136,874	18
MS70_100_28C	70	100	22,1	60,084	28
MS70_150_23C	70	150	20,3	86,169	23
MS140_50_18C	140	50	21,37	70,253	18
MS140_50_28C	140	50	20,13	29,895	28
MS140_100_23C_1	140	100	22,8	43,703	23
MS140_100_23C_2	140	100	22,7	42,239	23
MS140_100_23C_3	140	100	22	43,906	23
MS140_150_18C	140	150	20,67	67,735	18
MS140_150_28C	140	150	20,3	29,162	28
MS210_50_23C	210	50	21,9	34,917	23
MS210_100_18C	210	100	23	52,402	18
MS210_100_28C	210	100	21,9	23,895	28
MS210_150_23C	210	150	21,2	65,747	23

Tableau III.14 Conditions expérimentales des fermentations de validation du modèle de synthèse des arômes

Fermentations	Azote initial (mg/L)	Azote ajouté (mg/L)	CO_2 dégagé à l'ajout d'azote (g/L)	Temps à l'ajout d'azote (g/L)
S11	90	70	20	58,389
S12	150	130	20	59,975
S13	90	110	20	98,022

Trois fermentations anisothermes, réalisées à Pech Rouge, ont été utilisées pour la validation du modèle de synthèse des arômes (cf. Tableau III.14 pour les conditions de mise en œuvre). Les fermentations présentent des mesures, faites toutes les cinquante minutes, de CO_2 produit et des concentrations totales, liquides et gazeuses des cinq arômes considérés. Un profil de température différent a été appliqué pour chacune de ces trois fermentations (cf. Figure III.18) :

- S11 part d'une température initiale élevée (25°C) jusqu'à 20 g/L de CO_2 dégagé. La température diminue ensuite à 20°C avec une pente de 0,15°C par gramme de CO_2 dégagé puis augmente à 23°C avec une pente de 0,3°C par gramme de CO_2 dégagé et reste constante à 23°C jusqu'à la fin de la fermentation.
- S12 part d'une température initiale faible (19°C) jusqu'à 20 g/L de CO_2 dégagé. Dans un deuxième temps, la température augmente jusqu'à 27°C avec une pente de 0,35 °C par gramme de CO_2 dégagé enfin diminue à 21°C avec une pente de 0,25 °C par gramme de CO_2 dégagé et reste constante jusqu'à la fin de la fermentation.

- S13 part d'une température initiale intermédiaire (22°C) jusqu'à 20 g/L de CO_2 dégagé. La température augmente jusqu'à 25°C avec une pente de 0,2°C par gramme de CO_2 dégagé puis diminue à 21°C avec une pente de 0,3°C par gramme de CO_2 dégagé ensuite monte à 28°C avec une pente de 0,4°C par gramme de CO_2 dégagé enfin diminue avec une pente de 0,1°C par gramme de CO_2 dégagé jusqu'à la fin de la fermentation.

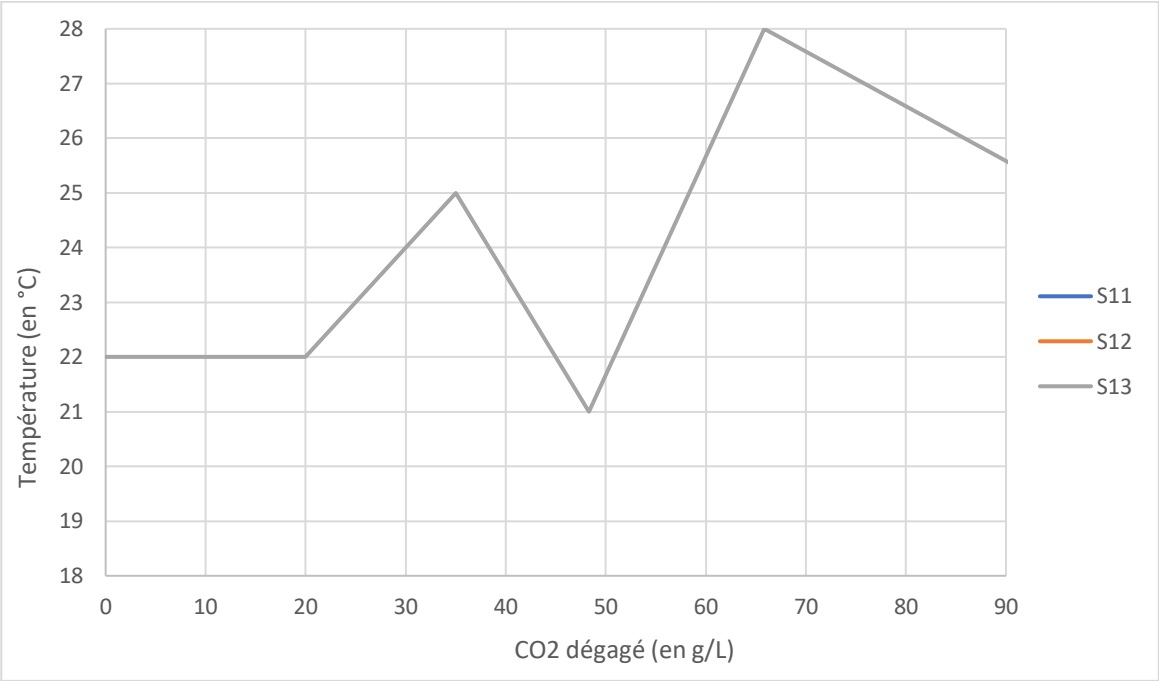


Figure III.18 Profils de température des trois fermentations de validation du modèle de synthèse des arômes

III.G. Méthodes utilisées pour la modélisation

III.G.1. Calibration des paramètres

Les paramètres des modèles ont été calibrés en utilisant un logiciel développé au laboratoire sous Matlab©. Cet algorithme permet d'optimiser les valeurs du jeu de paramètres du modèle de façon à minimiser l'écart entre les données expérimentales et les données simulées en utilisant les méthodes pattern search (Hooke et al., 1961) et Rosenbrock (Rosenbrock, 1960). La résolution du système d'équations différentielles ordinaires du modèle est réalisée grâce à la fonction ode15s de Matlab R2017b (Shampine et al., 1997).

III.G.2. Analyse statistique

L'erreur quadratique moyenne normée (NRMSE pour Normed Root Mean Square Error) (Armstrong et al., 1992) est utilisée pour déterminer l'ajustement du modèle aux données expérimentales. Pour une seule variable, la NRMSE est définie par :

$$NRMSE = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - y_i)^2}{n}}}{y_{max} - y_{min}} \qquad (III.6)$$

Avec n le nombre de données expérimentales, x_i la valeur de la i^{ème} donnée expérimentale, y_i la valeur de la i^{ème} donnée simulée et y_{min} et y_{max} les valeurs minimales et maximales des données expérimentales.

Pour l'ensemble des variables, la NRMSE est définie par :

$$NRMSE_{tot} = \frac{\sum_{i=1}^{m} NRMSE_i \sqrt{n_i}}{\sqrt{\sum_{i=1}^{m} n_i}} \qquad (III.7)$$

Avec m le nombre total de variable, $NRMSE_i$ la valeur de NRMSE pour la i[ème] variable et n_i le nombre de données de la i[ème] variable.

III.G.3. Analyse de la sensibilité

La sensibilité du modèle à la modification des valeurs des paramètres a été étudiée. Le coefficient de sensibilité $\sigma_y^{\Delta p}$ est calculé pour la variable y et le paramètre p grâce à la formule suivante :

$$\sigma_y^{\Delta p} = \int_0^{t_f} \frac{y(p + \Delta p, t) - y(p, t)}{y(p, t)} dt \qquad (III.8)$$

Avec t_f le temps final de la fermentation, $y(p, t)$ la valeur simulée de la variable y au temps t pour le vecteur des paramètres optimisés p et Δp la modification du paramètre.

IV. Modèle de la cinétique principale

IV.A. Article de la cinétique principale

Une partie des résultats liés au développement du modèle de la cinétique principale a été soumis pour publication à *Food Science and Biotechnology*. Dans cet article (cf. paragraphe 3 Models formulation), deux modèles de la cinétique principale de la fermentation alcoolique en conditions œnologiques sont décrits. Ces modèles sont dérivés de deux modèles de la littérature, les modèles de Malherbe et de Brou. Ils permettent de décrire l'évolution des concentrations en sucre, en azote assimilable, en biomasse, en CO_2 produit, en éthanol et en transporteurs de sucre. Deux variables d'états ont été introduites dans les deux modèles : la concentration en azote intracellulaire qui permet de simuler un croissance cellulaire résiduelle après l'épuisement de l'azote assimilable dans le milieu de fermentation et l'activité cellulaire qui traduit l'état physiologique des levures. Ils prennent en compte l'ajout d'azote en cours de fermentation qui n'est pris en compte par aucun modèle de la littérature mais qui est un processus courant en vinification. Les deux modèles ont été calibrés à partir de données de quatre fermentations isothermes (24°C) réalisées avec différentes conditions de concentrations initiales en azote et un ajout d'azote effectué quand le CO_2 dégagé atteint 20 g/L avec différentes concentrations en azote ajouté (cf. III.F). Les deux modèles ont été validés et comparés aux deux modèles de la littérature (modèles de Malherbe et de Brou) à partir des données de cinq autres fermentations. Une étude de sensibilité montre que les modèles construits sont peu sensibles à la plupart des modifications des paramètres.

Modeling the Effects of Assimilable Nitrogen Addition on Fermentation in Oenological Conditions

François Beaudeau[1,2], Cesar Arturo Aceves Lara[1,3], Josephine Godilllot[4,5], Jean-Roch Mouret[5,6], Ioan-Cristian Trelea[7,8], Carine Bideaux[1,9]

V. Abstract

Alcoholic fermentation in oenological conditions is a biological process carried out under significant physiological constraints: deficiency of nitrogen and other nutriments (vitamins, lipids …) and different stresses (pH and osmotic). In literature, few models were proposed to describe oenological fermentations. They are focused on initial conditions and did not integrate nitrogen addition during the fermentation process which is a widespread practice. In this work, two dynamic models of oenological fermentation are proposed to predict the effects of nitrogen addition at two different timings: at the beginning of the process and during the fermentation experiment. They were validated and compared against existing models showing an accurately fit to experimental data for CO_2 release and CO_2 production rate.

Keywords: mathematical modeling, oenological fermentation, nitrogen addition

Data availability statement

The datasets presented un this study can be found in online repositories. The names of the repository/repertories and accession number(s) can be found below: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo., GSE189010.

Funding Statement

This research project was funded by the French National Research Agency (ANR) under grant agreement STARWINE (ANR-18-CE10-0013).

Nomenclature

[1] TBI, Université de Toulouse, CNRS, INRAE, INSA, Toulouse, France
[2] beaudeau@insa-toulouse.fr
[3] aceves@insa-toulouse.fr
[4] SPO, INRAE, L'institut Agro Montpellier, Université de Montpellier, Montpellier, France
[5] josephine.godillot@inrae.fr
[6] Jean-roch.mouret@inrae.fr
[7] Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR Sayfood, F-78850, Thiverval-Grignon, France
[8] Ioan-cristian.trelea@inrae.fr
[9] bideaux@insa-toulouse.fr

State variables:

- X Biomass in 10^9cells/L
- S Sugar in g/L
- E Ethanol in g/L
- CO_2 CO_2 produced in g/L
- N_{ST} Sugar transporter in $g_N/(10^9 cells)$
- N Nitrogen in g/L
- N_{intra} Intracellular nitrogen in $g/(10^9 cells)$
- A Cell activity (dimensionless)

Rates:

- r_C rate of production or consumption of product C (X: biomass, S: sugar, N: nitrogen, E: ethanol, CO_2: carbon dioxide, N_{intra}:intracellular nitrogen and N_{ST}: sugar transporter) in g/(L.h).
- r_i^* rate of equation i in the model 2 in mol/(L.h).

Molar masses:

- M_S molar mass of sugar in g_S/mol_S
- M_E molar mass of ethanol in g_E/mol_E
- M_X biomass mass per carbon mole in $g_X/Cmol_X$
- M_{CO2} molar mass of carbon dioxyde in g_{CO2}/mol_{CO2}
- M_N molar mass of nitrogen in g_N/mol_N

Model 1 parameters:

- k_1 maximum specific growth rate in h^{-1}
- k_2 maximum specific rate of sugar consumption in $(10^9 cell.\ g_N.h)^{-1}$
- K_S affinity constant in g_S/L
- K_{SI} inhibition constant in $(L/g_E)^{\alpha S}$
- α_S exponent of ethanol inhibition of sugar consumption, dimensionless
- $Y_{E/S}$ conversion yield of sugar to ethanol in g_S/g_E
- $Y_{CO2/S}$ conversion yield of sugar to CO_2 in g_S/g_{CO2}
- k_3 maximum specific rate of nitrogen consumption in $(10^9 cell.h)^{-1}$
- K_N affinity constant in g_N/L
- K_{NI} inhibition constant in $(L/g_E)^{\alpha N}$
- α_N exponent of ethanol inhibition of nitrogen consumption, dimensionless
- Q_0 minimum intracellular nitrogen concentration for biomass production in $g_N/(10^9 cell)$
- E_{max} critical ethanol concentration in g_E/L
- k_{nst} maximum specific production rate of sugar transporter in $g_N/(10^9 cell.h)$
- k_{dnst} maximum specific degradation rate of sugar transporter in $g_N/(10^9 cell.h)$
- K_{nst} affinity constant of sugar transporter in $g_N/(10^9 cell)$
- Y_{nst} nitrogen yield of sugar transporter in g_N/g_N
- Q_{0nst} minimal intracellular nitrogen content for sugar transporter production in $g_N/(10^9 cell)$
- α_1 nitrogen yield in cell in $g_N/(10^9 cell)$
- κ cell activity loss rate in h^{-1}

Model 2 parameters:

- k_X maximum specific growth rate $(Cmol_X.h)^{-1}$

- N_{intra0} constant of growth limitation by intracellular nitrogen in $g_N/(10^9 cell)$
- K_{S1} affinity constant for sugar in g_S/L
- k_E maximum specific ethanol production rate in $mol_E/(Cmol_X.h)$
- K_{S2} affinity constant for sugar in g_S/L
- E_{lim1} constant of ethanol production inhibition by ethanol in g_E/L
- α_1 exponent of ethanol inhibition of ethanol production, dimensionless
- K_{st} sugar transporter limitation constant in g_N/L
- k_N maximum specific nitrogen consumption rate $mol_N/(Cmol_X.h)$
- K_{N1} affinity constant for nitrogen in g_N/L
- g_1 number of moles of sugar consumed per Cmole of biomass produced in $mol_S/Cmol_X$
- g_2 number of moles of nitrogen consumed per Cmole of biomass produced in $mol_N/Cmol_X$
- g_3 number of moles of CO_2 produced per Cmole of biomass produced in $mol_{CO2}/Cmol_X$
- k_{NST} maximum specific sugar transporter production rate in $mol_N/(L.h)$
- E_{lim2} constant of sugar transporter production inhibition by ethanol in g_E/L
- α_2 exponent of ethanol inhibition of sugar transporteur production, dimensionless
- N_{intra1} constant of sugar transporter limitation by intracellular nitrogen in $g_N/(10^9 cell)$
- κ cell activity loss rate in h^{-1}
- g_S conversion yield of sugar into ethanol in mol_E/mol_S
- a number of cells per biomass gram in $10^9 cell/g$

1 Introduction

Oenological fermentation is a well-known biological process in which yeasts, mainly *Saccharomyces cerevisiae* strains, convert hexoses (glucose and fructose) principally to ethanol and carbon dioxide, secondarily to biomass and glycerol and weakly to metabolites produced in low concentrations with major impact on wines organoleptic properties. Oenological fermentation is a process which has several limitations whose main one is deficiency in nitrogen. In industrial conditions, nitrogen is totally consumed in the first two days of fermentation whose "normal" duration is one to two weeks [1]. However nitrogen is an essential nutrient for yeast metabolism and growth during oenological fermentation [2, 3] and its deficiency can induce sluggish or stuck fermentations [4]. Several studies have been conducted to understand and quantify nitrogen deficiency: Bisson [5] related nitrogen deficiency to stuck and sluggish fermentations, Crépin et al [6] studied the sequential uptake of nitrogen sources by yeasts and Carrau et al [7] studies the impact of nitrogen deficiency on aroma compounds. Nitrogen addition during fermentation increases reaction kinetics but this increase depends on addition timing [8]. That is why European legislation allows nitrogen addition at the beginning and during wine oenological fermentation [9].

David et al [10] shows that residual growth is observed after the total consumption of nitrogen present initially in the medium which would suggest that the yeasts have a nitrogen reserve to continue their growth. Brou et al [11] shows that intracellular nitrogen concentration decreases to a minimum during fermentation. It is therefore important to consider the intracellular nitrogen concentration in the yeasts.

The data from David et al [10] shows also that a regrowth of biomass is possible after nitrogen addition and that this regrowth is all the stronger the earlier the nitrogen is added. Indeed, yeast physiological state declines during fermentation due to several deficiency and inhibitions such as inhibition by ethanol. Thus, the increase of ethanol concentration during fermentation affects physiological state of yeast cells: activities of nitrogen transporters [12, 13] and sugar transporters [14] are decreasing when the ethanol concentration increases. Moreover, a study shows a rapid decrease of cell activity after ethanol addition in the medium [15].

Several mathematical models were proposed to simulate fermentation in oenological conditions [16-22]. They consider time evolutions of concentrations for biomass, sugar, ethanol, carbon dioxide and some of them for nitrogen and glycerol but few models consider the relation between yeast growth and nitrogen concentration:

- Cramer's model [23] considers nitrogen limitation in the biomass growth with a Monod-type equation and a non-growth associated conversion of glucose into ethanol. It considers too a cell death rate proportional to ethanol concentration.
- Malherbe's model [8] describes the biomass production as a logistic law with a maximum attainable biomass concentration dependent on the initial nitrogen concentration. The authors introduce in their model a state variable representing sugar transporters involved in the sugar consumption rate equation. Moreover, the ethanol inhibition is considered in the equations of sugar and nitrogen consumption rates. Ethanol and CO_2 are produced from sugar in an overall yield (1 gram of sugar is converted into 2.17 grams of ethanol and 2.17 grams of CO_2).
- Brou's model [11] is based on an intracellular nitrogen compartment divided between the minimum nitrogen necessary to carry out the vital functions of the cells and a storage compartment, which is the only nitrogen available for biomass growth. It considers ethanol inhibition on metabolism of yeasts (production of biomass, ethanol and glycerol) as well as the cell death rate function of ethanol concentration.

However, these models were not developed nor calibrated for fermentations with nitrogen addition during the fermentation process. Cramer's and Brou's models can allow regrowth of biomass after nitrogen add. Malherbe's model could simulate nitrogen addition with a complicated algorithm: model is simulated using initial conditions and it is stopped before nitrogen addition instant and new simulation is started with the new initial conditions. This is a difficult task if we try to apply the model for online optimization purposes.

In this work, two models derived from Malherbe and Brou's models are proposed to allow the simulation of nitrogen addition during fermentation without stopping the simulation at nitrogen addition instant (section 3). These models have been calibrated on experimental data from fermentations with different initial nitrogen concentrations and different nitrogen amount addition at an add timing corresponding to 20g/L of CO_2 release allowing biomass regrowth (section 4). A sensitivity analysis of the two models is presented in section 5. Then, the two models have been validated and compared to Malherbe's and Brou's models on experimental data from others fermentations with various initial nitrogen conditions and nitrogen addition at 20 and 35g/L produced CO_2 (section 6).

2 Materials and Methods

2.1 Yeast strain

The fermentations, which are used in this study, are performed with the commercial strain of *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin EC-1118 (Lallemand SA, Montreal, Canada). Fermentation tanks are inoculated with 100 mg/L active dry yeast, i. e. 10^9 cells/L, which are rehydrated for 30 minutes at 37°C in a 50 g/L glucose solution.

2.2 Fermentation media

The fermentations are carried out in synthetic musts exhibiting the characteristics of a standard grape juice [24]. The sugar concentration of all musts is 180g/L evenly split between glucose and fructose and the pH is at 3.3. Three initial concentrations of assimilable nitrogen (ammonium chloride and mixture of amino acids) are used: 70, 140 and 210 mg_N/L, corresponding respectively to MS70, MS140 and MS210. The three media present the same proportions of the different nitrogen sources [25]. The concentrations of others nutrients are the same as in [25].

2.3 Fermentation conditions

The fermentation are carried out in 1.2 L glass fermenters with 1 L of medium regulated at 24°C. CO_2 release is accurately measured from an automatic online monitoring of weight loss [26].

Nitrogen addition is carried out with three concentrations: 50, 100 and 150 mg_N/L in the form of mineral nitrogen (di-ammonium phosphate) and different timings: at 20 g/L produced CO_2 for calibration fermentations and at 20 g/L and 35g/L produced CO_2 for validation fermentations. Nitrogen additions are performed automatically by means of a pump [27].

2.4 Cell population

The total cell population is measured using a Beckman Coulter counter (Model Z2, Beckman-Coulter, Margency, France) fitted with a 100 µm aperture probe.

2.5 Measurement of Assimilable Nitrogen

Ammonium concentration is measured enzymatically (R-Biopharm, Darmstadt, Germany). The free amino acid concentrations are measured by cation exchange chromatography with post-column ninhydrin derivatization (Biochrom 30, Biochrom, Cambridge, United Kingdom) as presented by Crépin et al [6] .

2.6 Fermentation conditions of data used for models' calibration and validation

The conditions of the cultures used for the calibration and the validation of the models are presented in Table 15.

Table 15 Experimental conditions of calibration fermentations

Fermentations		Initial nitrogen (mg/L)	Added nitrogen (mg/L)	CO_2 produced at nitrogen addition (g/L)	time at nitrogen addition (h)
Calibration	MS70+100	70	100	20	71.412
	MS140+50	140	50	20	37.51
	MS140+150	140	150	20	37.52
	MS210+100	210	100	20	33.72
Validation	MS70+100	70	100	20	67.2
	MS140+50	140	50	20	34.94
	MS140+150	140	150	20	35.97
	MS210+100	210	100	20	29.85
	MS140+100	140	100	35	57.88

3 Models formulation

Two structured models were developed based on nitrogen-limited biomass growth to simulate nitrogen addition without discontinuities, one based on Malherbe's model and another on Brou's model. These new models allow to simulate the fermentation variables: biomass (X in 10^9cell/L), sugar (S in g/L), nitrogen (N in g/L) and ethanol (E in g/L), the cumulative production of carbon dioxide (CO_2 in g/L) and also the dynamic of state variables representative of yeast physiological state which are intracellular nitrogen (N_{intra} in g/10^9cell), sugar transporter (N_{ST} in g_N/10^9cell) and cell activity (A dimensionless).

3.1 Introduction of intracellular nitrogen and cell activity

As reported in the literature, a residual growth is observed after the end of nitrogen consumption present in the medium [10]. So, as in the Brou's model, an intracellular nitrogen compartment (N_{intra}) is considered in the models. The intracellular nitrogen is formed by entry of nitrogen into the yeast and is used for biomass growth and sugar carrier production as shown in the Figure 19. As in the Malherbe's model, the sugar transporters (N_{ST}) are considered. They are synthetized from intracellular nitrogen. The sugar transporters are involved in the sugar equation and depict the sugar affinity and the ethanol inhibition of sugar transporter on sugar consumption.

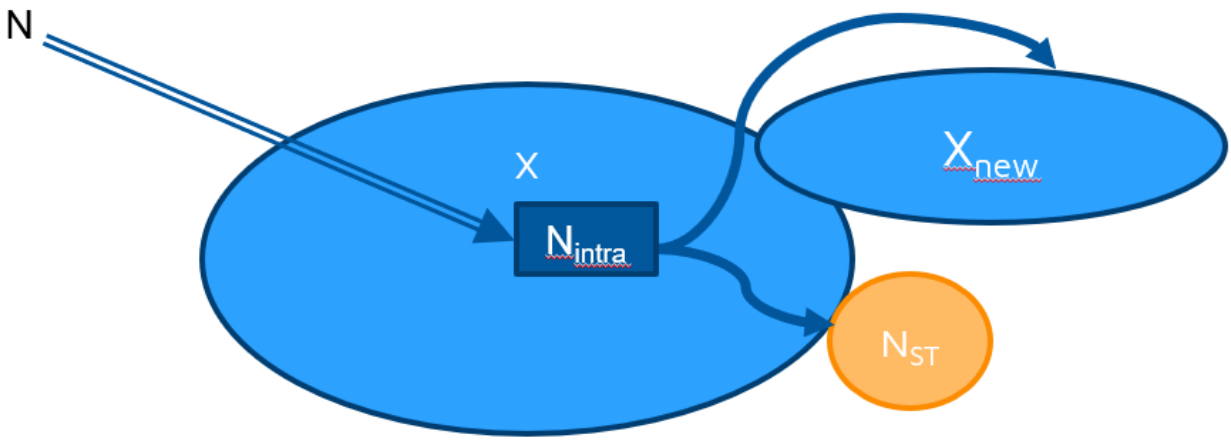


Figure 19 Diagram of nitrogen forms

As it is also known that the physiological state of yeasts declines during the fermentation [12-15] , the term of cell activity was introduced in the models to consider enzymatic activity decrease due to nitrogen deficiency and ethanol production. Its evolution is described in equation (1).

$$\frac{dA}{dt} = \mu\,(1 - A) - \kappa\,A \qquad (1)$$

μ (h^{-1}) is the specific growth rate and κ (h^{-1}) a constant.

3.2 Mass balance

The bioreactor is assumed to be infinitely mixed with a constant volume without any transfer limitation. Then the temporal evolution of variables is only linked to the biological kinetics. Based on these assumptions, unsteady-

state mass balances for cells, sugar, nitrogen, ethanol, CO_2, intracellular nitrogen and sugar transporter are given by Eqs (2)-(8):

$$\frac{dX}{dt} = r_X \tag{2}$$

$$\frac{dS}{dt} = r_S \tag{3}$$

$$\frac{dN}{dt} = r_N \tag{4}$$

$$\frac{dE}{dt} = r_E \tag{5}$$

$$\frac{dCO_2}{dt} = r_{CO2} \tag{6}$$

$$\frac{dN_{intra}}{dt} = r_{N_{intra}} - \frac{N_{intra}}{X}\frac{dX}{dt} \tag{7}$$

$$\frac{dN_{ST}}{dt} = r_{N_{ST}} - \frac{N_{ST}}{X}\frac{dX}{dt} \tag{8}$$

With r_X, r_E and r_{CO2} the production rate of respectively biomass, ethanol and CO_2 and r_S and r_N the consumption rate respectively of sugar and nitrogen, r_{Nintra} and r_{NST} the net rate of respectively N_{intra} N_{ST}. The term $-\frac{N_{ST}}{X}\frac{dX}{dt}$ and $-\frac{N_{intra}}{X}\frac{dX}{dt}$ are the term of dilution of respectively sugar transporter and intracellular nitrogen due to biomass growth.

3.3 Model 1 derived from Malherbe's models

Malherbe's model [8] has to be modified to integrate effect of nitrogen addition and potential regrowth of biomass after nitrogen addition as biomass depends only on initial nitrogen in this model. Model 1 includes 18 parameters against 16 for the Malherbe's model.

The sugar consumption rate [8] is expressed by:

$$r_S = -\nu_{ST}(S,E)N_{ST}\mathrm{X} \tag{9}$$

In which $\nu_{ST}(S,E)$ represent the activity of a sugar transporter (facilitated mechanism diffusion) with ethanol inhibition:

$$\nu_{ST}(S,\mathrm{E}) = \frac{k_2 S}{S + K_s + K_{S1}SE^{\alpha_S}} \tag{10}$$

With k_2 the maximum specific rate in $g_S/(g_N.10^9$cells.h), K_S the affinity constant in g_S/L, K_{SI} the inhibition constant in $(L/g_E)^{\alpha S}$ and α_S dimensionless.

Assuming a constant yield of CO_2 released and ethanol produced during fermentation, the ethanol and CO_2 productions rates are described by Eq(11) and (12):

$$r_E = -\frac{1}{Y_{\frac{E}{S}}} r_S \tag{11}$$

$$r_{CO_2} = -\frac{1}{Y_{\frac{CO2}{S}}} r_S \tag{12}$$

$Y_{E/S}$ and $Y_{CO2/S}$ are the conversion yields respectively of sugar to ethanol and of sugar to CO_2. they are set to 2.17 [8].

It is assumed that the sugar transporter synthesis depends on intracellular nitrogen and that sugar transporters can be degraded. The net rate of sugar transporter is defined by:

$$r_{N_{ST}} = k_{nst}\left(1 - \frac{Q_{0nst}}{N_{intra}}\right) - k_{dnst}\frac{N_{ST}}{K_{NST} + N_{ST}} \tag{13}$$

In which k_{nst} is the maximum specific production rate in $g_N/(10^9 cell.h)$, Q_{0nsst} is the minimal intracellular nitrogen content for sugar transporter production in $g_N/(10^9 cell)$, K_{NST} is the affinity constant in $g_N/10^9 cell$ and k_{dnst} is the maximum specific degradation rate in $g_N/(10^9 cell.h)$.

The specific rate of nitrogen consumption of Malherbe's model is modified by introducing the notion of cell activity:

$$r_N = -\mu_N(N, E).X.A \tag{14}$$

μ_N ($g_N/(10^9$ cell.h) correspond to specific nitrogen consumption rate which is limited by nitrogen and inhibited by ethanol. It is defined by:

$$\mu_N(N, E) = \frac{k_3 N}{N + K_N + K_{NI} N E^{\alpha_N}} \tag{15}$$

With k_3 the maximum specific consumption rate in $g_N/(10^9 cell.h^{-1})$, K_N the affinity constant in g_N/L, K_{NI} the inhibition constant and α_N dimensionless.

For the net production rate of intracellular nitrogen (eq 16). Three phenomena are considered: the consumption of nitrogen by yeast cell, the biomass production and the production and degradation of sugar transporters.

$$r_{N_{intra}} = \mu_N(N, E) - \alpha_1 r_X - \frac{1}{Y_{nst}}\left(k_{nst}\left(1 - \frac{Q_{0nst}}{N_{intra}}\right) - k_{dnst}\right) \tag{16}$$

With α_1 the nitrogen yield in cell in $g_N/(10^9 cell)$, Y_{nst} the nitrogen yield of sugar transporter in g_N/g_N.

The biomass production rate (eq 17) is function of intracellular nitrogen concentration and cell activity to consider, respectively, the residual growth after nitrogen depletion in the medium and the lower capacity of the yeast to

regrow after nitrogen addition for a longer period of nitrogen depletion. It considers also a linear inhibition by ethanol:

$$r_X = k_1(T)X\left(1-\frac{Q_0}{N_{intra}}\right)\left(1-\frac{E}{E_{max}}\right)A \quad (17)$$

In which $k_1(T)$ is the maximum specific growth rate depending on temperature (h^{-1}): $k_1(T) = \alpha_{k1}T - \beta_{k1}$, that relation comes from the Malherbe model [8], Q_0 the minimum intracellular nitrogen content of biomass for biomass growth in $g_N/(10^9 cell)$ and E_{max} the critical ethanol concentration for biomass growth in g_E/L.

3.4 Model 2 derived from Brou's model

3.4.1 Stoichiometric equations

Model 2 is based on four stoichiometric reactions (expressed in mol) that represent the major phenomena considered in this model of oenological fermentation *i.e.* biomass production (r_1^*), ethanol production (r_2^*), nitrogen consumption (r_3^*) and sugar transporter production (r_4^*):

- (r_1^*) $g_1 C_6H_{12}O_6 + g_2 N_{intra} \rightarrow CH_{1.741}O_{0.632}N_{0.097} + g_3 CO_2 + g_4 H_2O$
- (r_2^*) $C_6H_{12}O_6 \rightarrow g_S\, C_2H_6O + g_S\, CO_2$
- (r_3^*) $N \rightarrow N_{intra}$
- (r_4^*) $N_{intra} \rightarrow N_{ST}$

Reaction rates r_i^* are in mol/(L.h). The stoichiometric coefficients g_3 and g_4 can be deduced from g_1 and g_2. g_S is the yield of conversion of sugar into ethanol and CO_2. g_S is slightly lower than 2 mol/mol, the theoretical yield of ethanol production, because sugar is also converted into other metabolites like glycerol and aromas. The biomass composition is taken from [11].

3.4.2 Model equations

The model 2 includes 19 parameters against 18 for the Brou's model. The rates of consumption or production of each species can be expressed as a weighted sum of the four stoichiometric equation rates (eq 18 to 24). All these rates are expressed in g/(L.h) except for biomass whose rate is expressed in 10^9 cell/(L.h) considering the molar mass of each species:

- Sugar:

$$r_S = -(r_2^* + g_1 r_1^*)\, M_S \quad (18)$$

- Ethanol:

$$r_E = g_S\, r_2^*\, M_E \quad (19)$$

- CO_2:

$$r_{CO_2} = (g_S\, r_2^* + g_3 r_1^*)\, M_{CO2} \quad (20)$$

- Biomass:

$$r_X = r_1^* a\, M_X \quad (21)$$

- Nitrogen:

$$r_N = -\, r_3^* M_N \quad (22)$$

- Intracellular nitrogen:

$$r_{N_{intra}} = (r_3^* - g_2 r_1^* - r_4^*) M_N \quad (23)$$

- Sugar transporter :

$$r_{N_{ST}} = r_4^* M_N \quad (24)$$

With M_X, M_S, M_E, M_{CO2} and M_N the molar mass, respectively, of biomass, sugar, ethanol, CO_2 and nitrogen in g/mol and a the number of cells per biomass gram in 10^9cell/g.

3.4.3 Reactions rates

We define X_n the biomass concentration in C-mol$_X$/L by the equation:

$$X_n = \frac{X}{aM_X} \tag{25}$$

with X the biomass concentration in 10^9cell/L. The value of a and M_X are those of Brou's model [11]: 37.6 10^9cell/g and 25.0689g/C-mol respectively.

First stoichiometric equation rate (Yeast growth rate (r_1^*)) is limited by intracellular nitrogen (N_{intra}) and by sugar (S). It depends of biomass (X_n) and cell activity (A) and can be expressed by the equation 26:

$$r_1^* = k_X X_n \left(\frac{N_{intra}}{N_{intra} + N_{intra0}}\right)\left(\frac{S}{K_{S1} + S}\right) A \tag{26}$$

With k_X the maximum specific growth rate in h^{-1}, K_{S1} the affinity constant for substrate in g_S/L and N_{intra0} the constant of growth limitation by intracellular nitrogen in g_N/L.
Ethanol production rate (r_2^*) is inhibited by ethanol (E) and is limited by sugar (S) and sugar transporter (N_{ST}):

$$r_2^* = k_E X_n \left(\frac{S}{S + K_{S2}}\right)\left(1 - \frac{E}{E_{lim1}}\right)^{\alpha_1}\left(\frac{N_{ST}}{N_{ST} + K_{ST}}\right) \tag{27}$$

With k_E the maximum specific ethanol production rate in mol$_E$.mol$_X$.h^{-1}, K_{S2} the affinity constant for sugar in g_S/L, E_{lim1} the critical concentration of ethanol in g_E/L for which there is no more ethanol production and K_{ST} the constant of ethanol production limitation by sugar transporter in $g_N/10^9$cell.

Nitrogen absorption rate (r_3^*) is limited by nitrogen (N) and depends of biomass (X_n) and cell activity (A):

$$r_3^* = k_N X_n \left(\frac{N}{N + K_{N1}}\right) A \tag{28}$$

With k_N the maximum specific nitrogen absorption rate in mol$_N$.mol$_X$.h^{-1}, K_N the affinity constant for nitrogen in g_N/L.
Sugar transporter rate (r_4^*) is inhibited by ethanol (E) and limited by intracellular nitrogen (N_{intra}):

$$r_4^* = k_{NST} X_n \left(1 - \frac{E}{E_{lim2}}\right)^{\alpha_2}\left(\frac{N_{intra}}{N_{intra} + N_{intra1}}\right) \tag{29}$$

With k_{NST} the maximum specific sugar transporter rate in mol$_N$.mol$_X$.h^{-1}, E_{lim2} the critical concentration of ethanol in g_E/L and N_{intra1} the constant of sugar transporter limitation by intracellular nitrogen.

Equations of the two models developed are summarized in Table 16.

Table 16 Two models equations

Variable	Model 1	Model 2
Biomass	$\frac{dX}{dt} = k_1(T)X\left(1-\frac{Q_0}{N_{intra}}\right)\left(1-\frac{E}{E_{max}}\right)A$ With $k_1(T) = \alpha_{k1}T - \beta_{k1}$	$\frac{dX}{dt} = k_X X_n\left(\frac{N_{intra}}{N_{intra}+N_{intra0}}\right)\left(\frac{S}{K_{S1}+S}\right)Aa\,M_X$
Sugar	$\frac{dS}{dt} = -\nu_{ST}(S,E)N_{ST}\mathrm{X}$ With $\nu_{ST}(S,\mathrm{E}) = \frac{k_2 S}{S+K_s+K_{S1}SE^{\alpha_S}}$	$\frac{dS}{dt} = -\left(k_E X_n\left(\frac{S}{S+K_{S2}}\right)\left(1-\frac{E}{E_{lim1}}\right)^{\alpha_1}\left(\frac{N_{ST}}{N_{ST}+K_{ST}}\right) + g_1 k_X X_n\left(\frac{N_{intra}}{N_{intra}+N_{intra0}}\right)\left(\frac{S}{K_{S1}+S}\right)A\right)M_S$
Ethanol	$\frac{dE}{dt} = -\frac{1}{Y_{E/S}}\frac{dS}{dt}$	$\frac{dE}{dt} = g_S\,k_E X_n\left(\frac{S}{S+K_{S2}}\right)\left(1-\frac{E}{E_{lim1}}\right)^{\alpha_1}\left(\frac{N_{ST}}{N_{ST}+K_{ST}}\right)M_E$
CO_2	$\frac{dCO_2}{dt} = -\frac{1}{Y_{CO2/S}}\frac{dS}{dt}$	$\frac{dCO_2}{dt} = \left(g_S\,k_E X_n\left(\frac{S}{S+K_{S2}}\right)\left(1-\frac{E}{E_{lim1}}\right)^{\alpha_1}\left(\frac{N_{ST}}{N_{ST}+K_{ST}}\right) + g_3 k_X X_n\left(\frac{N_{intra}}{N_{intra}+N_{intra0}}\right)\left(\frac{S}{K_{S1}+S}\right)A\right)M_{CO2}$
Nitrogen	$\frac{dN}{dt} = -X\mu_N(N,E)A$ With $\mu_N(N,E) = \frac{k_3 N}{N+K_N+K_{NI}NE^{\alpha_N}}$	$\frac{dN}{dt} = -k_N X_n\left(\frac{N}{N+K_{N1}}\right)AM_N$
Intracellular nitrogen	$\frac{dN_{intra}}{dt} = \mu_N(N,E) - \left(\frac{\alpha_1}{X}+\frac{N_{intra}}{X}\right)\frac{dX}{dt} - \frac{1}{Y_{nst}}\left(k_{nst}\left(1-\frac{Q_{0nst}}{N_{intra}}\right)-k_{dnst}\right)$	$\frac{dN_{intra}}{dt} = \left(k_N X_n\left(\frac{N}{N+K_{N1}}\right)A - g_2 k_X X_n\left(\frac{N_{intra}}{N_{intra}+N_{intra0}}\right)\left(\frac{S}{K_{S1}+S}\right)A - k_{NST}X_n\left(1-\frac{E}{E_{lim2}}\right)^{\alpha_2}\left(\frac{N_{intra}}{N_{intra}+N_{intra1}}\right)\right)M_N$
Sugar transporter	$\frac{dN_{ST}}{dt} = k_{nst}\left(1-\frac{Q_{0nst}}{N_{intra}}\right) - k_{dnst}\frac{N_{ST}}{K_{NST}+N_{ST}} - \frac{N_{ST}}{X}\frac{dX}{dt}$	$\frac{dN_{ST}}{dt} = k_{NST}X_n\left(1-\frac{E}{E_{lim2}}\right)^{\alpha_2}\left(\frac{N_{intra}}{N_{intra}+N_{intra1}}\right)M_N$
Cell activity	$\frac{dA}{dt} = \frac{1}{X}\frac{dX}{dt}(1-A) - \kappa A$	$\frac{dA}{dt} = \frac{1}{X}\frac{dX}{dt}(1-A) - \kappa A$

3.6 Computing

Matlab R2017b software was used for calibration and simulation of the models: ode15s function [28] to solve differential equations and pattern search and Rosenbrock algorithms to calibrated models.

3.7 Statistical analysis

Models quality was analysed with experimental data using the Normed Root Mean Square Error (NMRSE) [29] and the Akaike Information Criterion (AIC) [30]. The NRMSE is defined as:

$$NRMSE = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{T}(x_i - y_i)^2}{n}}}{y_{max} - y_{min}} \tag{30}$$

With n the number of experimental data, x_i the experimental data corresponding to time t_i, y_i the data simulated by model for the same time t_i, $y_{min}$and $y_{max}$the minimum and maximum data values.

the NRMSE is used for several variables, with the following formula:

$$NRMSE_{tot} = \frac{\sum_{i=1}^{m} NRMSE_i \sqrt{n_i}}{\sqrt{\sum_{i=1}^{m} n_i}} \tag{31}$$

m is the total number of variables, $NRMSE_i$ are the NRMSE value for the i^{th} variable and n_i is the number of values of the i^{th} variable.

The AIC is defined by:

$$AIC = 2p + n(ln(2\pi) + ln(SSE) - ln(n) + 1\,) \tag{32}$$

With p the number of parameters, n the n number of experimental data and SSE the Sum Square Error.

The SSE is defined by:

$$SSE = \sum_{i=1}^{n}(x_i - y_i)^2 \tag{33}$$

With n the number of experimental data, x_i the experimental data corresponding to time t_i, y_i the data simulated by model for the same time t_i..

3.8 Sensibility analysis

The robustness of the models 1 and 2 to its parameters has been studied using the sensitivity coefficient $\sigma_y^{\Delta p}$ (Eq 32) for the variable y and the parameter p [31].

$$\sigma_y^{\Delta p} = \int_0^{t_f} \frac{y(p + \Delta p, t) - y(p, t)}{y(p, t)}\, dt \tag{34}$$

With t_f the final fermentation time, y(p,t) the simulated value of the variable y at the time t and for the vector of optimized parameters and Δp the modification of a parameter.

4 Models calibration

4.1 Parameters calibration

The two models are calibrated using the four fermentations presented in Table 15 of paragraph 2.6. Each fermentation present between 10 and 18 data of nitrogen and of biomass and about 460 data of CO_2 (one data each 20 minutes).

The Table 17 shows Model 1 and model 2 calibrated parameters, and the confidence intervals for these parameters. It could be seen that calibrated Model 1 have values close to those reported in the literature [8].

The confidence intervals are small for almost all parameters of both models, which means that the parameters values are reliable. For the Model 1, only three parameters (K_S, k_{nst} and K_{nst}) present a great confidence interval compared to their values. For the Model 2, only the parameter α_2 present a great confidence interval compared to its value.

Table 17 Model 1 and 2 and Malherbe's model parameters

Parameters	Model 1	Malherbe's model [8]		Parameters	Model 2
k_1	$\alpha_{k1}T - \beta_{k1}$	$\alpha_{k1}T - \beta_{k1}$		k_X	0.4036±0.0113
α_{k1}	0.0287	0.0287		N_{intra0}	(9.059±0.0000).E-6
β_{k1}	0.3	0.3762		KS_1	1.565±0.0358
k_2	0.0386±0.00038	0.035		k_E	0.2215±0.0047
K_S	20.67±18.3341	15		KS_2	1.955±0.0624
K_{SI}	0.006299±0.00087	0.012		E_{lim1}	100.2±1.1988
α_S	0.9355±0.2671	1.25		α_1	0.7505±0.0205
$Y_{E/S}$	2.17	2.17		K_{st}	0.0007528±0.0000
$Y_{CO2/S}$	2.17	2.17		k_N	0.03373±0.0004
k_3	0.001033±0.0001	0.001		K_{N1}	0.008628±0.0003
K_N	0.04105±0.0147	0.03		g_1	0.2018±0.0034
K_{NI}	0.02635±0.0096	0.035		g_2	0.1243±0.0027
α_N	1.195±0.295	1.5		g_3	$6g_1$-1
Q_0	0.0001347±0.000	-		k_{NST}	(7.661±0.0046).E-5
E_{max}	94.67±8.1371	-		E_{lim2}	90.55±2.6018
k_{nst}	1.0024±0.5750	-		α_2	(4.71±2.857)
k_{dnst}	1.987±0.5	-		N_{intra1}	0.0005719±0.0000
K_{nst}	10.76±7.1421	-		κ	0.35002±0.0015
Y_{nst}	694.8±118.2153	-		g_S	1.909±0.0035
Q_{0nst}	0.0001334±0.000	-			
α_1	0.0004795±0.0001	-			
κ	0.03±0.0057	-			

4.2 Models comparison

The Figure 20 shows the comparison of the two calibrated models' simulation with experimental data and simulation of Brou's and Malherbe's models. The Brou's and Malherbe's models were calibrated with the same data as models 1 and 2 to better compare them. Graphically, models 1 and 2 fit experimental data well and simulate slightly better experimental data than Brou's and Malherbe's models. Models 1 and 2 fit less on MS70+100 than for other fermentations on CO_2 production Brou's model underestimates the final CO_2 production for the four fermentations. The Malherbe's model simulates well the CO_2 production for two fermentations (MS70+100 and MS140+50). However, Malherbe's model simulates badly the CO_2 production after nitrogen addition for the other two fermentations (MS140+150 and MS210+100), where added nitrogen is important. Models 1 and 2 fit the CO_2 production rate better before nitrogen addition than after nitrogen addition especially for maximum value of CO_2 production rate. Model 1 seems to be slightly better than model 2 for CO_2 production and for CO_2 production rate. Model 1 and 2 simulate better CO_2 production rate than Malherbe's and Brou's models after nitrogen addition.

Model 1 and 2 simulate well nitrogen consumption during the first part of fermentation unlike the Malherbe's model but, after nitrogen addition, the simulated consumption is faster than experimental data. Brou's model simulates also the nitrogen consumption too quickly after the nitrogen addition.

Models 1 and 2 seem to have equivalent performance on nitrogen. Concerning simulation of biomass dynamics, Model 1 underestimates the biomass production rate while model 2 tends to overestimate this rate after nitrogen addition. Both models overestimate maximum biomass produced for MS210+100 and for MS70+100 but estimate well maximum biomass produced for MS140+50 and MS140+150. Brou's model overestimates the biomass whereas Malherbe's model underestimates the biomass production.

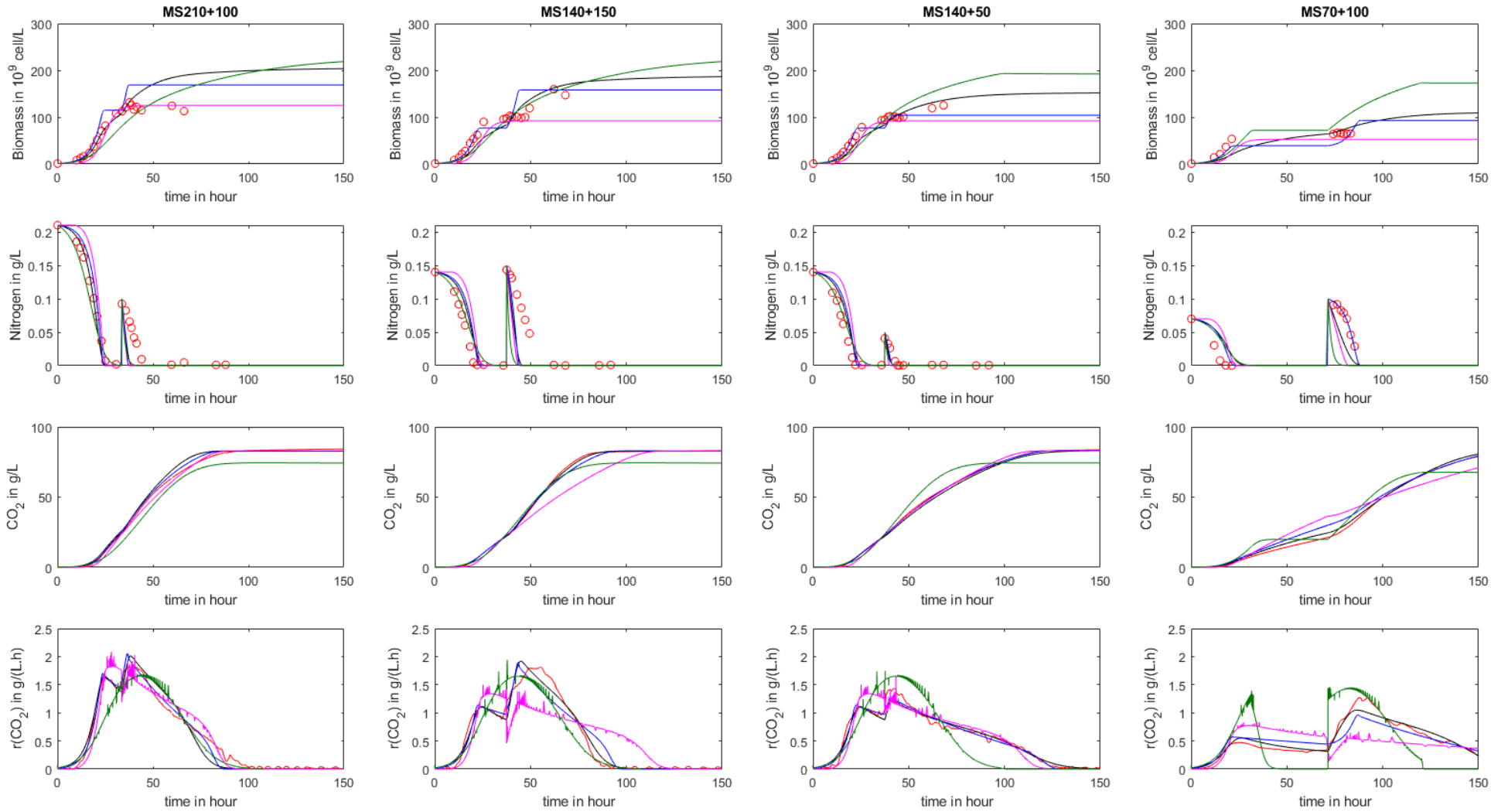


Figure 20 Dynamic evolution of biomass, nitrogen, CO_2 and CO_2 production rate for the experimental data (in red) and data simulated by models 1 (in black), model 2 (in blue), Malherbe's model (in pink) and Brou's model (in green) for the four calibration fermentatations

The Table 18 shows the NRMSE values for each variable for all fermentations for Models 1 and 2.

Model 1 is slightly better than model 2 for the whole fermentations and for the whole variables (NRMSE values of 0.208 for model 1 and 0.241 for model 2 cf. Table 18) and for each variable. Model 1 better describes kinetic evolution of experimental data than model 2 for nitrogen for the four fermentation and for biomass for three fermentations (not for MS140+50). Regarding the NRMSE for CO_2, r_{CO2} and for the whole variables for MS140+150 and for MS70+100, Model 1 is closer to the data than the model 2 while model 2 is slightly better for MS210+100 and for MS140+50.

Table 18 NRMSE values applied to each variable for each fermentation, to all of the variables for each fermentation, to each variable for all of the fermentations and to all of the variables for all of the fermentations and for Models 1 and 2.

Model	Fermentations	CO_2 in g/L	r_{CO2} in g/(L.h)	Biomass in 10^9 cell/L	Nitrogen in g/L	All variables
Model 1	MS210+100	0.0320	0.0773	0.199	0.112	0.121
	MS140+150	0.00838	0.0587	0.109	0.251	0.123
	MS140+50	0.0158	0.0548	0.0867	0.0990	0.0901
	MS70+100	0.0222	0.0826	0.208	0.213	0.120
	All fermentations	0.0391	0.137	0.292	0.331	0.208
Model 2	MS210+100	0.0192	0.0494	0.245	0.126	0.101
	MS140+150	0.0204	0.0902	0.156	0.254	0.138
	MS140+50	0. 00556	0.0459	0.0773	0.117	0.0836
	MS70+100	0.0757	0.195	0.103	0.155	0.219
	All fermentations	0.0464	0.161	0.357	0.349	0.241

According to the AIC values (Table 19), Models 1 and 2 are better than Malherbe's and Brou's Models with higher nitrogen addition: for instance, for MS+150 the AIC value for Brou's Model and Malherbe's Model are approximately two times the value for Model 1 and for Model 2. Models 1 and 2 are slightly better than Brou's and Malherbe's Models for fermentations with a lower nitrogen addition. Models 1 and 2, Malherbe's and Brou's Models are equivalents for the biomass and for nitrogen. Models 1 and 2 present better performance than Brou's and Malherbe's Model for CO_2 production rate.

Table 19 AIC values applied to each variable for each fermentation and for Models 1, 2, of Brou and of Malherbe.

Model	Fermentations	CO_2 in g/L	r_{CO2} in g/(L.h)	Biomass in 10^9 cell/L	Nitrogen in g/L
Model 1	MS210+100	2234	-437	254	272
	MS140+150	1012	-718	242	274
	MS140+50	1597	-1000	233	273
	MS70+100	1948	-1020	104	184
Model 2	MS210+100	1761	-834	262	274
	MS140+150	1839	-301	250	276
	MS140+50	637	-1159	233	275
	MS70+100	2653	-409	136	186
Brou's Model	MS210+100	3147	-142	237	268
	MS140+150	3027	-59	241	270
	MS140+50	3082	245	240	269
	MS70+100	3037	433	124	180
Malherbe's Model	MS210+100	1736	-416	240	272
	MS140+150	3230	446	220	274
	MS140+50	1486	-462	220	27
	MS70+100	3250	295	129	184

5 Model sensitivity

Sensitivity analysis was done to find parameters that play the main role in the models. Moreover, as the model will be used for online optimization, the model sensitivity to parameter variations must be studied. In this work the sensitivity coefficients are calculated for biomass, nitrogen, CO_2 and r_{CO2} and for a modification of each parameter value between -10% and 10% with a step of 0.5%. For the model 1, the sensitivity analysis was not applied to parameter k_1 because this parameter depends on temperature and

we use only one temperature. For the model 2, the sensitivity analysis was not applied to the parameter g_3 because this parameter is calculated from the parameter g_1 ($g_3 = 6g_1 - 1$).

Figure 3 and **Error! Reference source not found.** represent the sensitivity coefficients calculated for CO_2 release and for each parameters of model 1 and 2 respectively. Model 1 is sensitive to variations of four parameters (k_2, N_{intra0}, Q_{0nst}, Y_{nst}). Model 2 is sensitive to variations of three parameters (k_2, k_3 and g_2) and diverges for some modifications of two parameters (E_{lim2} and g_S). Model 1 seems to be less sensitive than model 2 because model 2 diverges for some modifications of two parameters values (E_{lim2} and g_S).

For the model 1, nitrogen is the most sensitive variable to changes in parameters as for all parameters the sensitivity coefficient takes an absolute value of more than 1 for at least one variation of the parameter. Increasing Q_0 or decreasing Q_{0nst} result in the greatest variation of the sensitivity coefficient for nitrogen.

Biomass is not very sensitive to the variation of the parameters: only two parameters modifications leads to a sensitivity coefficient of more than 1 in absolute value: Q_0 and Q_{0nst}.

The CO_2 production rate r_{CO2} is not sensitive to the modification of the value of most of the parameters except for the diminution of k_2, Q_0 and Y_{nst} that can lead respectively to a sensitivity coefficient of -8.88, -4.21 and -2.90 for a diminution of 10% of the three parameters values.

CO_2 is the variable least sensitive to variations in parameters values: for only five parameters, the value modification can lead to a sensitivity coefficient more than 0.1 in absolute value but none of them induce a sensitivity coefficient more than 1 in absolute value.

For the model 2, increasing g_S by more than 7% or decreasing E_{lim2} by more than 6.5% lead to the divergence of model 2. As for model 1, nitrogen is very sensitive to parameters value modification: most of the modification lead to a sensitivity coefficient more than 1 in absolute value. Nitrogen is most sensitive to modification of g_2: sensitivity coefficient can be more than 100.

Biomass is not very sensitive to parameters value modification: no modification leads to a sensitivity coefficient of more than 1 in absolute value.

Concerning r_{CO2}, the modifications of 6 parameters lead to a sensitivity coefficient more than 1 in absolute value especially the modification of k_2, E_{lim2} and g_2 that lead to a sensitivity coefficient more than 20 in absolute value.

CO_2 is not sensitive to the modification of any parameters: no parameters value modification lead to a sensitivity coefficient more than 0.5 in absolute value.

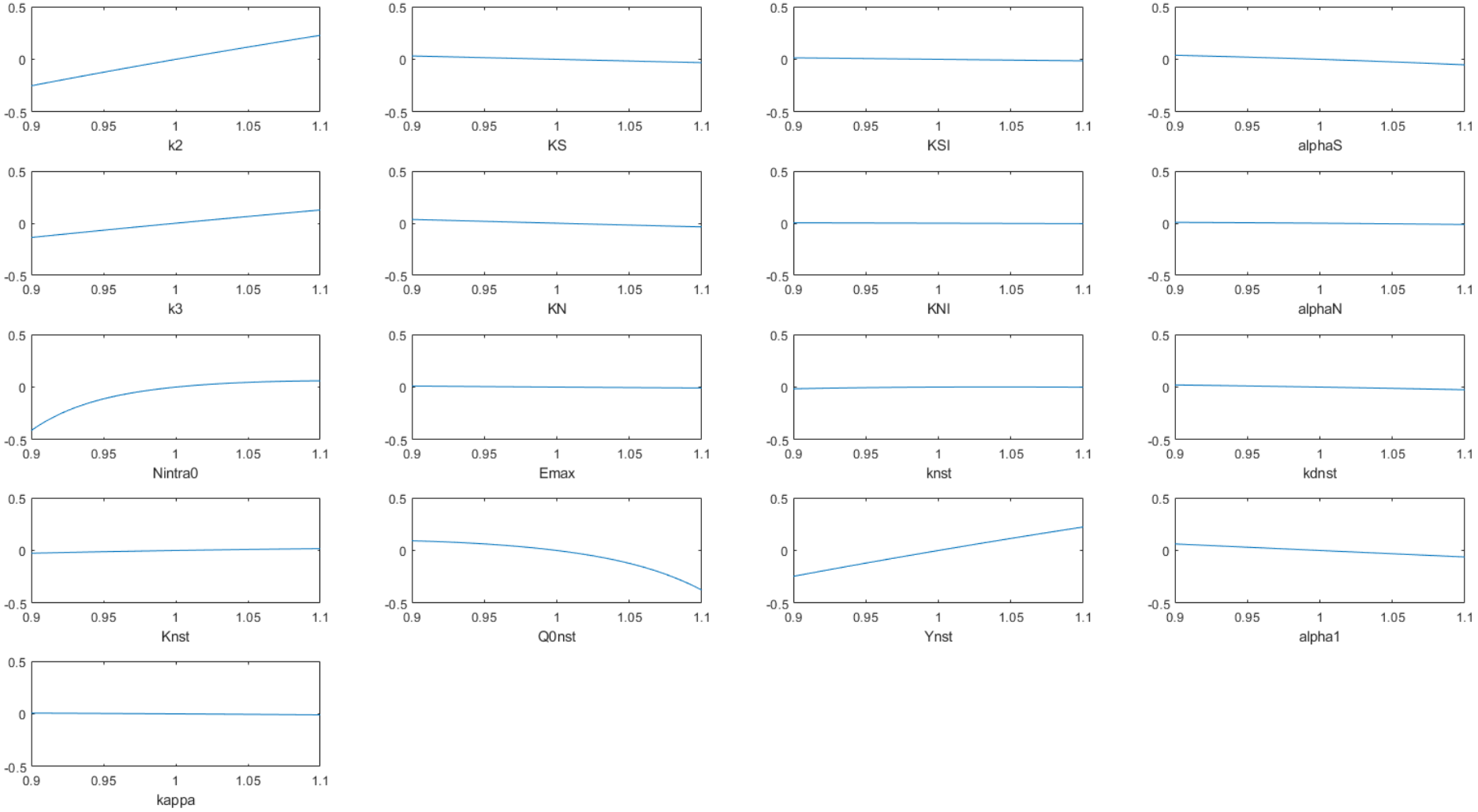


Figure 21 Sensitivity coefficients for each model 1 parameters and for CO_2 release

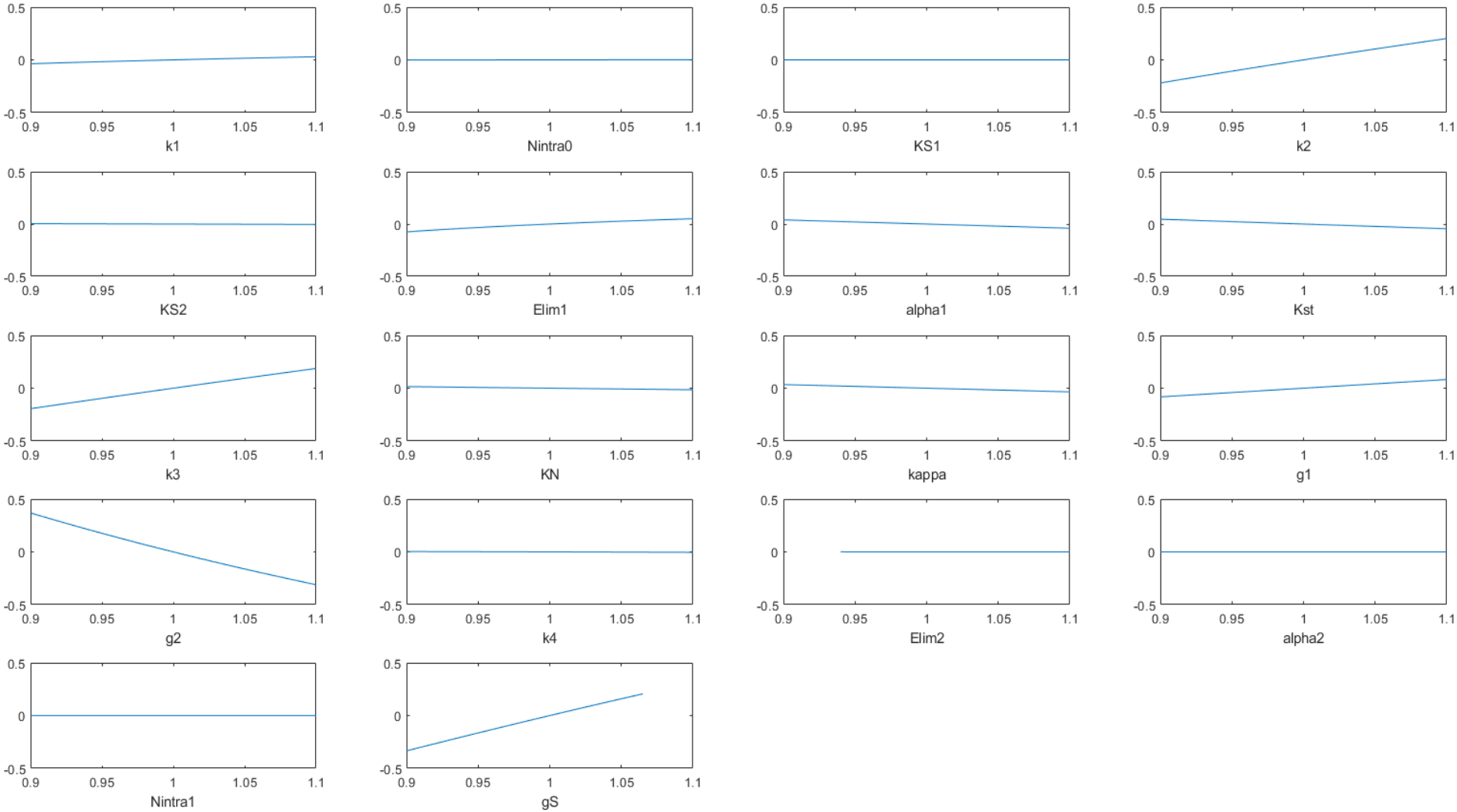


Figure 22 Sensitivity coefficients for each model 2 parameters and for CO_2 release

6 Models validation

Models 1 and 2 are validated and compared with Malherbe's [8] and Brou's [11] models recalibrated with the same calibration data as models 1 and 2 on data from 5 fermentations with nitrogen addition. The fermentations are made with three initial nitrogen concentrations (70, 140 and 210 mg/L), three added nitrogen concentrations (50, 100 and 150 mg/L) and two timing of nitrogen addition (20 and 35 g/L of CO_2).

Error! Reference source not found. shows data generated by the four models and experimental data for the five calibration fermentations. Graphically Malherbe's model simulates well the maximal biomass concentration and Brou's model overestimate maximal biomass concentration before nitrogen addition. Malherbe's model does not predict biomass regrowth because its biomass equation does not take into account a nitrogen add. Brou's model simulates a biomass regrowth after nitrogen addition but overestimates strongly the biomass production. Model 2 predicted well the maximal biomass after the first part of the biomass growth whereas model 1 simulates too slowly biomass production in the first part of biomass growth. After nitrogen addition model 2 is closer to the experimental biomass measure than the model 1.

Malherbe's model estimates well CO_2 production for three fermentations (MS140+50 and MS210+100 with a nitrogen addition at 20 g/L of CO_2 released and MS140+100 with a nitrogen addition at 35 g/L CO_2 released) but estimates poorly the CO_2 production for MS70+100 with a nitrogen addition at 20 g/L of CO_2 released during the whole fermentation and MS140+150 with a nitrogen addition at 20 g/L of CO_2 released after nitrogen addition. Brou's model estimates well CO_2 production before nitrogen addition but underestimates CO_2 production after nitrogen addition and the final CO_2 production. Models 1 and 2 simulate well CO_2 production all around the fermentation but they slightly overproduce CO_2 after nitrogen addition.

Malherbe's model does not predict very well the CO_2 production rate before the nitrogen addition. Malherbe's model overestimates the V_{max}. Brou's model simulates poorly the CO_2 production rate for the five fermentations. The nitrogen addition has no effect on CO_2 production rate simulated by Brou's and Malherbe's models. Models 1 and 2 simulate well CO_2 production rate during the whole fermentation. Models 1 and 2 predict well the CO_2 production rate during the whole fermentations. Models 1 and 2 predict well the V_{max} value during the first phase of growth and the time at which V_{max} are reached before and after nitrogen addition but during the second growth phase after nitrogen addition, V_{max} is less well estimated than before nitrogen add by models 1 and 2.

Globally models 1 and 2 simulate the five validation fermentations of calibration better than Malherbe's and Brou's models. Models 1 and 2 simulate very well the fermentation with a nitrogen add at 35 g/L of CO_2 released and can be extended to fermentations with different nitrogen adds timings.

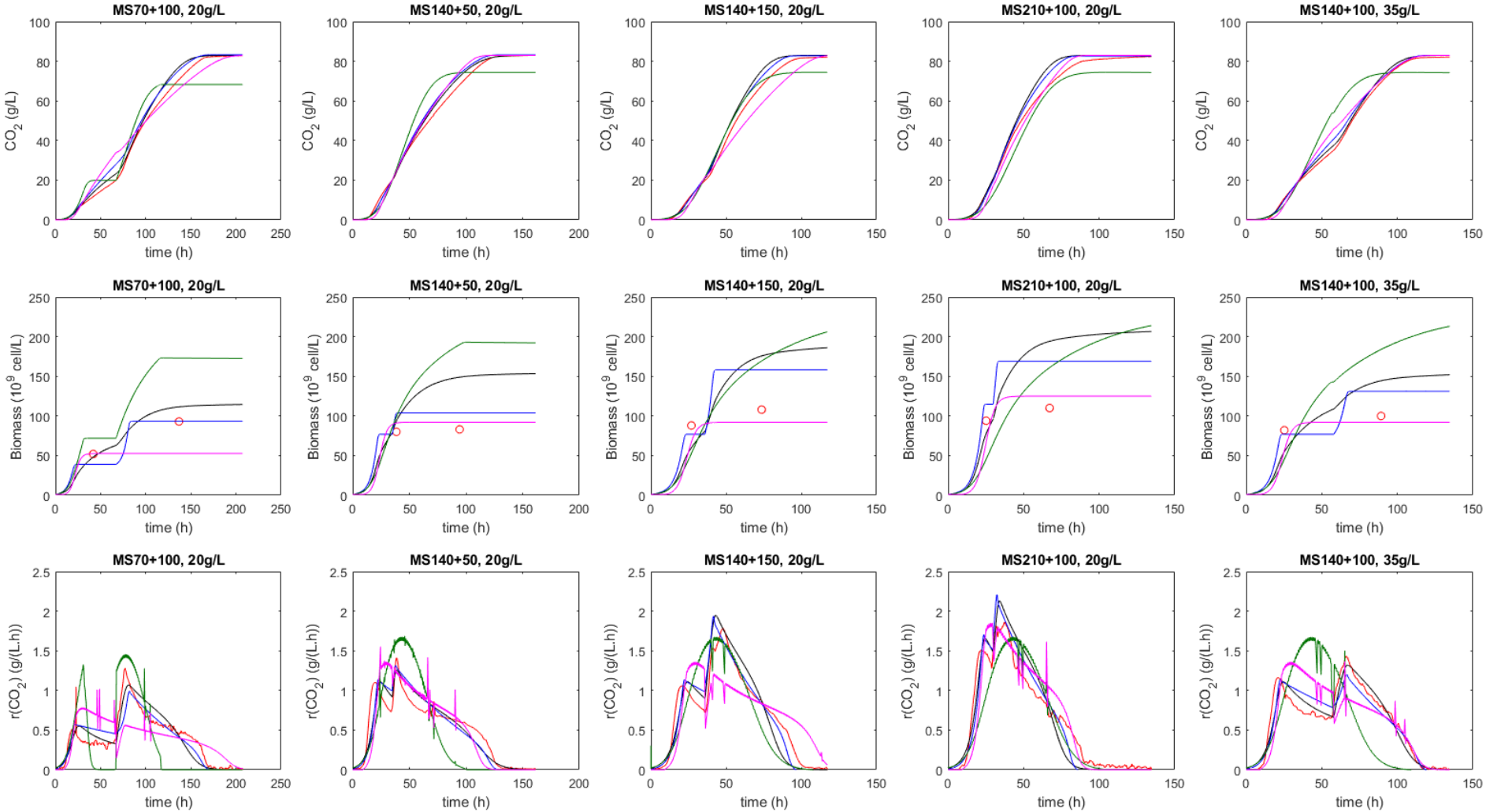


Figure 23 Dynamic evolution for CO_2 production, biomass production and CO_2 production rate for the experimental data (in red) and data simulated by models 1 (in black), 2 (in blue), Malherbe's model (in green) and Brou's model (in magenta). The first line represents the CO_2 production, the second line the biomass production and the third line the CO_2 production rate.

The NRMSE values for CO_2, CO_2 production rate and biomass for each fermentation are presented in Table 20. Models 1 and 2 simulate well CO_2 production (NRMSE values go respectively from 0.0186 to 0.0474 and from 0.0287 to 0.0465). They fit better to experimental data than Malherbe's and Brou's models (NRMSE values from 0.0299 to 0.637 and from 0.0519 to 115 for Malherbe's and Brou's Models respectively). Models 1 and 2 fit better to experimental data than Malherbe's and Brou's models for models for the CO_2 production rate with NRMSE for models 1 and 2 (NRMSE values go respectively from 0.0399 to 0.110 and from 0.0398 to 0.109) lower than those obtained for Malherbe's and Brou's Model (NRMSE values from 0.116 to 0.208 and from 0.143 to 0.335 for Malherbe's model and Brou's Models respectively).

The biomass is badly simulated by models 1 and 2 (NRMSE values go respectively from 0.119 to 0.479 and from 0.0707 to 0.362), as Malherbe's and Brou's Models. The nitrogen addition at 35g/L of CO_2 release does not change the models 1 and 2 performances: the NRMSE values are not upper than the NRMSE values for a nitrogen add at 20g/L of CO_2 release. Models 1 and 2 are validated on CO_2, r_{CO2} and biomass (two measures) data from 5 fermentations with nitrogen addition for two different fermentation progress. They allow to simulate a nitrogen addition at 35g/L of CO_2 released despite being calibrated on fermentation with nitrogen addition at 20g/L of released CO2. Models 1 and 2 present a better adequation to experimental data than Brou's and Malherbe's model. Model 1 are slightly better than model 2 for CO_2 production (NRMSE average value respectively of 0.0365 and 0.0404) whereas model 2 are slightly better for r_{CO2} and biomass than model 1 (NRMSE average value respectively of 0.0804 and 0.0756 for CO_2 production rate and of 0.235 and 0.371 for biomass).

Table 20 NRMSE calculated for CO_2, CO_2 production rate and biomass for models 1 and 2, Brou and Malherbe

Fermentation			NRMSE											
N_0	CO_{2aj}	N_{aj}	CO_2				r_{CO2}				Biomass			
mg/L	g/L	mg/L	Model 1	Model 2	Brou	Malherbe	Model 1	Model 2	Brou	Malherbe	Model 1	Model 2	Brou	Malherbe
70	20	100	0.0372	0.0465	0.107	0.066	0.0399	0.0398	0.267	0.208	0.119	0.0707	0.626	0.306
140	20	50	0.0271	0.0393	0.099	0.0474	0.0961	0.109	0.280	0.164	0.479	0.267	0.926	0.121
140	20	150	0.0474	0.0352	0.0519	0.637	0.106	0.0859	0.166	0.181	0.443	0.293	0.463	0.172
140	35	100	0.0186	0.0287	0.115	0.0502	0.0499	0.0499	0.354	0.202	0.358	0.181	0.648	0.193
210	20	100	0.0522	0.0381	0.0742	0.0300	0.110	0.0936	0.143	0.116	0.458	0.362	0.455	0.202

According to AIC values, Models 1 and 2 predict better than Brou's and Malherbe's Models the CO_2 production rate: the AIC values goes from -766 to -90.1 for Model 1, from -630 to -215 for Model 2, from 123 to 638 for Brou's Model and from -44.0 to 239 for Malherbe's Model.

Models 1 and 2 are better than Brou's Model for all fermentations and than Malherbe's Model to predict CO_2 for almost all fermentations: Malherbe's Model is better than Models 1 and 2 for MS210+100 with a nitrogen addition at 20 g/L of CO_2 released.

Tableau 21 AIC values calculated for CO_2, CO_2 production rate and biomass for models 1 and 2, of Brou and of Malherbe

			AIC											
N_0	CO_{2aj}	N_{aj}	CO_2				r_{CO2}				Biomass			
mg/L	g/L	mg/L	Model 1	Model 2	Brou	Malherbe	Model 1	Model 2	Brou	Malherbe	Model 1	Model 2	Brou	Malherbe
70	20	100	3180	3458	4481	3888	-766	-630	466	153	52,0	52,5	57,9	55,1
140	20	50	2200	2565	3468	2663	-528	-404	511	-8,71	57,1	56,1	59,0	50,9
140	20	150	1991	1785	2056	2196	-134	-282	181	239	57,5	58,0	57,3	53,4
140	35	100	1509	1860	2967	2301	-609	-385	638	183	56,4	56,1	58,4	53,5
210	20	100	2339	2087	2619	1891	-90,1	-215	123	-44,0	58,1	58,8	57,3	54,1

7 Conclusions

Two models of fermentation in oenological conditions were proposed in this work. They are based on a storage compartment of nitrogen in yeast cells and simulate the macroscopic temporal evolution of biomass, sugar, ethanol, carbon dioxide, nitrogen, intra-cellular nitrogen and cell activity by differential equations. They consider effect of nitrogen addition during fermentation on growth and production kinetics of CO_2 and ethanol. The two models are robust for most parameters and have been validated on experimental data with good fitting on CO_2 release and production rate.

Even though both developed models have good performance on the validation fermentations, Model 1 is slightly better than Model 2 on CO_2 and CO_2 production rate (NRMSE average value respectively of 0.0365 and 0.0404) whereas model 2 are slightly better for CO_2 production rate and biomass than model 1 (NRMSE average value respectively of 0.0804 and 0.0756 for CO_2 production rate and of 0.235 and 0.371 for biomass. The Models 1 and 2 present better performance than Malherbe's and Brou's Models according to AIC values even if they have been calibrated with the same data as models 1 and 2. In addition, Model 1 is less sensitive than Model 2 to changes in parameters.

Acknowledgements

References

1. Monteiro, F.F. and L.F. Bisson, *Amino Acid Utilization and Urea Formation During Vinification Fermentations.* American Journal of Enology and Viticulture, 1991. **42**(3): p. 199-208.

2. Agenbach, W.A., *A study of must nitrogen content in relation to incomplete fermentations, yeast production and fermentation activity*, 1977, South African Society for Enology and Viticulture: Stellenbosch (ZA).

3. Bely, M., J.M. Sablayrolles, and P. Barre, *Automatic Detection of Assimilable Nitrogen Deficiencies during Alcoholic Fermentation in Enological Conditions.* Journal of Fermentation and Bioengineering, 1990. **70**(4): p. 246-252.

4. Mendes-Ferreira, A., A. Mendes-Faia, and C. Leão, *Growth and fermentation patterns of Saccharomyces cerevisiae under different ammonium concentrations and its implications in winemaking industry.* Journal of Applied Microbiology, 2004. **97**(3): p. 540-545.
5. Bisson, L.F., *Stuck and sluggish fermentations.* Américan Journal of enology and viticulture, 1999(50): p. 107-119.
6. Crépin, L., T. Nidelet, I. Sanchez, S. Dequin, and C. Camarasa, *Sequential use of nitrogen compounds by Saccharomyces cerevisiae during wine fermentation : a model based on kinetic and regulation characteristics of nitrogen permeases.* Applied and Environmental Microbiology, 2012. **77**: p. 8102-8111.
7. Carrau, F.M., K. Medina, L. Farina, E. Boido, P.A. Henschke, and E. Dellacassa, *Production of fermentation aroma compounds by Saccharomyces cerevisiae wine yeasts: effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains.* FEMS Yeast Research, 2008. **8**(7): p. 1196-207.
8. Malherbe, S., V. Fromion, N. Hilgert, and J.M. Sablayrolles, *Modeling the effects of assimilable nitrogen and temperature on fermentation kinetics in enological conditions.* Biotechnology and Bioengineering, 2004. **86**(3): p. 261-72.
9. Commission, E., *Commission Delegated Regulation (EU) 2019/934 of 12 March 2019 supplementing Regulation (EU) No 1308/2013 of the European Parliament and of the Council as regards wine-growing areas where the alcoholic strength may be increased, authorized oenological practices and restrictions applicable to the production and conservation of grapevine products, the minimum percentage of alcohol for by-products and their disposal, and publication of OIV files*, 2019.
10. David, R., D. Dochain, J.R. Mouret, A. Vande Wouwer, and J.M. Sablayrolles, *Nitrogen-backboned modeling of wine-making in standard and nitrogen-added fermentations.* Bioprocess and biosystems engineering, 2014. **37**(1): p. 5-16.
11. Brou, P.R.J., P. Taillandier, S. Beaufort, and C. Brandam, *Modelling of S. cerevisiae and T. delbrueckii pure culture fermentation in synthetic media using a compartmental nitrogen model.* OENO One, 2020. **54**: p. 299–311.
12. Bisson, L.F. *Influence of nitrogen on yeast and fermentation of grapes*. in *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine: Seattle, Washington, Usa 18-19 june 1991*. 1991. American Society for Enology and Viticulture, ASEV.
13. Leão, C. and N. Van Uden, *Effects of ethanol and other alkanols on the ammonium transport system of Saccharomyces cerevisiae.* Biotechnology and Bioengineering, 1983. **25**(8): p. 2085-2089.
14. Bisson, L.F., *Glucose transport in Saccharomyces cerevisiae and the role of potassium in stuck fermentation.* Proceedings of the 2000 Entretiens Scientifiques Lallemand, Krems, Austria, 2000: p. 27-33.
15. Ansanay-Galeote, V., B. Blondin, S. Dequin, and J.-M. Sablayrolles, *Stress effect of ethanol on fermentation kinetics by stationary-phase cells of Saccharomyces cerevisiae.* Biotechnology Letters, 2001. **23**(9): p. 677-681.
16. Aiba, S., M. Shoda, and M. Nagatani, *Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation.* Biotechnology and Bioengineering, 1968. **10**(6): p. 845-864.
17. Boulton, R., *The Prediction of Fermentation Behavior by a Kinetic Model.* American Journal of Enology and Viticulture, 1980. **31**(1): p. 40-45.
18. Caro, I., L. Pérez, and D. Cantero, *Development of a kinetic model for the alcoholic fermentation of must.* Biotechnology and Bioengineering, 1991. **38**(7): p. 742-748.
19. Colombié, S., S. Malherbe, and J.-M. Sablayrolles, *Modeling Alcoholic Fermentation in Enological Conditions: Feasibility and Interest.* American Journal of Enology and Viticulture, 2005. **56**(3): p. 238-245.
20. Marín, M.R., *Alcoholic Fermentation Modelling: Current State and Perspectives.* American Journal of Enology and Viticulture, 1999. **50**(2): p. 166-178.
21. Sevely, Y., J.B. Pourciel, G. Rauzy, and J.P. Bovee, *Modelling, Identification and Control of the Alcohol Fermentation in a Cascade Reactor.* IFAC Proceedings Volumes, 1981. **14**(2): p. 2821-2828.

22. Williams, D., P. Yousefpour, and E.M.H. Wellington, *On-line adaptive control of a fed-batch fermentation of Saccharomyces cerevisiae.* Biotechnology and Bioengineering, 1986. **28**(5): p. 631-645.
23. Cramer, A.C., S. Vlassides, and D.E. Block, *Kinetic model for nitrogen-limited wine fermentations.* Biotechnology and bioengineering, 2002. **77**(1): p. 49-60.
24. Bely, M., J.M. Sablayrolles, and P. Barre, *Description of alcoholic fermentation kinetics-its variability ad significance.* American Journal ofr Enology and Viticulture, 1990. **70**: p. 246-252.
25. Mouret, J.R., C. Camarasa, M. Angenieux, E. Aguera, M. Perez, V. Farines, and J.M. Sablayrolles, *Kinetic analysis and gas–liquid balances of the production of fermentative aromas during winemaking fermentations: Effect of assimilable nitrogen and temperature.* Food Research International, 2014. **62**: p. 1-10.
26. Sablayrolles, J.M., P. Barre, and G. P., *Design of a laboratory automatic system for studying alcoholic fermentations in anisothermal enological conditions.* Biotechnology Techniques, 1987. **1**: p. 181-184.
27. Godillot, J., I. Sanchez, M. Perez, C. Picou, V. Galeote, J.-M. Sablayrolles, V. Farines, and J.R. Mouret, *The Timing of Nitrogen Addition Impacts Yeast Genes Expression and the Production of Aroma Coumpounds During Wine Fermentation.* Frontiers in Microbiology, 2022. **13**.
28. Shampine, L.F. and M.W. Reichelt, *The MATLAB ODE Suite.* SIAM Journal on Scientific Computing, 1997. **18**(1): p. 1-22.
29. Armstrong, J.S. and F. Collopy, *Error measures for generalizing about forecasting methods: Empirical comparisons.* International Journal of Forecasting, 1992. **8**(1): p. 69-80.
30. Akaike, H., *A New Look at the Statistical Model Identification.* IEEE Tnrasactions on Automatic Control, 1974. **19**(6): p. 716-723.
31. Bernard, O., Z. Hadj-Sadok, D. Dochain, A. Genovesi, and J.P. Steyer, *Dynamical model development and parameter identification for an anaerobic wastewater treatment process.* Biotechnology and bioengineering, 2001. **75(4)**: p. 424-438.

V.A. Résultats supplémentaires à l'article

V.A.1. Résultats complémentaires pour la validation

La validation des deux modèles construits a été présentée, dans la publication, pour cinq fermentations (quatre fermentations avec un ajout à 20 g/L de CO_2 dégagé et une fermentation avec un ajout à 35 g/L de CO_2 dégagé) mais seize fermentations faites pour différents timings d'azote (20, 35 et 50 g/L de CO_2 dégagé) ont été utilisées pour la validation des modèles 1 et 2.

Les Figure 24**Error! Reference source not found.**, Figure 25, Figure 26 et Figure 27 montrent les données expérimentales et simulées par les modèles 1 et 2 pour le CO_2 dégagé ; les Figure 28, Figure 29, Figure 30 et Figure 31 montrent les données pour la vitesse de dégagement r_{CO2} et les Figure 32, Figure 33, Figure 34 et Figure 35 la biomasse. Graphiquement le CO_2 et le r_{CO2} sont bien simulés pour les fermentations réalisées avec une concentration initiale en azote de 140 et de 210 mg/L. Le modèle 2 surestime la production de CO_2 avant ajout d'azote mais estime bien le CO_2 produit final pour les fermentations faites avec une concentration initiale en azote de 70 mg/L et un ajout à 35 ou 50 g/L. L'ajout d'azote n'a pas d'effet sur le CO_2 simulé par le modèle 1 pour une concentration initiale en azote de 70 mg/L et un ajout d'azote avec une concentration de 100 mg/L à 50 g/L de CO_2 produit. Pour les fermentations faites avec une concentration initiale en azote de 70 mg/L et un ajout d'azote à 35 ou 50 g/L de CO_2, les modèles 1 et 2 simulent mal le r_{CO2} après l'ajout d'azote.

Finalement, les deux modèles ne peuvent pas être discriminés pour la biomasse car les fermentations ne présentent que deux mesures expérimentales de biomasse.

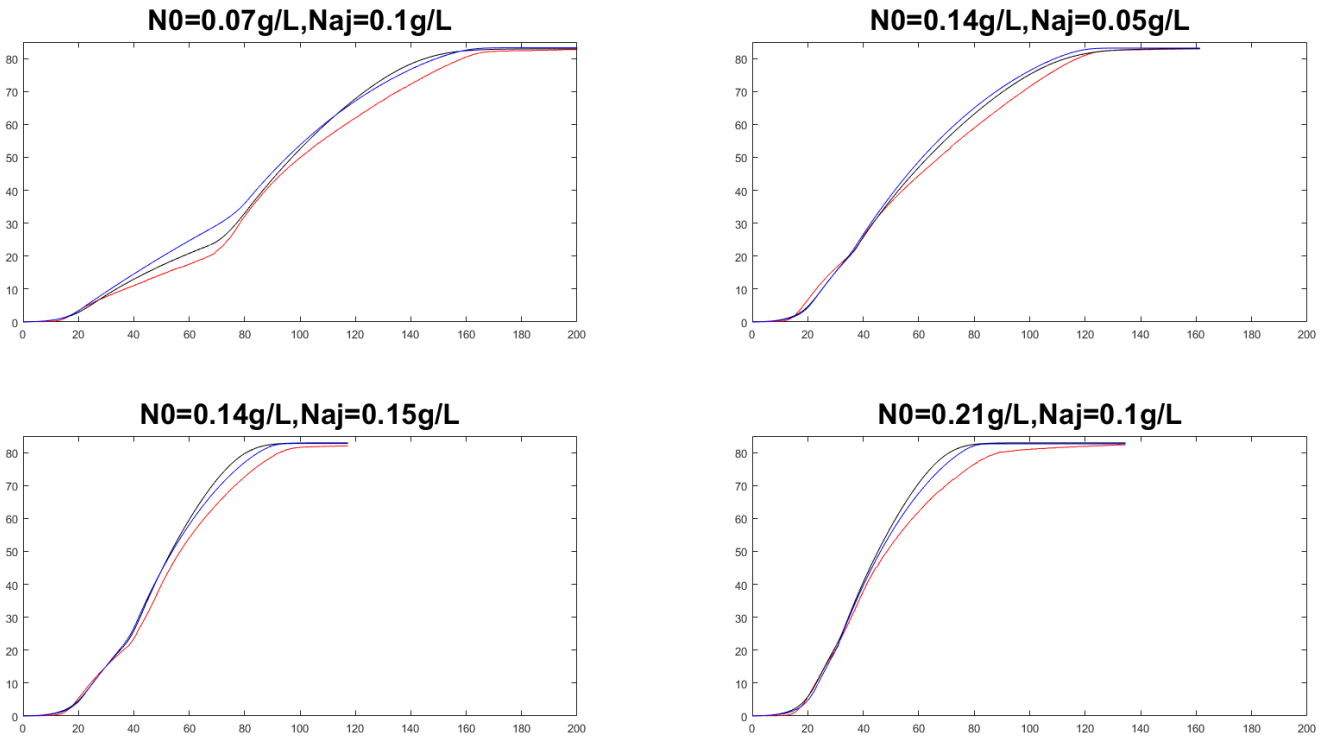


Figure 24 Comparaison entre les données de CO_2 produit expérimentales (en rouge), et simulées par les modèles 1 (en noir) et 2 (en bleu) pour les fermentations de validation avec un ajout d'azote à 20 g/L de CO_2 dégagé.

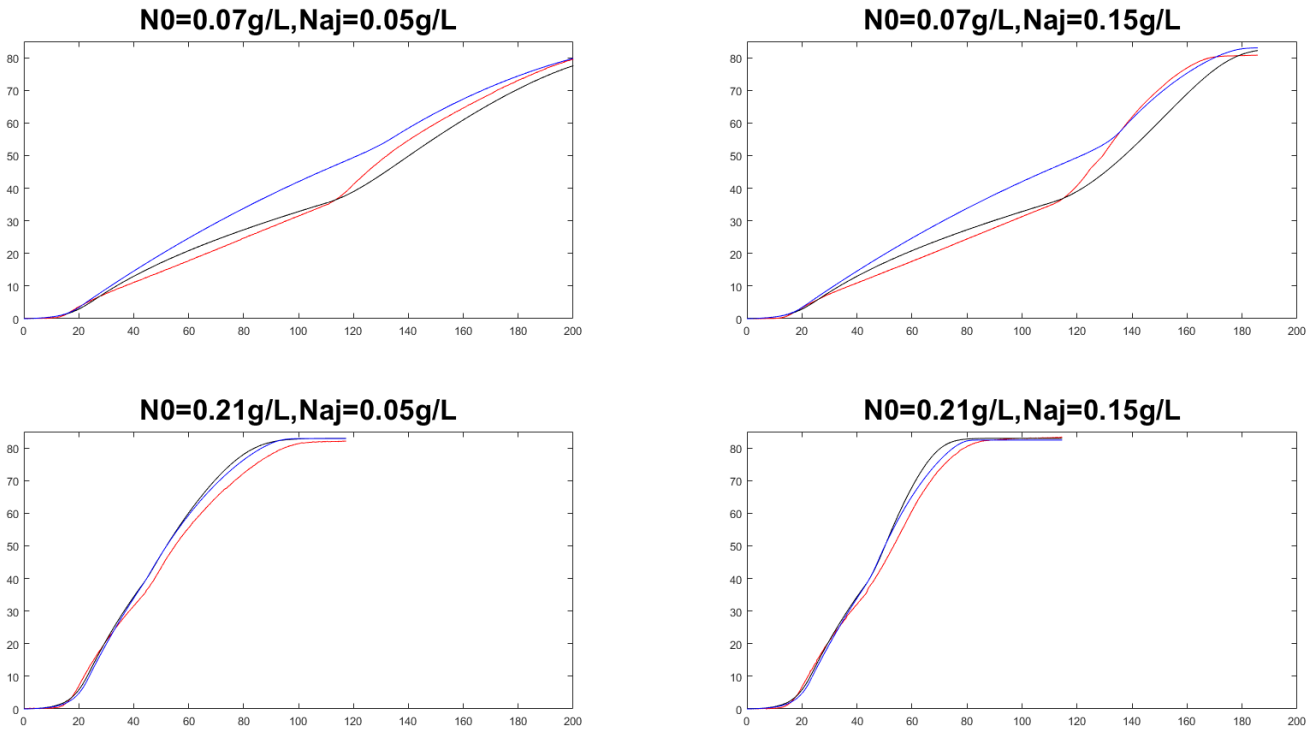


Figure 25 Comparaison entre les données de CO_2 produit expérimentales (en rouge), et simulées par les modèles 1 (en noir) et 2 (en bleu) pour les fermentations de validation avec un ajout d'azote à 35 g/L de CO_2 dégagé.

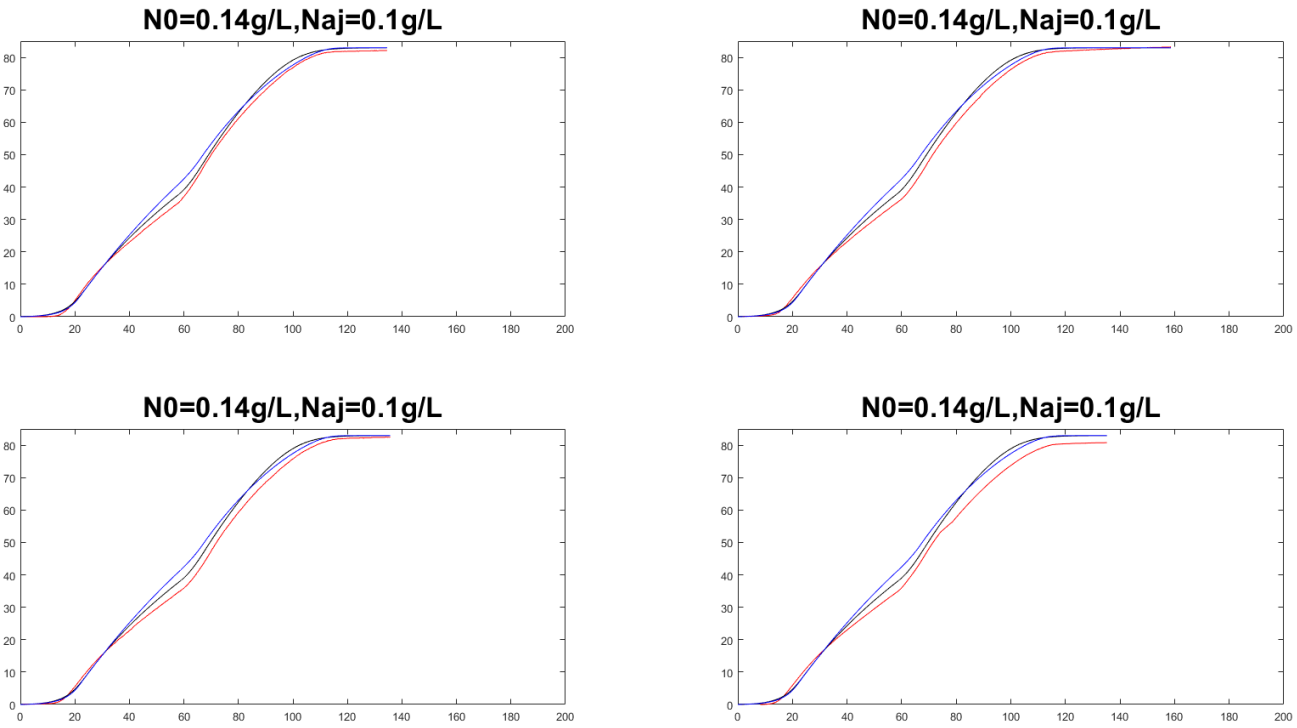


Figure 26 Comparaison entre les données de CO2 produit expérimentales (en rouge), et simulées par les modèles 1 (en noir) et 2 (en bleu) pour les fermentations de validation du quadruplicat.

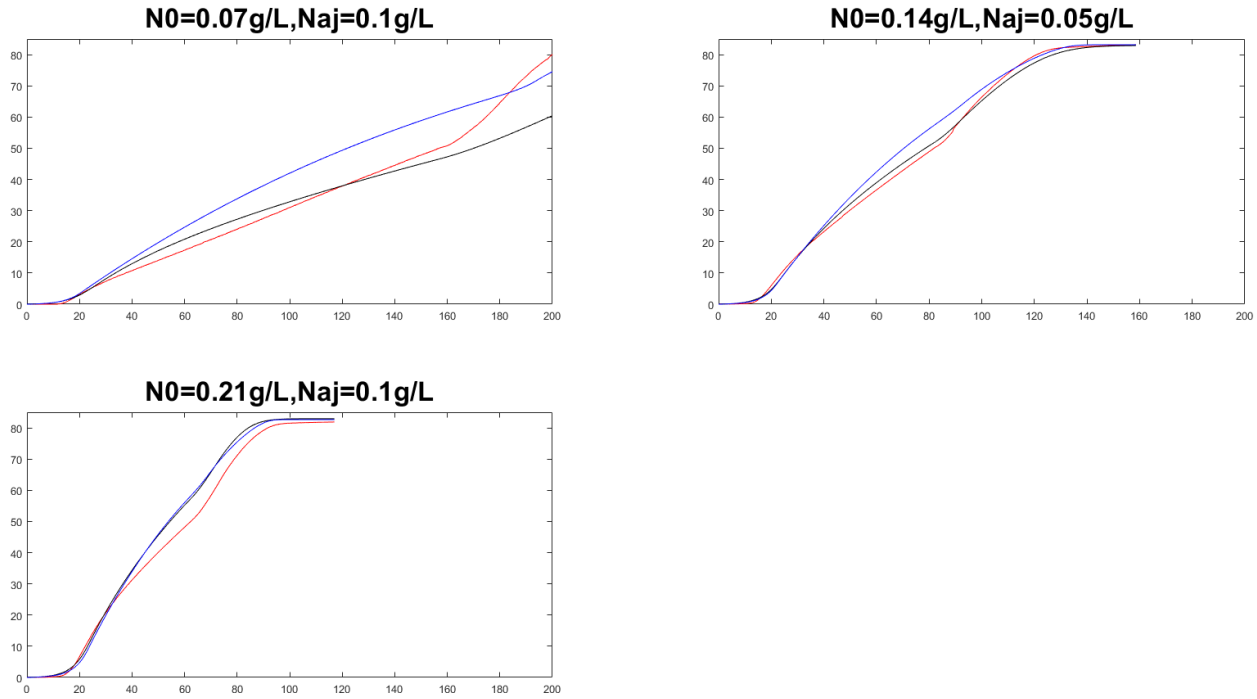


Figure 27 Comparaison entre les données de CO_2 produit expérimentales (en rouge), et simulées par les modèles 1 (en noir) et 2 (en bleu) pour les fermentations de validation avec un ajout d'azote à 50 g/L de CO_2 dégagé.

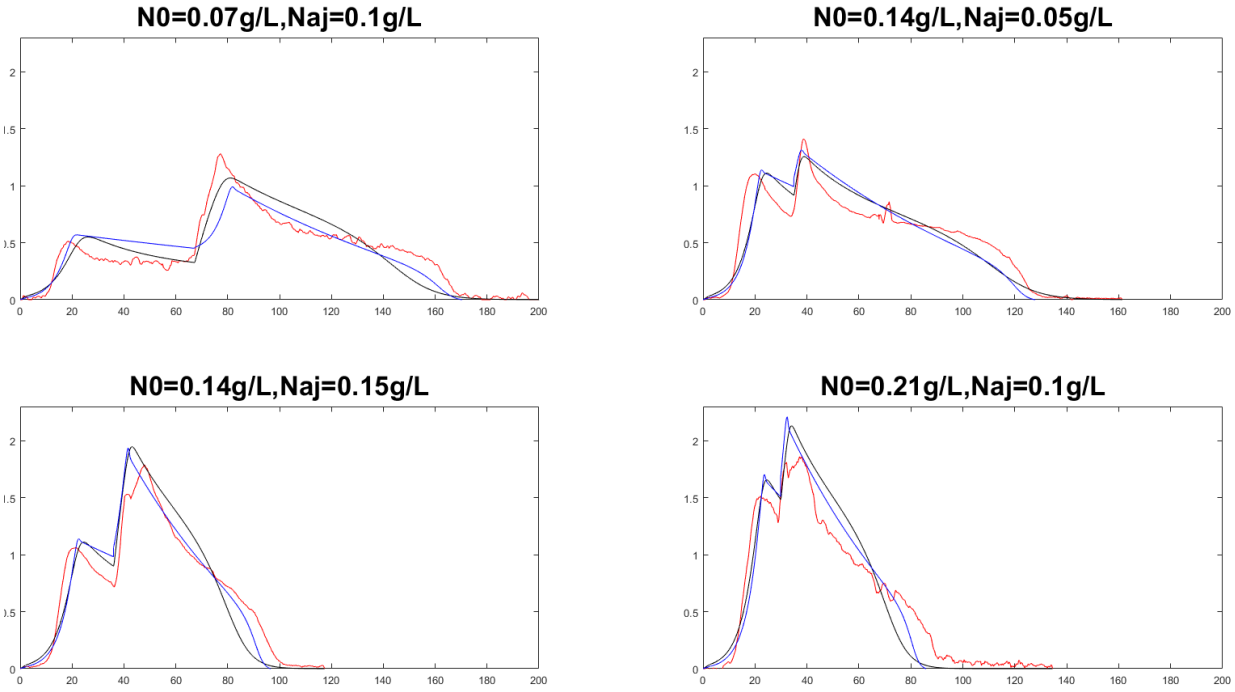


Figure 28 Comparaison entre les données de vitesse de production de CO_2 expérimentales (en rouge) et simulées par les modèles 1 (en noir) et 2 (en bleu) pour les fermentations avec un ajout d'azote à 20 g/L de CO_2 dégagé.

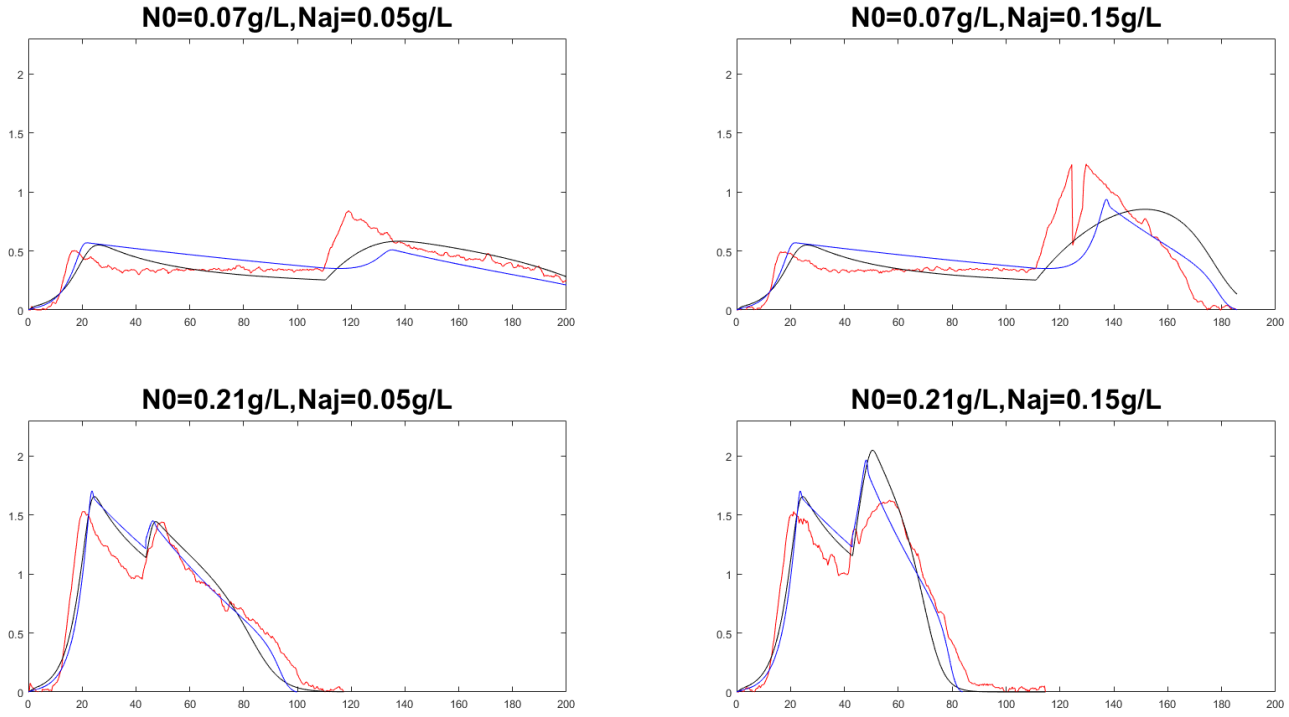


Figure 29 Comparaison entre les données de vitesse de production de CO_2 expérimentales (en rouge) et simulées par les modèles 1 (en noir) et 2 (en bleu) pour les fermentations avec un ajout d'azote à 35 g/L de CO_2 dégagé.

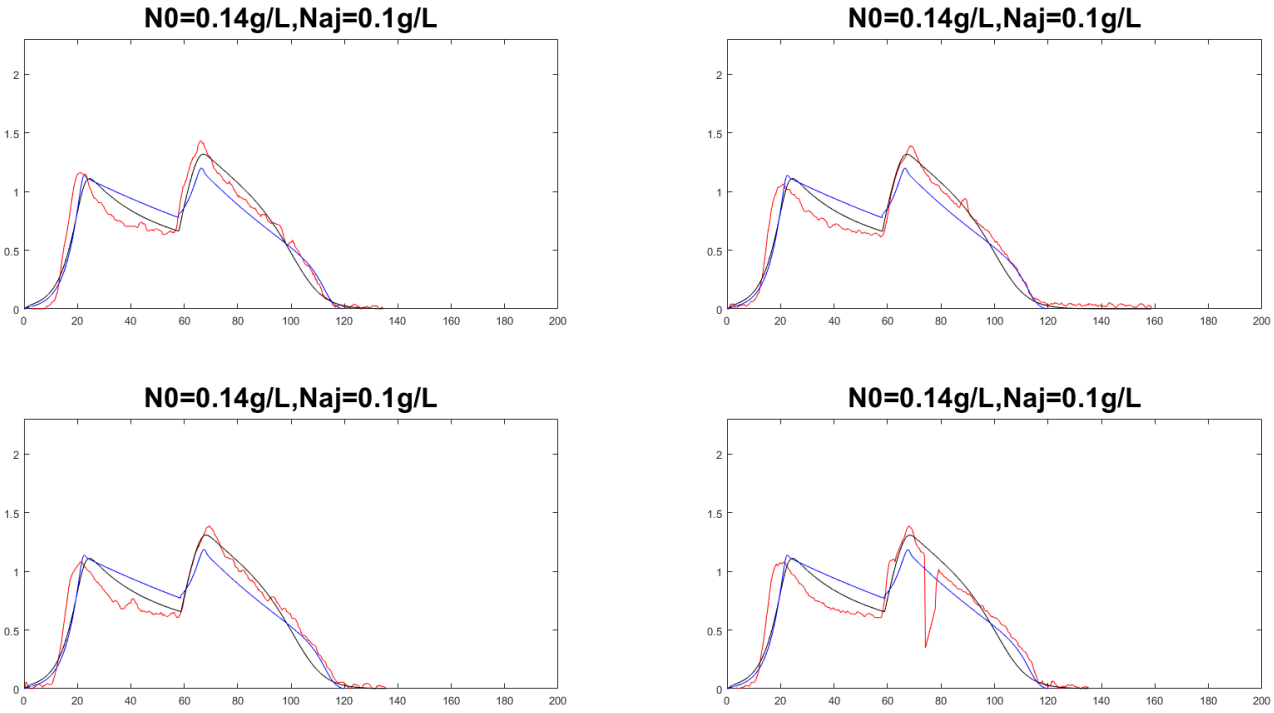
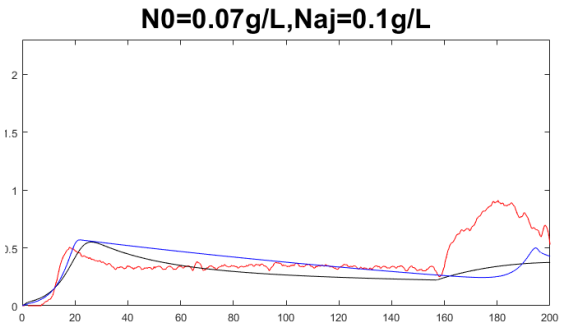
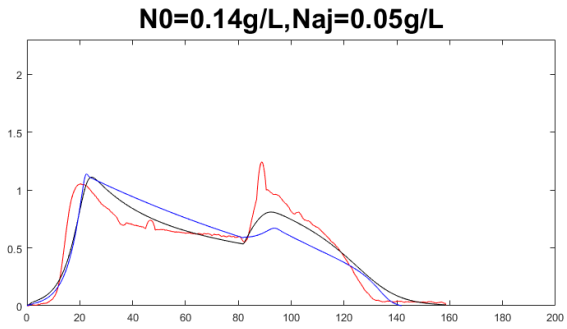


Figure 30 Comparaison entre les données de vitesse de production de CO_2 expérimentales (en rouge) et simulées par les modèles 1 (en noir) et 2 (en bleu) pour les fermentations du quadruplicat.





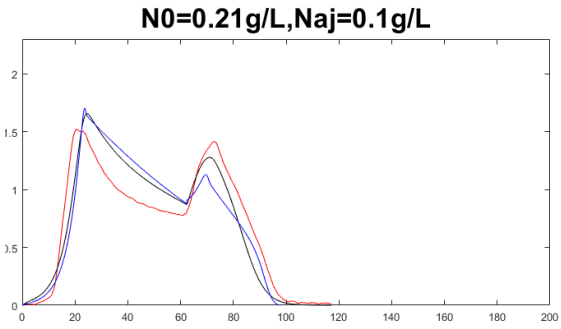
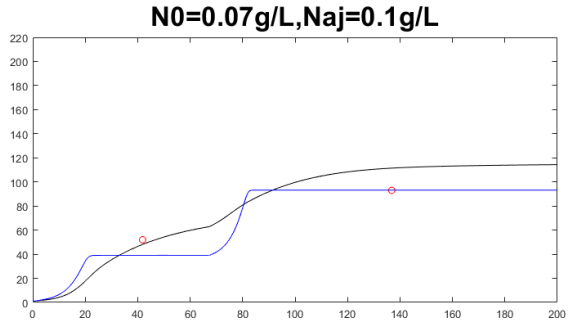
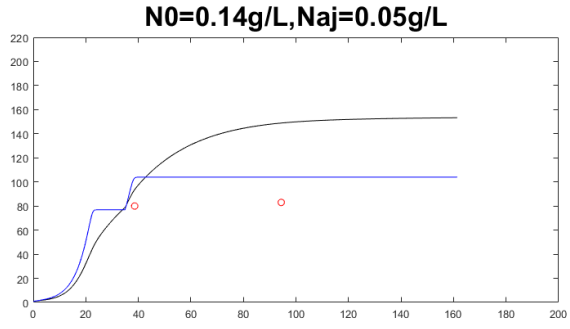
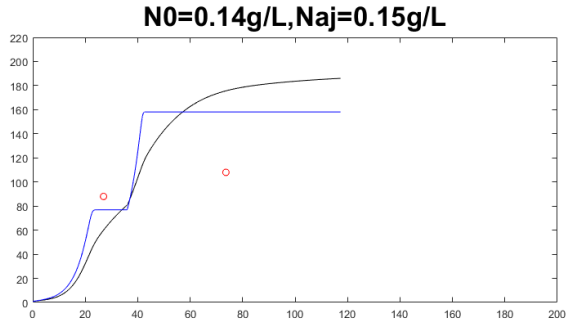


Figure 31 Comparaison entre les données de vitesse de production de CO_2 expérimentales (en rouge) et simulées par les modèles 1 (en noir) et 2 (en bleu) pour les fermentations avec un ajout d'azote à 50 g/L de CO_2 dégagé.







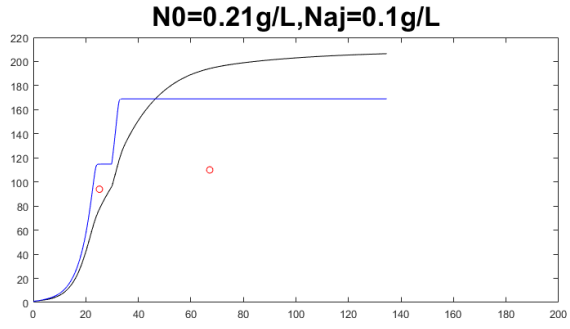


Figure 32 Comparaison entre les données de biomasse expérimentales (en rouge) et simulées par les modèles 1 (en noir) et 2 (en bleu) pour les fermentations avec un ajout d'azote à 20 g/L de CO_2 dégagé.

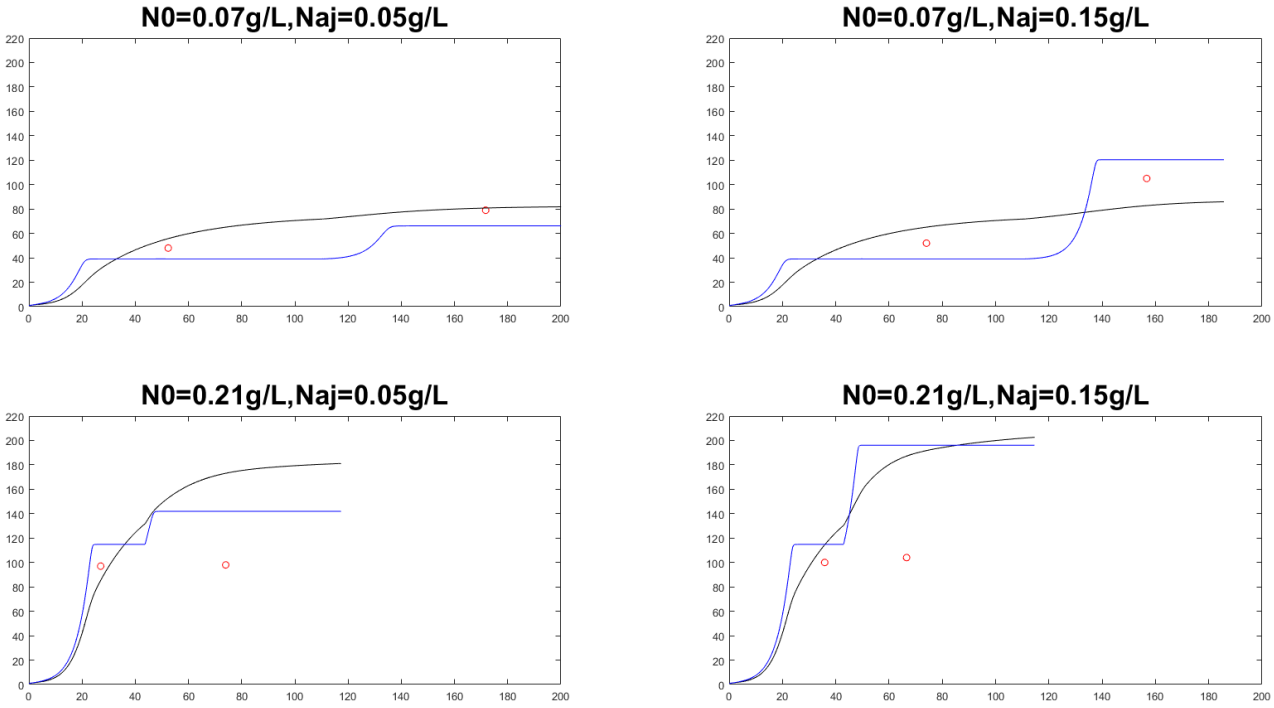


Figure 33 Comparaison entre les données de biomasse expérimentales (en rouge) et simulées par les modèles 1 (en noir) et 2 (en bleu) pour les fermentations avec un ajout d'azote à 35 g/L de CO_2 dégagé.

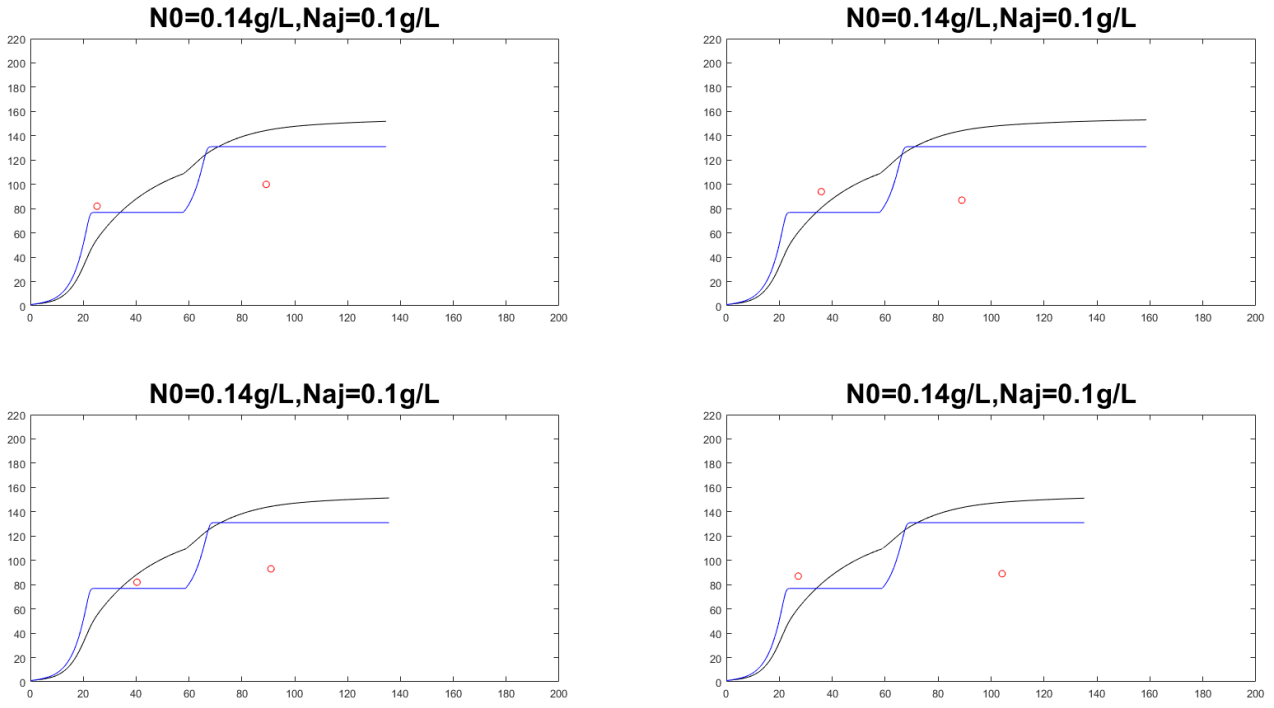


Figure 34 Comparaison entre les données de biomasse expérimentales (en rouge) et simulées par les modèles 1 (en noir) et 2 (en bleu) pour les fermentations du quadruplicat.

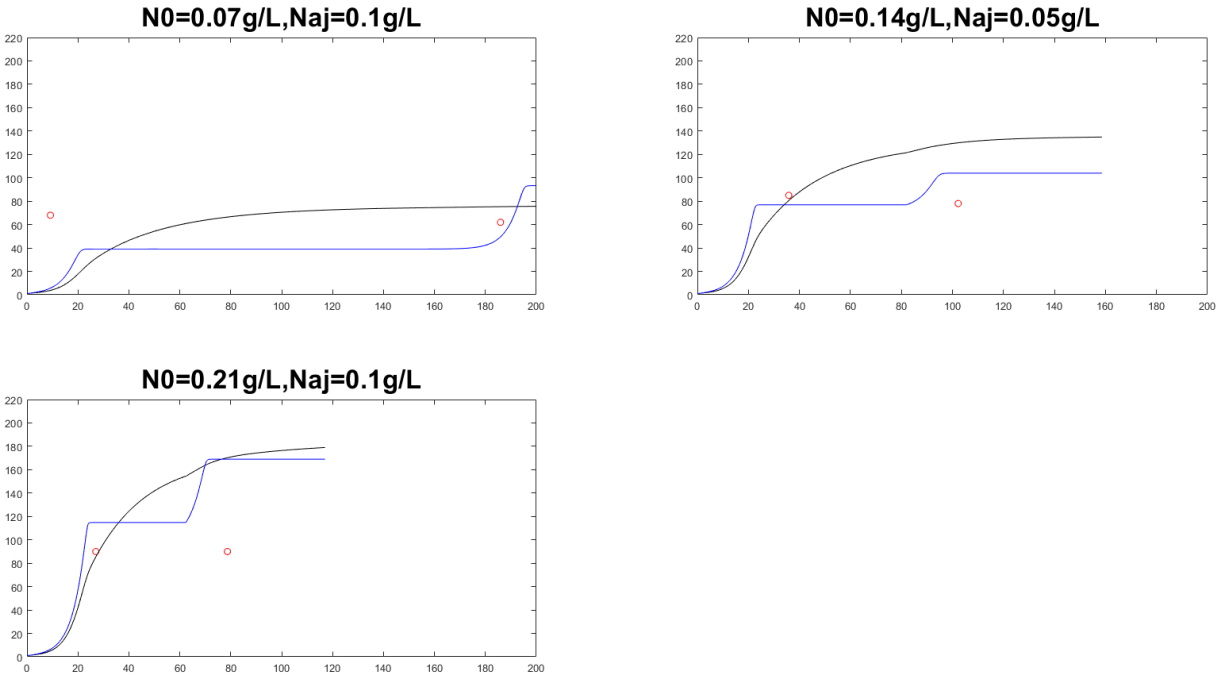


Figure 35 Comparaison entre les données de biomasse expérimentales (en rouge) et simulées par les modèles 1 (en noir) et 2 (en bleu) pour les fermentations avec un ajout d'azote à 50 g/L de CO_2 dégagé.

L'adéquation des simulations avec les valeurs expérimentales a été également évalué en calculant les valeurs des NRMSE pour le CO_2, le r_{CO2} et la biomasse pour les onze fermentations non présentées dans la publication (cf. Tableau IV.22). Les valeurs de NRMSE pour le CO_2, le r_{CO2} et la biomasse pour les cinq autres fermentations de validation sont présentées dans le Table 5 de la publication. Les seize fermentations seront utilisées dans cette partie.

Pour les seize fermentations, le modèle 1 et le modèle 2 présentent des capacités de simulation équivalentes pour le CO_2 et le r_{CO2} (valeurs moyennes de NRMSE de 0,0401 et de 0,111 pour le modèle 1 et de 0,0474 et de 0,123 pour le modèle 2 respectivement). Les fermentations ne présentent que deux points de biomasse après chaque phase de croissance ce qui ne permet pas de valider la cinétique de croissance simulée par les deux modèles et de discriminer les deux modèles pour la biomasse.

Tableau IV.22 Valeurs desRMSE pour le CO_2, la vitesse de production de CO_2 et la biomasse pour les onze fermentations de validation non présentées dans la publication

Fermentation			NRMSE					
N_0 mg/L	CO_{2aj} g/L	N_{aj} mg/L	CO_2		r_{CO2}		Biomasse	
			Modèle 1	Modèle 2	Modèle 1	Modèle 2	Modèle 1	Modèle 2
140	20	50	0,0528	0,0654	0,126	0,143	0,521	0,143
70	35	50	0,0301	0,0656	0,124	0,159	0,0608	0,138
70	35	150	0,0543	0,0756	0,182	0,170	0,169	0,134
140	35	100	0,0229	0,0320	0,710	0,100	0,375	0,325
140	35	100	0,0268	0,0371	0,794	0,109	0,310	0,232
140	35	100	0,0369	0,0435	0,100	0,117	0,479	0,293
210	35	50	0,0404	0,0341	0,117	0,128	0,443	0,315
210	35	150	0,0399	0,0279	0,137	0,128	0,470	0,514
70	50	100	0,0875	0,0979	0,212	0,230	0,571	0,549
140	50	50	0,0177	0,0425	0,100	0,145	0,331	0,200
210	50	100	0,0492	0,0495	0,128	0,157	0,471	0,576

Le Tableau IV.23 montre les valeurs moyennes de NRMSE calculés pour le CO2, le rCO2 et la biomasse en fonction de la concentration initiale en azote. Les modèles 1 et 2 simulent mieux le CO_2 et le r_{CO2} pour une concentration initiale en azote de 140 ou de 210 mg/L que pour une concentration initiale de 70 mg/L.

Tableau IV.23 Valeurs moyennes de NRMSE pour le CO_2, le r_{CO2} et la biomasse en fonction de la concentration initiale en azote

		Concentration initiale en azote (mg/L)		
		70	140	210
CO_2	Modèle 1	0,0524	0,0313	0,0454
	Modèle 2	0,0713	0,0405	0,374
r_{CO2}	Modèle 1	0,139	0,0911	0,123
	Modèle 2	0,150	0,107	0,127
Biomasse	Modèle 1	0,230	0,412	0,460
	Modèle 2	0,230	0,241	0,442

Le Tableau IV.24 montre les valeurs moyennes de NRMSE calculés pour le CO_2, le r_{CO2} et la biomasse en fonction du timing d'ajout d'azote. Les modèles 1 et 2 sont meilleurs pour un ajout d'azote à 20 g/L de CO_2 dégagé que pour des ajouts à 35 g/L et 50 g/L car les modèles 1 et 2 ont été calibrés avec des fermentations avec des ajout à 20 g/L. Cependant les modèles 1 et 2 présentent une bonne adéquation aux données des fermentations avec des ajouts à 35 et 50 g/L : les valeurs moyennes de NRMSE pour des ajouts à 35 et 50 g/L restent proches de la valeur moyenne pour un ajout à 20 g/L.

Tableau IV.24 Valeurs moyennes de NRMSE pour le CO_2, le rCO_2 et la biomasse en fonction du timing d'ajout d'azote

		Timing d'ajout d'azote (g/L)		
		20	35	50
CO_2	Modèle 1	0,0433	0,0338	0,0515
	Modèle 2	0,0449	0,0430	0,0633
r_{CO2}	Modèle 1	0,0956	0,108	0,147
	Modèle 2	0,0943	0,120	0,177
Biomasse	Modèle 1	0,404	0,333	0,457
	Modèle 2	0,226	0,266	0,442

Les résultats montrant une bonne adéquation entre les données expérimentales et les données obtenues par simulation des deux modèles, les deux modèles sont donc validés pour une concentration initiale en azote allant de 70 à 210 mg/L, un ajout d'azote avec une concentration de 50 à 150 mg/L à un timing d'ajout d'azote à 20 g/L. Le domaine d'utilisation des deux modèles peut être élargi à des fermentations faites avec des ajouts réalisés à 35 et 50 g/L mais avec une légère perte de précision. Une recalibration des paramètres des modèles avec des données de fermentations avec ajouts à 35 et 50 g/L devrait être réalisée pour améliorer les capacités de prédiction des modèles dans ces conditions.

V.A.2. Prédiction des valeurs de V_{max} et de t_{max}

La valeur maximale de la vitesse spécifique de dégagement de CO_2, notée V_{max}, et le temps auquel V_{max} est atteint, noté t_{max}, sont des paramètres importants de la fermentation alcoolique en conditions œnologiques. En effet, si la fermentation est réalisée à température constante, la concentration initiale en azote peut être déduite de V_{max} ce qui permet de déterminer la nécessité ou non d'effectuer un ajout d'azote et la concentration en azote à ajouter. En

effet, le profil aromatique dépend de la quantité ajoutée (impact de l'azote sur le métabolisme des arômes) et, afin de prédire le profil aromatique final, le modèle doit pouvoir prendre en compte ce phénomène et permettre d'estimer la quantité d'azote à ajouter. Cependant à l'échelle industrielle, V_{max} est rarement connue car elle est difficilement mesurable, notamment par manque d'équipements. Une valeur de t_{max} trop élevée en fonction des conditions de fermentation, peut être un marqueur d'une fermentation lente ou bloquée. Dans les cas des fermentations faites avec ajout d'azote en cours de fermentation, la vitesse de dégagement de CO_2 réaugmente après l'ajout d'azote pour atteindre une deuxième V_{max} à un deuxième temps t_{max}. Dans cette partie, V_{max} et t_{max} sont notés V_{max1} et t_{max1} pour la première phase de croissance (en début de fermentation) et V_{max2} et t_{max2} pour la deuxième phase de croissance (après l'ajout d'azote).

Les modèles 1 et 2 sont donc comparés sur la prédiction de V_{max} et de t_{max} pour les deux phases de croissance (au début de la fermentation et après l'ajout d'azote).

V.A.2.a) Fermentations de calibration

Le Tableau IV.25 présente les valeurs expérimentales et prédites de V_{max} et de t_{max} et le Tableau IV.26 les écarts des valeurs de Vmax et de tmax prédites par les modèles 1 et 2 aux données expérimentales pour les quatre fermentations de calibration. Pour les deux modèles, les valeurs prédites de V_{max} et de t_{max} sont assez proches des valeurs expérimentales avec une moyenne et une médiane des écarts respectivement de 6,6% et 3,0% pour le modèle 1 et de 9,7% et 8,6% pour le modèle 2. Les valeurs de V_{max} et de t_{max} prédites par les modèles 1 et 2 sont plus proches des données expérimentales pour la première phase de croissance que pour la deuxième phase de croissance. Les plus forts écarts sont obtenus pour l'estimation de la valeur de V_{max2} de la fermentation MS70+100 avec des écarts maximaux de 19,0 et 26,3% respectivement pour les modèles 1 et 2. La calibration des modèles permet donc de bien décrire ces grandeurs caractéristiques de la fermentation œnologique pour les données de calibration. Même si les deux modèles présentent de bonnes capacités de prédiction des valeurs de V_{max} et de t_{max}, le modèle 1 est légèrement meilleur que le modèle 2 puisqu'il présente des écarts majoritairement plus faibles.

Tableau IV.25 Valeurs des V_{max} et t_{max} pour les données expérimentales et prédites par les modèles 1 et 2.

Fermentation		V_{max1}	t_{max1}	V_{max2}	t_{max2}
MS210+100	Expérimental	1,636	25,38	1,819	38,05
	Modèle 1	1,656	24,529	2,011	38,277
	Modèle 2	1,704	23,660	2,056	36,628
MS140+150	Expérimental	1,112	25,19	1,818	55,19
	Modèle 1	1,110	24,501	1,920	44,933
	Modèle 2	1,114	22,565	1,896	43,465
MS140+50	Expérimental	1,113	25,18	1,436	42,51
	Modèle 1	1,110	24,501	1,217	41,631
	Modèle 2	1,140	22,564	1,272	40,833
MS70+100	Expérimental	0,472	24,926	1,280	91,774
	Modèle 1	0,550	26,154	1,037	90,312
	Modèle 2	0,569	21,154	0,943	90,419

Tableau IV.26 Ecarts des valeurs de V_{max} et t_{max} entre les données prédites par les modèles 1 et 2 et les données expérimentales en pourcentage.

Fermentation		V_{max1}	t_{max1}	V_{max2}	t_{max2}
MS210+100	Modèle 1	1,241%	-3,353%	10,536%	0,597%
	Modèle 2	4,175%	-6,778%	13,006%	-3,736%
MS140+150	Modèle 1	-0,157%	-2,737%	5,617%	-18,584%
	Modèle 2	2,476%	-10,423%	4,298%	-21,244%
MS140+50	Modèle 1	-0,246%	-2,698%	-15,247%	-2,067%
	Modèle 2	2,384%	-10,387%	-11,419%	-3,945%
MS70+100	Modèle 1	16,500%	4,926%	-18,973%	-1,593%
	Modèle 2	20,367%	-12,431%	-26,313%	-1,476%

V.A.2.b) Fermentations de validation

La même analyse des valeurs de V_{max} et t_{max} prédites par les modèles a été réalisées avec les données des seize fermentations de validation.

Ces données ont été générées lors d'un plan d'expérience de type Box Benkhen avec 3 facteurs à 3 niveaux. Le point central a été réalisé en quadruplicat afin d'estimer l'écart-type expérimental. Le Tableau IV.27 montre les moyennes et les écart-types des valeurs expérimentales et prédites par les modèles 1 et 2 de V_{max} et de t_{max} pour les deux phases de croissance pour ce point central (concentration initiale en azote de 140 mg/L, concentration en azote ajouté de 100 mg/L et ajout réalisé pour un CO_2 dégagé de 35g/L).

Pour les données expérimentales, les écart-types sont faibles et permettent de calculer des intervalles de confiance de 0,043g/L.h, 0,31h, 0,023 g/L.h et 1,32 h pour respectivement V_{max1}, t_{max1}, V_{max2} et t_{max2}. La fluctuation des valeurs reste inférieure à 4% de la valeur moyenne. Les fermentations sont donc reproductibles. Une même gamme de variation peut être supposée valable pour les valeurs obtenues pour les fermentations du plan de Box-Benkhen non répétées.

Un écart-type non nul est observé pour les valeurs prédites par les deux modèles de V_{max} et de t_{max} pendant la deuxième phase de croissance car les ajouts d'azote n'ont pas été réalisés expérimentalement aux mêmes temps (ajouts faits pour un temps de fermentation de 57,88 à 58,83 heures) ce qui explique la plus forte variabilité des valeurs de V_{max2} et de t_{max2}.

Pour la première phase de croissance, les moyennes des valeurs de V_{max} prédites par les modèles 1 et 2 sont comprises dans l'intervalle de confiance de la moyenne expérimentale ce qui n'est pas le cas des moyennes des valeurs de t_{max}, qui sont légèrement supérieures.

Pour la deuxième phase de croissance, la valeur moyenne de t_{max} prédite par les modèles 1 et 2 sont comprises dans la marge d'erreur expérimentale alors que la valeur moyenne de V_{max} prédite par les modèles 1 et 2 ne sont pas comprises dans la marge d'erreur expérimentale mais restent cependant assez proches de la valeur expérimentale.

Les modèles 1 et 2 présentent donc une assez bonne capacité de prédiction des valeurs de V_{max} et de t_{max} pour les deux phases de croissance pour le quadruplicat.

Tableau IV.27 Moyenne et écart-type des valeurs expérimentales et prédites par les modèles 1 et 2 de V_{max} et de t_{max} pour les deux phases de croissance pour le point central du plan d'expérience (concentration initial en azote de 140 mg/L, concentration en azote ajouté de 100 mg/L et ajout réalisé pour un CO_2 dégagé de 35 g/L) réalisé en quadruplicat.

		V_{max1}	t_{max1}	V_{max2}	t_{max2}
Expérimental	Moyenne	1,097	21,15	1,399	68,003
	Ecart-type	0,0440	0,319	0,0237	1,345
Modèle 1	Moyenne	1,110	24,501	1,314	67,716
	Ecart-type	0	0	0,00552	0,592
Modèle 2	Moyenne	1,140	22,564	1,193	67,030
	Ecart-type	0	0	0,00833	0,595

Les Figure IV.36, Figure IV.37, Figure IV.38 et Figure IV.39 comparent les valeurs de V_{max} et de t_{max} expérimentales et prédites par les modèles 1 et 2 pour les deux phases de croissance (en début de fermentation et après ajout d'azote) pour les seize fermentations de validation. Les capacités de prédiction des modèles 1 et 2 sont variables en fonction des conditions expérimentales. Pendant la première phase de croissance, les modèles 1 et 2 surestiment légèrement V_{max} et fortement t_{max}. Pendant la deuxième phase de croissance, les modèles 1 et 2 sous-estiment V_{max} et t_{max} pour la majorité des fermentations.

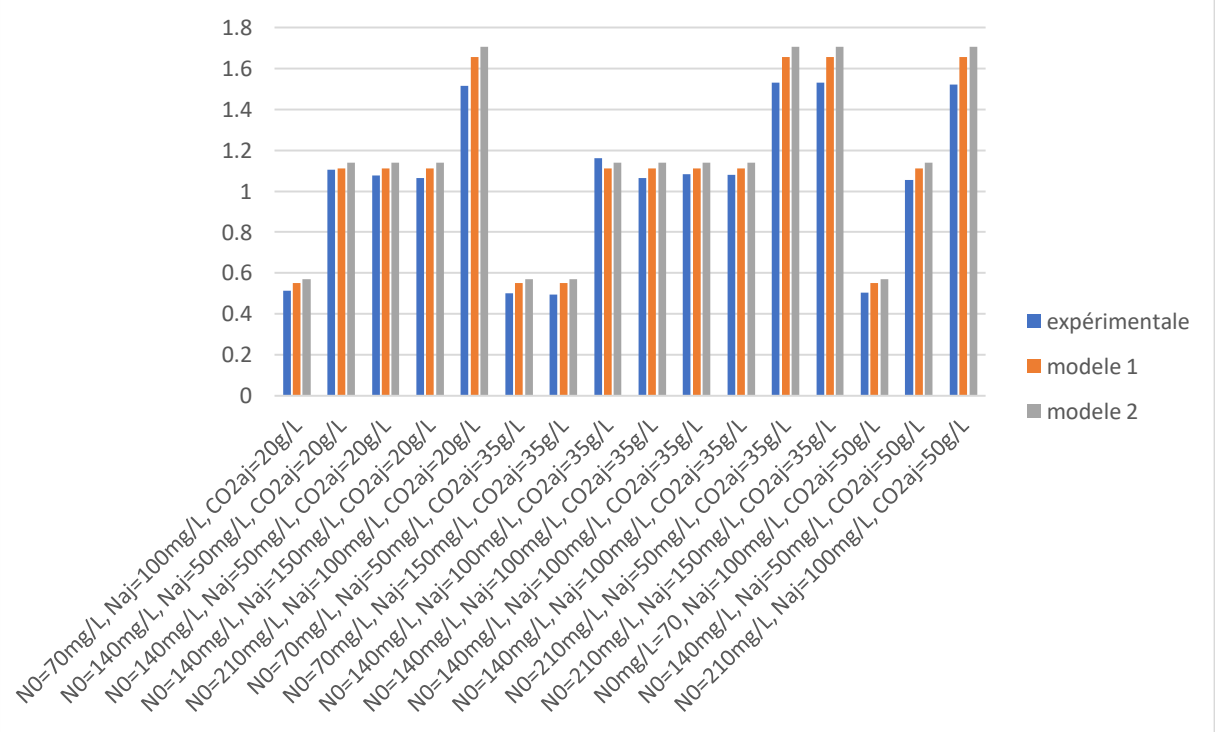


Figure IV.36 Valeurs expérimentales (en bleu) et prédites par les modèles 1 (en orange) et 2 (en gris) de V_{max} pendant la première phase de croissance pour les seize fermntations de validation.

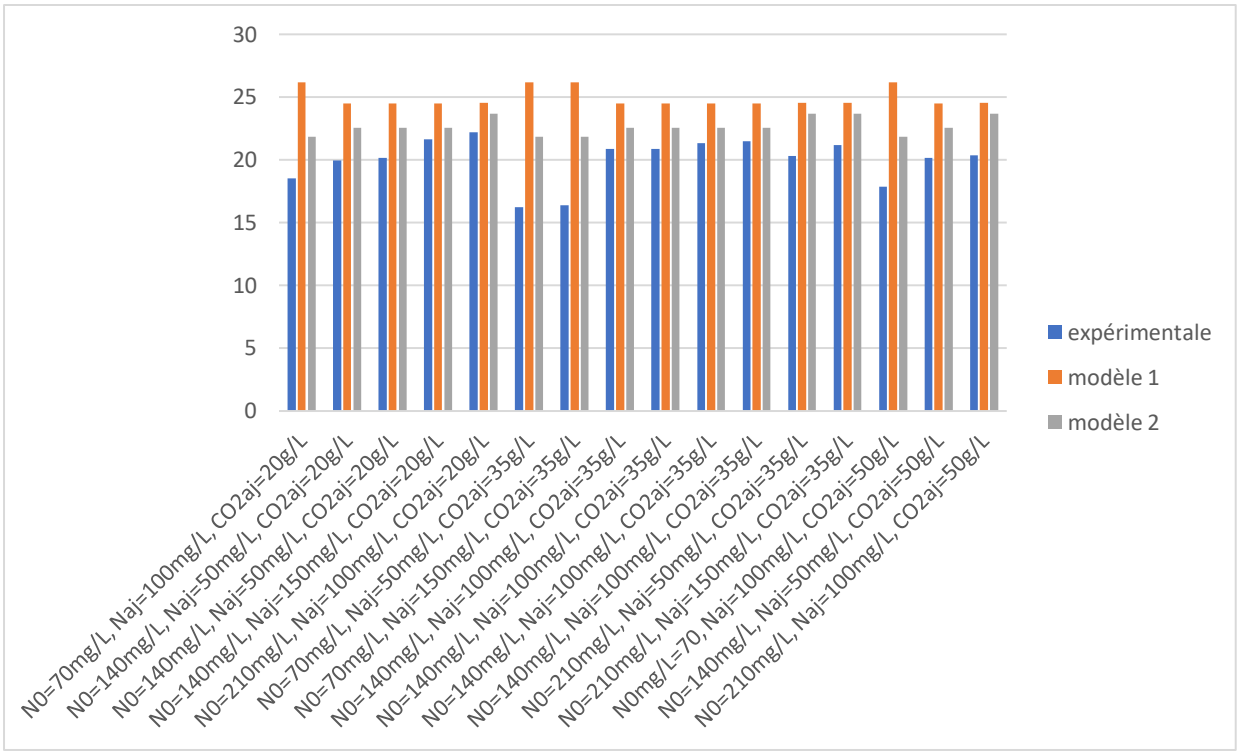


Figure IV.37 Valeurs expérimentales (en bleu) et prédites par les modèles 1 (en orange) et 2 (en gris) de t_{max} pendant la première phase de croissance pour les seize fermntations de validation.

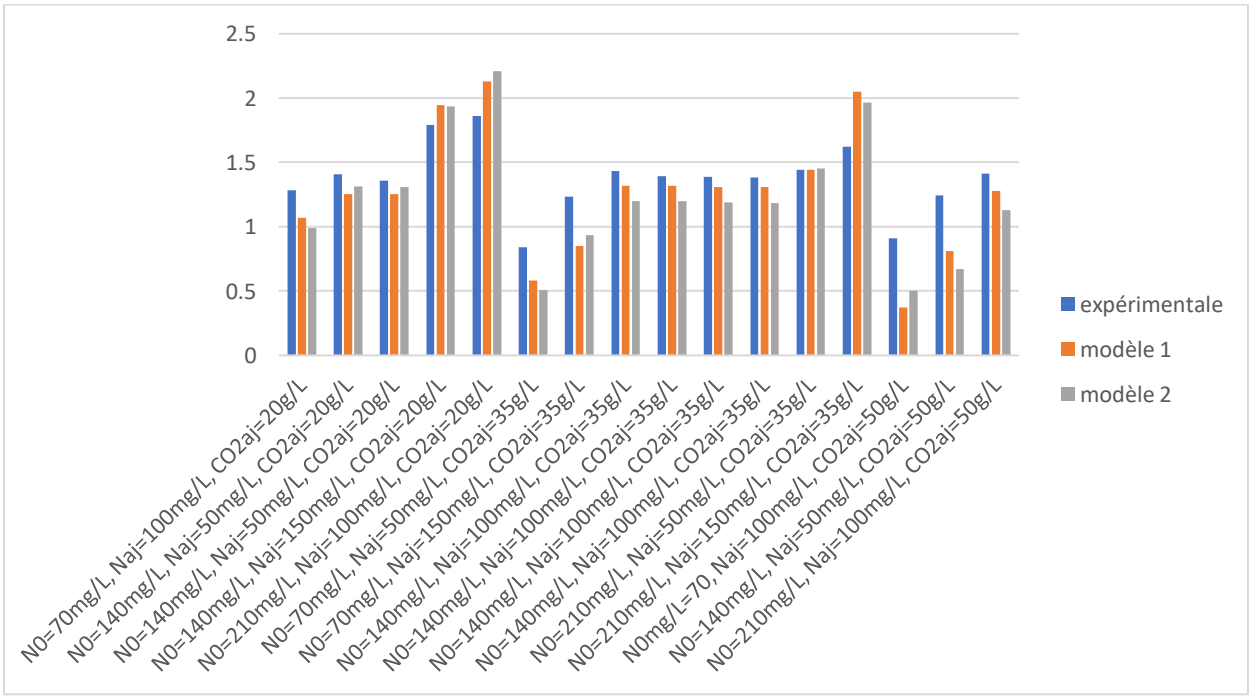


Figure IV.38 Valeurs expérimentales (en bleu) et prédites par les modèles 1 (en orange) et 2 (en gris) de V_{max} pendant la deuxième phase de croissance pour les seize fermntations de validation.

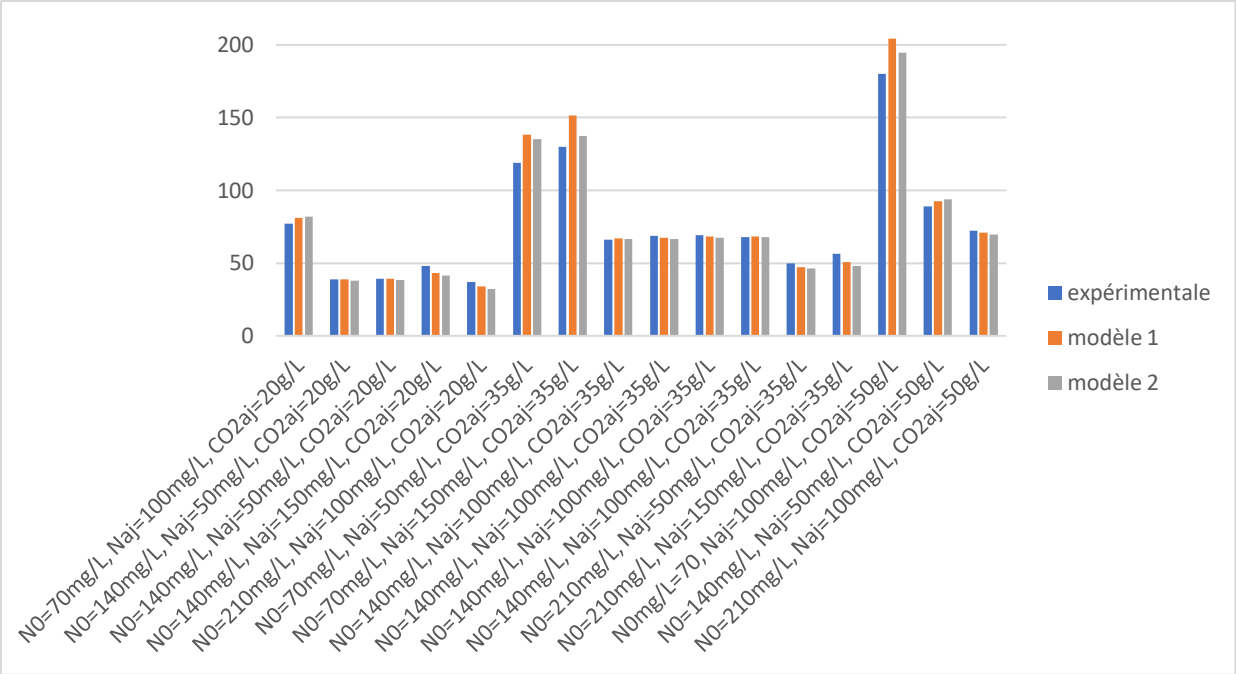


Figure IV.39 Valeurs expérimentales (en bleu) et prédites par les modèles 1 (en orange) et 2 (en gris) de tmax pendant la deuxième phase de croissance pour les seize fermntations de validation.

La moyenne de l'écart relatif des valeurs prédites par les modèles 1 et 2 aux valeurs expérimentales de V_{max} et de t_{max} a été calculée pour les deux phases de croissance (cf. Tableau IV.28). Les moyennes sont calculées pour toutes les fermentations et pour chaque valeur prise par les conditions expérimentales (concentration initiale en azote, concentration en azote ajouté et CO_2 produit à l'ajout d'azote). Pour la concentration en azote ajouté et le CO_2 produit à l'ajout d'azote, la moyenne n'est pas calculée pour la première phase de croissance car l'ajout d'azote est réalisé après.

Les modèles 1 et 2 estiment globalement bien les valeurs de $V_{max\ 1}$ et t_{max2} en restant proche de l'intervalle de confiance défini sur le réplicat. Par contre les valeurs de t_{max1} et V_{max2} sont moins bien estimées.

Pendant la première phase de croissance, les modèles 1 et 2 surestiment les valeurs de V_{max} pour quinze des seize fermentations (cf. Figure IV.36 et Tableau IV.28). Les capacités de prédiction de V_{max} des modèles 1 et 2 sont équivalentes (écart relatif à la valeur expérimentale de 6,218% et de 8,956% pour les modèles 1 et 2 respectivement). V_{max} est mieux prédite pour une concentration initiale en azote moyenne avec un écart relatif à la valeur expérimentale de 9,345%, de 3,421% et de 8,683% pour le modèle 1 et de 12,973% de 5,4885% et de 11,832% pour le modèle 2 pour une concentration initiale en azote de 70, 140 et de 210 mg/L respectivement, ce qui pourrait s'expliquer par le fait que ces conditions d'azote initial représentent la moitié des données expérimentales utilisées pour la calibration. Les modèles surestiment (cf. Figure IV.37 et Tableau IV.26) tous les deux les valeurs de t_{max} (écart relatif à la valeur expérimentale de 26,613% et de 14,172% pour les modèles 1 et 2 respectivement) et prédisent moins bien la valeur de t_{max} pour une concentration initiale en azote faible (écart relatif à la valeur expérimentale de 52,074%, de 17,840% et de 16,879% pour le modèle 1 et de 26,918% de 8,507% et de 12,755% pour le modèle 2 pour une concentration initiale en azote de 70, 140 et de 210 mg/L respectivement).

Pendant la deuxième phase de croissance, les modèles 1 et 2 sous-estiment la valeur de V_{max} (cf. Figure IV.38 et Tableau IV.28) pour douze fermentations sur seize (les modèles 1 et 2 surestiment la valeur de V_{max} uniquement pour les fermentations MS140+150_20, MS210+100_20, MS210+50_35 et MS210+150_35). Le modèle 1 est légèrement meilleur que le modèle 2 pour la prédiction de la valeur de V_{max} (écart relatif de 17,152% contre 19,264% respectivement). Le modèle 2 prédit mieux V_{max} pour une concentration en azote ajouté moyenne (valeur de NRMSE de 19,3%, 9,8% et de 17,8% pour une concentration en azote ajouté de 50, 100 et 150 mg/L respectivement). Une concentration élevée en azote ajouté diminue la capacité de prédiction du modèle 1 (écart relatif à la valeur expérimentale de 16,906%, de 15,486% et de 22,002% pour une concentration en azote ajouté de 50, 100 et 150 mg/L respectivement). Les capacités de prédiction des modèles pour la valeur du V_{max} sont également impactées par le timing d'ajout de l'azote. Plus celui-ci est tardif et moins les prédictions sont bonnes

car les modèles 1 et 2 ont été calibrés avec des fermentations avec un ajout d'azote précoce : écart relatif à la valeur expérimentale de 11,749% de 14,029% et de 34,482% pour le modèle 1 et de 11,977%, de 17,121% et de 37,125% pour le modèle 2 pour un CO_2 dégagé de 20, 35 et de 50 g/L respectivement. Les modèles 1 et 2 surestiment la valeur de t_{max} pour respectivement sept et cinq fermentations. Ils présentent un écart relatif à la valeur expérimentale plus important pour une concentration importante d'azote ajouté (écart relatif à la valeur expérimentale de 5,079% de 4,294% et de 12,612% pour le modèle 1 et de 5,974%, de 4,724% et de 11,364% pour le modèle 2 pour une concentration d'azote ajouté de 50, 100 et de 150 mg/L). Enfin, le timing d'ajout d'azote a un effet très faible sur la capacité de prédiction des modèles 1 et 2 sur la valeur de t_{max}.

Tableau IV.28 Moyenne de l'écart relatif des valeurs prédites par les modèles 1 et 2 aux valeurs expérimentales de V_{max} et de t_{max} pour les deux phases de croissance. La moyenne est calculée pour toutes les fermentations et pour chaque valeur prise par les conditions expérimentales (concentration initiale en azote, concentration d'azote ajouté et CO_2 produit à l'ajout d'azote). Les valeurs ne sont pas indiquées pour la première phase de croissance et pour l'azote ajouté car l'ajout d'azote est effectué après la première phase de croissance.

		V_{max1}		t_{max1}		V_{max2}		t_{max2}	
		Modèle 1	Modèle 2	Modèle 1	Modèle 2	Modèle 1	Modèle 2	Modèle 1	Modèle 2
Global		6,2%	8,9%	26,2%	14,2%	17,2%	19,3%	6,1%	6,4%
N_0 (mg/L)	70	9,3%	13,0%	52,1%	26,9%	4,3%	32,9%	12,8%	8,3%
	140	3,4%	5,5%	17,8%	8,5%	10,8%	14,5%	2,6%	3,7%
	210	8,7%	11,8%	16,9%	12,8%	12,6%	15,6%	6,4%	9,7%
N_{aj} (mg/L)	50	-	-	-	-	16,9%	19,3%	5,1%	6,0%
	100	-	-	-	-	15,5%	9,8%	4,3%	4,7%
	150	-	-	-	-	22,0%	17,8%	12,6%	11,4%
CO_{2aj} (g/L)	20	-	-	-	-	11,7%	12,0%	4,8%	7,3%
	35	-	-	-	-	14,0%	17,1%	6,4%	6,0%
	50	-	-	-	-	34,5%	37,1%	6,3%	5,7%

V.A.3. Choix du modèle

Dans cette partie, deux modèles isothermes de la cinétique principale ont été construits et calibrés à partir des données de quatre fermentations isothermes (24°C) dans lesquelles les concentrations initiales en azote et les concentrations en azote ajouté sont différentes mais l'ajout d'azote a été réalisé quand le CO_2 dégagé atteint 20 g/L. Ces modèles ont été validés avec les données de seize fermentations isothermes (24°C) avec des concentrations initiales en azote, des concentrations en azote ajouté et des timings d'ajouts d'azote différents. Le modèle 1 présente une meilleure adéquation aux données expérimentales pour le CO_2 produit et la vitesse de dégagement de CO_2 que le modèle 2 pour les fermentations de calibration et de validation. De plus, le modèle 2 est plus sensible aux variations des valeurs des paramètres que le modèle 1 (le modèle 2 diverge pour deux paramètres). Enfin, le modèle 1 prédit mieux des valeurs de V_{max} et de t_{max} pour les deux phases de croissance pour les fermentations de validation et de calibration que le modèle 2. Le modèle 1 sera donc utilisé dans la suite de cette thèse.

V.B. Intégration de l'effet de la température

Les deux modèles construits ont été calibrés et validés avec des fermentations isothermes réalisées à 24°C. Or les fermentations alcooliques en conditions œnologiques sont réalisées pour des températures comprises entre 18°C et 30°C (autour de 20°C pour les vins blancs et entre 25 et 30°C pour les vins rouges) avec des variations de température pendant la fermentation (Penot, 2021).

La température a été intégrée dans le modèle choisi en nous basant sur les quinze fermentations isothermes réalisées à trois températures différentes et utilisées également pour la calibration du modèle de production des arômes. Ces fermentations présentent des données de CO_2 et de r_{CO2} au cours du temps, et seulement les concentrations initiales en biomasse, azote et sucre ainsi que la concentration en azote ajouté ; les cinétiques de croissance de la biomasse et de consommation de l'azote ne sont donc pas disponibles.

La température est déjà intégrée dans l'équation de la biomasse : le paramètre k_1, correspondant au taux de croissance maximal, est de la forme $k_1 = \alpha_{k1}T - \beta_{k1}$. Cette relation provient du modèle de Malherbe et al. (2004). Les paramètres de cette équation n'ont pas été recalibrés car aucune donnée de biomasse n'est disponible pour des conditions différentes de température.

V.B.1. Equations cinétiques du sucre et des transporteurs

Les huit paramètres des équations du sucre (k_2, K_S, K_{SI} et α_S, cf. eq 10 de la publication) et des transporteurs (k_{nst}, k_{dnst}, K_{nst} et Q_{0nst}, cf. eq 13 de la publication) ont été calibrés pour chaque condition de température et les valeurs obtenues sont présentées dans le Tableau IV.29.

Tableau IV.29 Valeurs des paramètres des équations du sucre et des transporteurs après calibration pour chaque condition de température

Paramètres	18°C	23°C	28°C
k_2	0,02625	0,034725	0,052757
K_S	30	30	29,8832
K_{SI}	0,013446	0,005004	0,005001
α_S	1,1924	1,2923	1,2459
k_{nst}	1,3125	0,72182	0,50182
k_{dnst}	1,2498	2,6265	1,4821
K_{nst}	16,2239	13,239	12,6431
Q_{0nst}	0,000157	0,000123	0,000129

Les Figure IV.40 et Figure IV.41 montrent qu'il existe une relation quadratique entre les coefficients k_2 (vitesse spécifique de consommation du sucre) et k_{nst} (vitesse spécifique de production des transporteurs de sucre) et la température :

- k_2 augmente quand la température augmente. C'est en accord avec la physiologie des levures car dans la gamme de température considérée, l'activité des enzymes impliquées dans la dégradation du sucre augmente avec la température (Furukawa et al., 1998).

$$k_2 = 2.10^{-4}T^2 - 6{,}1.10^{-3}T + 7{,}49.10^{-2} \qquad (IV.1)$$

- k_{nst} diminue quand la température augmente.

$$k_{nst} = 7{,}4.10^{-3}T^2 - 4{,}22110^{-3}T + 6.5082 \qquad (IV.2)$$

Les six autres paramètres ne présentent pas de variation importante avec la température et seront laissés constants.

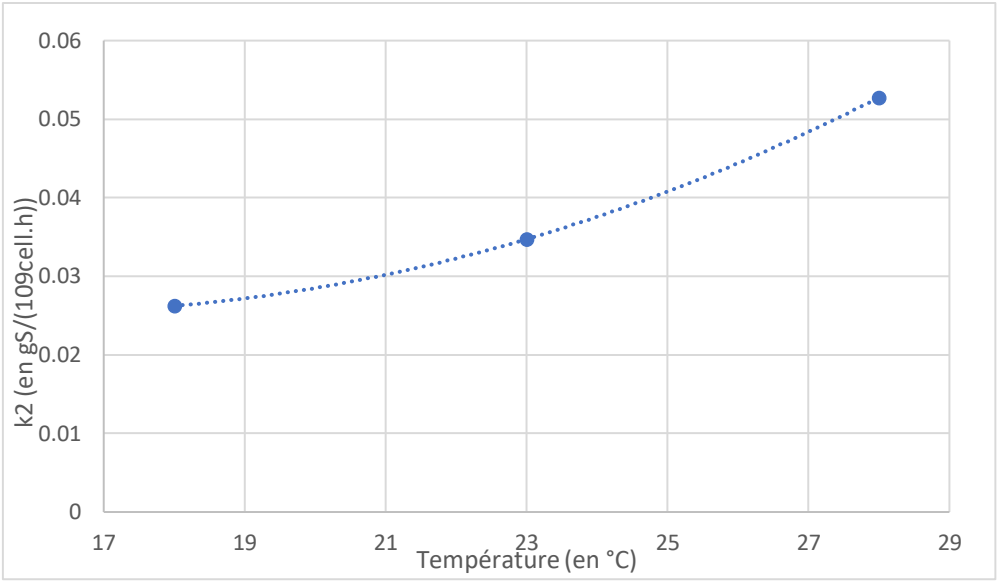


Figure IV.40 Variation de la valeur de k_2 en fonction de la température

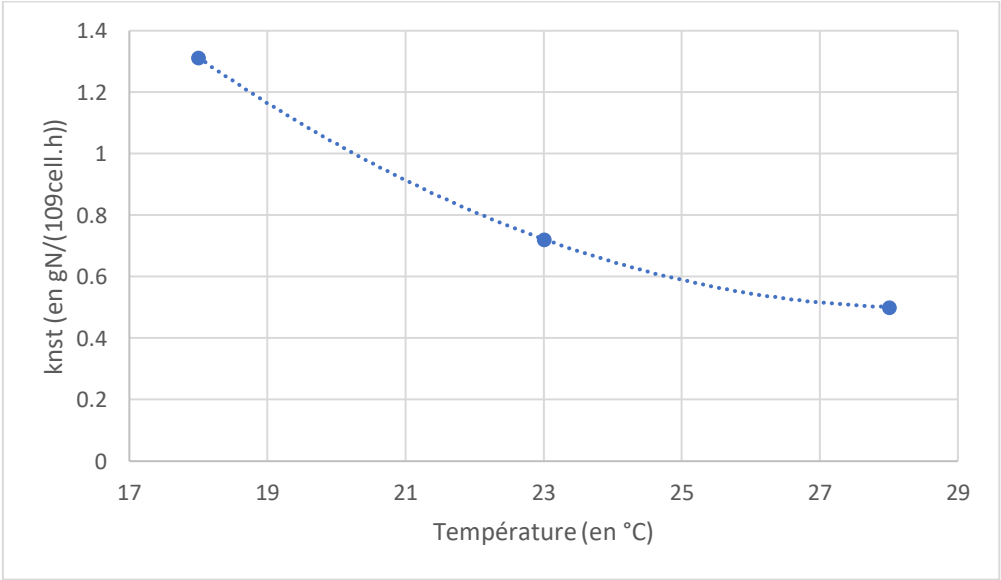


Figure IV.41 Variation de la valeur de k_{nst} avec la température

Une calibration des six paramètres non-dépendants de la température et des paramètres des relations quadratiques pour k_2 et k_{nst} (cf. eq IV.1 et IV.2) a été réalisée en utilisant simultanément les quinze fermentations balayant toutes les conditions de température.

Les valeurs des paramètres sont données dans le Tableau IV.30. Le modèle de Malherbe et al. (2004), calibré à 24°C, présente des valeurs proches pour k_2 et α_S : 0,035 et 1,25 respectivement pour le modèle de Malherbe et 0,0353 à 24°C et 1,29 respectivement pour le modèle développé. La valeur du paramètre K_S (30 g/L) est deux fois plus forte que celle calibrée par Malherbe et al. (2004) (15g/L) ; le modèle développé prend donc en compte une affinité plus faible pour le substrat et la vitesse spécifique de consommation du sucre diminue plus rapidement quand le sucre est consommé. Cette augmentation de la valeur de la constante d'affinité K_s est compensée par une diminution de l'inhibition par l'éthanol avec une valeur de K_{SI} (inhibition par l'éthanol) (0,0046 $(L/g)^{\alpha S}$) qui est 2,6 fois plus faible que celle calibrée par Malherbe et al. (2004) (0,012 $(L/g)^{\alpha S}$) ; la vitesse spécifique de consommation du sucre diminue alors plus doucement avec l'augmentation de la concentration en éthanol. Dans la bibliographie, il n'existe pas de valeurs de comparaison pour les paramètres de l'équation des transporteurs de sucre. Les valeurs, calibrées à 24°C, des paramètres présentées dans la publication (cf. paragraphe 4.1 Models

calibration) serviront de valeur de comparaison aux valeurs recalibrées : les valeurs de k_{dnst}, K_{nst} et Q_{0nst} ont peu varié (valeur de 1,987, de 10,76 et de 0,0001334 respectivement dans la publication) mais la valeur de k_{nst} a été presque divisée par deux (1,0024 dans la publication contre 0,6769 pour ce modèle à 24°C).

Tableau IV.30 Valeurs des paramètres des équations du sucre et des transporteurs

Paramètres	Valeurs
k_2	$2{,}04.10^{-4} * T^2 - 6{,}12.10^{-3} * T + 6{,}46.10^{-2} (IV.3)$
k_{nst}	$7{,}45.10^{-3} * T^2 - 4{,}27.10^{-1} * T + 6{,}63 \quad (IV.4)$
K_S	30,0
K_{SI}	$4{,}66.10^{-3}$
α_S	1,29
k_{dnst}	1,97
K_{nst}	12,14
Q_{0nst}	$1{,}23.10^{-4}$

V.B.2. Equation cinétique de l'azote

Le paramètre k_3 de l'équation de l'azote (cf. eq 14 de la publication) a été recalibré de manière indirecte car aucune des quinze fermentations utilisées ne présente de données sur la cinétique de la consommation d'azote. Cependant, k_3 peut être calibré par rapport aux données de production de CO_2 et de la vitesse de production r_{CO2} car le dégagement de CO_2 est proportionnel à l'activité cellulaire pendant la majorité de la fermentation et la carence en azote est le principal facteur limitant l'activité cellulaire.

Les valeurs de k_3 (vitesse spécifique de consommation de l'azote) ont été calibrées pour chaque condition de température et nous avons pu montrer qu'il existe une relation quadratique entre k_3 et la température (cf. Figure IV.42). k_3 augmente avec la température ce qui est en accord avec la physiologie des levures car l'activité des enzymes du métabolisme de l'azote augmente avec la température dans la gamme de température considérée (Furukawa et al., 1998).

L'effet de la température sur la cinétique de consommation de l'azote sera donc pris en compte en faisant varier la valeur de k_3 (vitesse spécifique de consommation de l'azote) suivant l'équation IV.5.

$$k_3 = 2.10^{-6}T^2 - 8.10^{-5}T + 1{,}9.10^{-3} \qquad (IV.5)$$

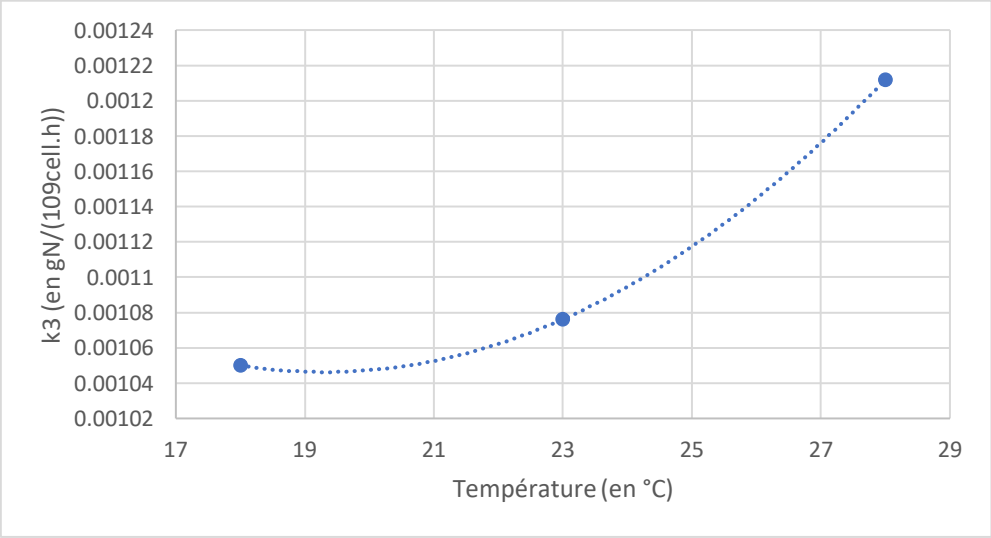


Figure IV.42 Relation entre k_3 et la température

Les 3 paramètres de la relation quadratique entre k_3 et la température ont été calibrés en utilisant l'ensemble des conditions de température et nous avons obtenu la relation suivante :

$$k_3 = 2{,}009.10^{-6} * T^2 - 8{,}2177.10^{-5} * T + 1{,}9034.10^{-3} \qquad (IV.6)$$

V.B.3. Activité cellulaire

La variation de l'activité cellulaire (cf. eq 1 de la publication) dépend de deux termes : un terme d'augmentation fonction du taux de croissance et un terme de diminution correspondant au turn-over des enzymes et à la perte d'activité dû aux stress environnementaux. Le taux de croissance maximal k_1 étant fonction de la température, l'effet de celle-ci est déjà pris en compte dans le terme d'augmentation de l'activité cellulaire. L'effet de la température est introduit dans le terme de diminution de l'activité cellulaire représenté par le paramètre κ.

κ a été calibré indépendamment pour les trois conditions de température et les valeurs obtenues montrent l'existence d'une relation linéaire entre κ et la température (cf. Figure IV.43). κ augmente avec la température ce qui est cohérent avec la bibliographie car à faible température l'activité cellulaire diminue moins vite du fait des stress environnementaux (notamment la concentration en éthanol) que pour une température élevée.

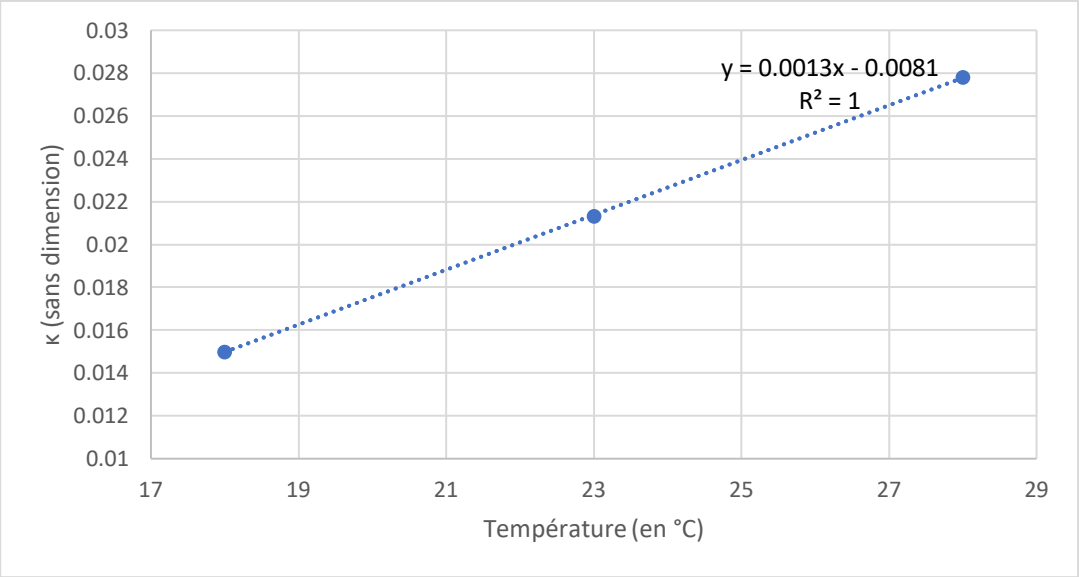


Figure IV.43 Relation entre κ et la température

Après calibration des deux paramètres de la relation linéaire entre κ et la température pour toutes les conditions de température, nous avons obtenu la relation :

$$\kappa = 1{,}2668.10^{-3} * T - 7{,}8394.10^{-3} \qquad (IV.7)$$

V.B.4. Analyse de la calibration du modèle

La Figure IV.44 présente les données expérimentales et simulées pour le triplicat, réalisé pour un azote initial de 140 mg/L, un ajout d'azote de 100 mg/L et une température de 23°C. Les données expérimentales de CO_2 produit et de la vitesse de dégagement de CO_2 présentent une variabilité faible et des cinétiques légèrement différentes après l'ajout d'azote. Les valeurs de V_{max} présentent des écarts-types de 0,00416 et de 0,0329 g/(L.h) pour les première et deuxième phases de croissance et les valeurs de t_{max} présentent des écarts-types de 1,642 et de 1,366 h pour les première et deuxième phases de croissance.

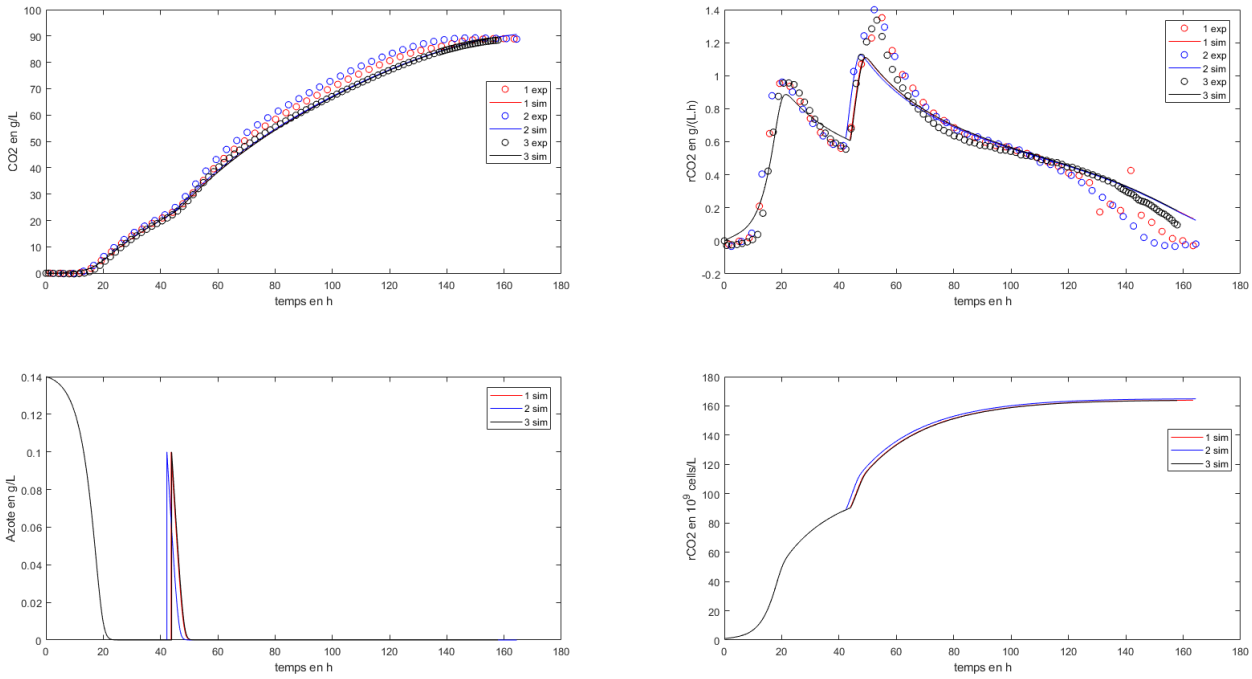


Figure IV.44 Simulations et données expérimentales pour le triplicat (23°C, azote initial 140 mg/L, ajout d'azote 100 mg/). Le CO_2 est représenté en haut à gauche, la vitesse de dégagement de CO_2 en haut à droite, la concentration en azote en bas à gauche et la concentration en biomasse en bas à droite.

Le Tableau IV.31 présente les écarts-types et les écarts relatifs par rapport à la moyenne pour les valeurs de V_{max} et de t_{max} pour les deux phases de croissance pour les fermentations du triplicat. Les écarts-types du triplicat sont du même ordre de grandeur que les écarts-types du quadruplicat des fermentations de validation des deux modèles de la cinétique principale ce qui montre que les données expérimentales sont reproductibles. Les écarts-types et les écarts relatifs du triplicat ne peuvent pas être généralisés aux quinze fermentations de calibration car les conditions expérimentales sont différentes mais ils donnent une indication pour analyser les capacités de prédiction du modèle.

Tableau IV.31 Ecarts-types et écarts relatifs par rapport à la moyenne pour les valeurs de V_{max} et de t_{max} pour le triplicat des fermentations de calibration.

	Ecart-type	Ecart relatif
V_{max1}	0,00416	0,320%
t_{max1}	1,642	5,893%
V_{max2}	0,0329	1,813%
t_{max2}	1,366	1,849%

Les Figure IV.45, Figure IV.46 et Figure IV.47 montrent les données expérimentales et calculées pour le CO_2 et le r_{CO2} ainsi que les données calculées pour la biomasse et l'azote pour les quinze fermentations utilisées pour la calibration. Graphiquement le modèle représente globalement bien le CO_2 mais présente une meilleure adéquation pour les fermentations avec une concentration initiale en azote de 140 ou de 210 mg/L et des températures de 23 ou 28 °C que pour les données expérimentales obtenues avec une concentration initiale en azote de 70 mg/L et pour une température de 18 °C (la fermentation la plus éloignée est avec une concentration initiale en azote de 70 mg/L, un ajout d'azote avec une concentration de 100 mg/L et une température de fermentation de 18°C). Les

valeurs de r_{CO2} calculées par le modèle suivent bien les valeurs expérimentales, cependant la valeur du V_{max} est sous-estimée après l'ajout d'azote pour les fermentations avec des concentrations faibles en azote (initiale et ajoutée). Ainsi, le modèle permet de décrire correctement la valeur de V_{max} pour les fermentations avec une concentration initiale en azote de 140 mg/L et un ajout d'azote de 150 mg/L ou avec une concentration initiale en azote de 210 mg/L et un ajout de 100 ou 150 mg/L.

Pour déterminer les performances du modèle, le coefficient RMSE normé a été calculé pour le CO_2 et le r_{CO2} pour toutes les fermentations (cf. Tableau IV.32).

Comme vu graphiquement, le modèle simule moins bien les fermentations avec une concentration initiale en azote faible : les valeurs moyennes de NRMSE sont environ 1,5 fois plus élevées pour les fermentations avec 70 mg/L d'azote initial que pour les autres conditions (0,0413, 0,0283 et 0,0275 pour le CO_2 et 0,0938, 0,0707 et 0,0651 pour le r_{CO2} pour respectivement une concentration initiale en azote de 70, 140 et 210 mg/L). De même les simulations des fermentations avec une température faible présentent des écarts plus importants aux données expérimentales que les simulations des fermentations à 23 et 28°C (valeur moyenne de 0,0419, 0,0300 et 0,0239 pour le CO_2 et de 0,0805, 0,0785 et 0,0648 pour le r_{CO2} pour des températures de 18, 23 et 28°C respectivement). Comme les Figure IV.45, Figure IV.46 et Figure IV.47 le montrent, la fermentation à 18°C avec une concentration initiale en azote de 70 mg/L et un ajout d'azote de 100 mg/L est la fermentation pour laquelle le modèle présente la moins bonne adéquation aux données expérimentales de CO_2 (valeur de NRMSE de 0,0571).

Le modèle permet donc une bonne représentation des données de CO_2 et de r_{CO2} des fermentations de calibration : pour le CO_2 les valeurs de NRMSE vont de 0,00910 à 0,0571 avec une valeur moyenne de 0,0316 et pour le r_{CO2} les valeurs de NRMSE vont de 0,0502 à 0,109 avec une valeur moyenne de 0,0754.

Tableau IV.32 Valeurs de NRMSE pour les fermentations de calibration

Fermentations			NRMSE	
N_0 (mg/L)	N_{aj} (mg/L)	T (°C)	CO_2	r_{CO2}
70	50	23	0,0441	0,109
70	100	18	0,0571	0,0848
70	100	28	0,0360	0,103
70	150	23	0,0280	0,0781
140	50	18	0,0312	0,0867
140	150	28	0,00981	0,05022
140	100	23	0,0290	0,0807
140	100	23	0,0465	0,0988
140	100	23	0,00910	0,0518
140	50	18	0,0448	0,0760
140	150	28	0,0275	0,0509
210	50	23	0,0172	0,0532
210	100	18	0,0343	0,0746
210	100	28	0,0223	0,0550
210	150	23	0,0364	0,0779

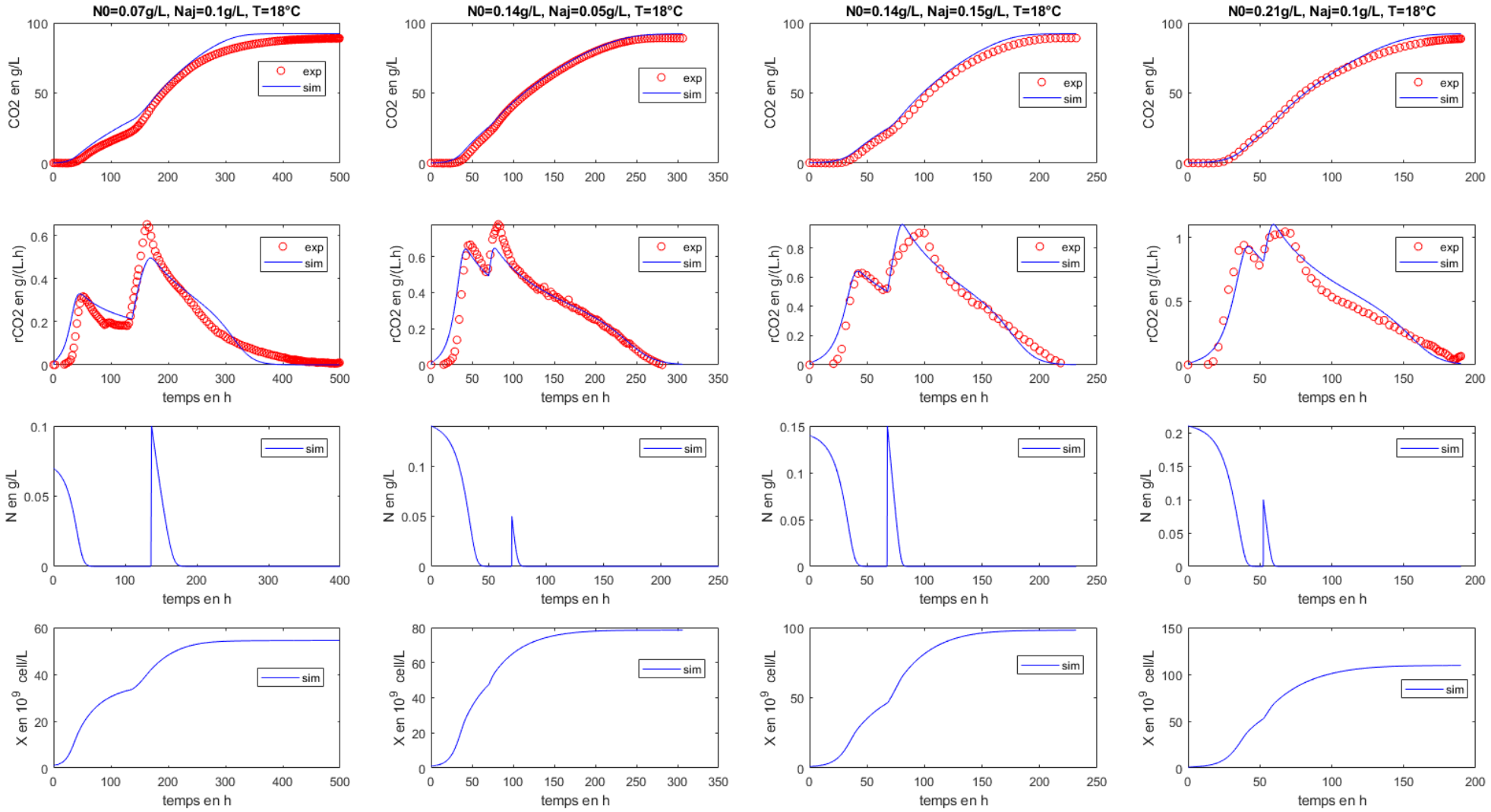


Figure IV.45 Simulations et données expérimentales des fermentations à 18°C. Sur la première ligne, le CO_2 est représenté ; sur la deuxième ligne, la vitesse de dégagement de CO_2 ; sur la troisième ligne, la concentration en azote et sur la quatrième ligne, la concentration en biomasse.

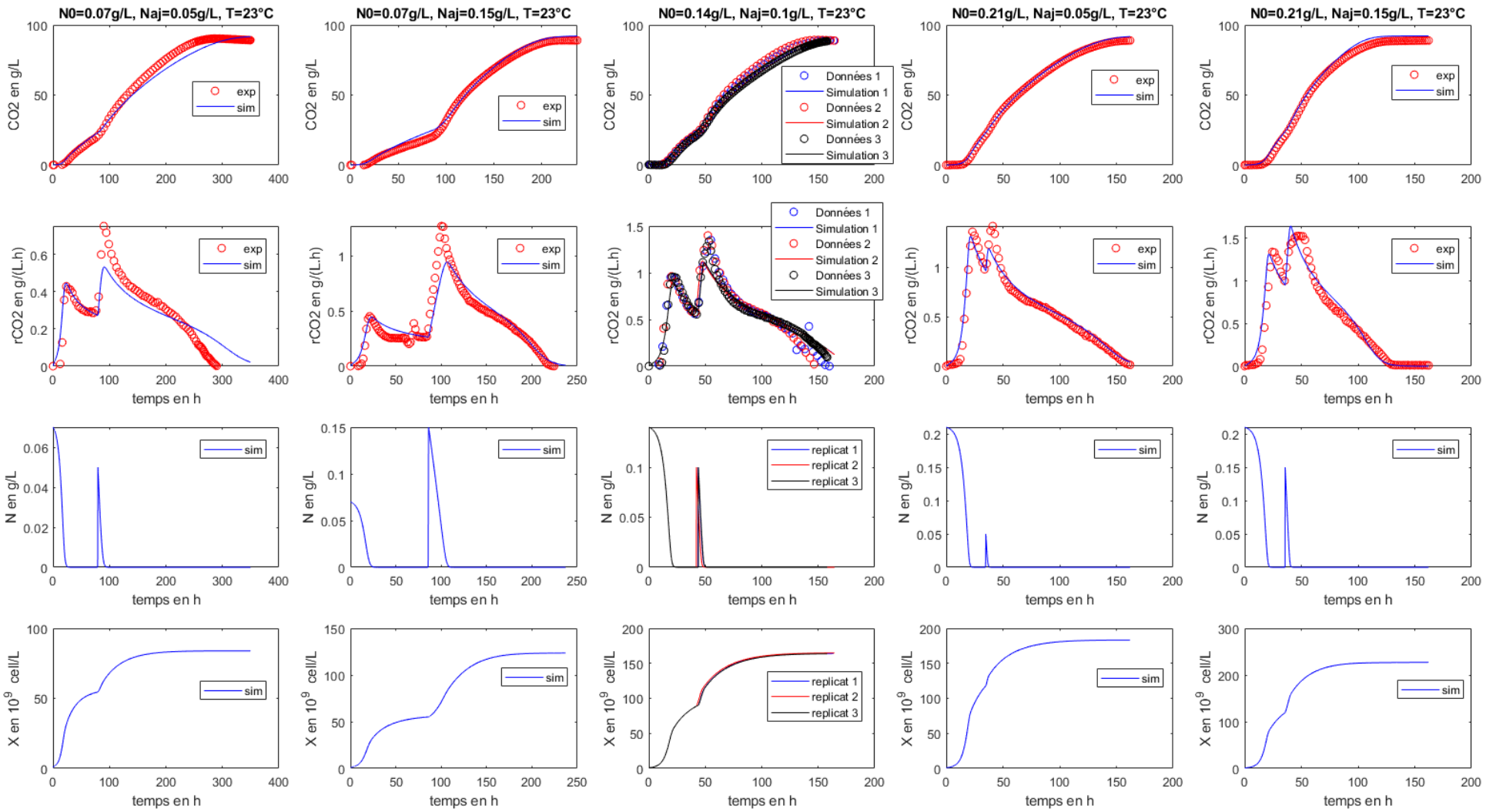


Figure IV.46 Simulations et données expérimentales pour les fermentations à 23°C. Sur la première ligne, le CO_2 est représenté ; sur la deuxième ligne, la vitesse de dégagement de CO_2 ; sur la troisième ligne, la concentration en azote et sur la quatrième ligne, la concentration en biomasse.

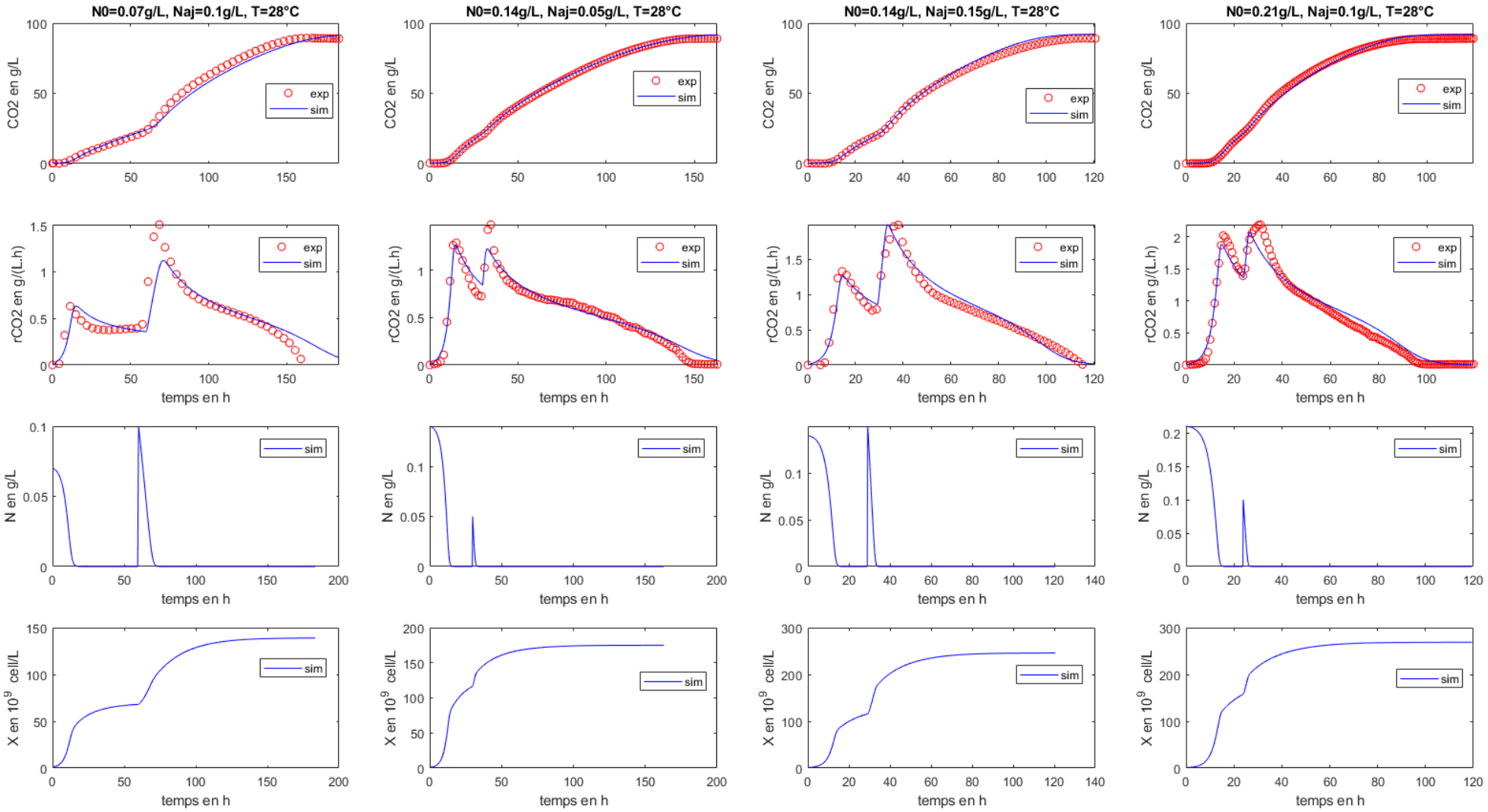


Figure IV.47 Simulations et données expérimentales pour les fermentations à 28°C. Sur la première ligne, le CO_2 est représenté ; sur la deuxième ligne, la vitesse de dégagement de CO_2 ; sur la troisième ligne, la concentration en azote et sur la quatrième ligne, la concentration en biomasse.

Les Figure IV.48, Figure IV.49, Figure IV.50 et Figure IV.51 présentent les valeurs de V_{max} et de t_{max} expérimentales et prédites par le modèle pour les quinze fermentations de calibration et les deux phases de croissance.

L'écart entre les valeurs de V_{max} expérimentales et prédites par le modèle est supérieur à l'écart-type du triplicat pour toutes les conditions expérimentales. Cet écart relatif est en moyenne de 3,781% en valeur absolue ce qui reste assez faible. Le modèle permet donc de bien représenter la valeur de V_{max} pendant la première phase de croissance.

Pendant la deuxième phase de croissance, l'écart relatif de la valeur prédite par le modèle à la valeur expérimentale pour V_{max} est en moyenne de 15,593%. Le modèle a tendance à sous-estimer la valeur de V_{max} (douze fermentations sur quinze) pour cette phase. Globalement le modèle reproduit assez bien la valeur de Vmax pendant la deuxième phase de croissance.

Les valeurs de t_{max} sont assez bien prédites par le modèle pendant les deux phases de croissance avec un écart moyen relatif de 8,969% pour la première phase de croissance et de 8,698% pour la deuxième en valeur absolue. Pour la première phase de croissance, l'écart entre les valeurs de t_{max} expérimentales et prédites par le modèle est supérieur à l'écart-type du triplicat pour toutes les fermentations. Pour la deuxième phase de croissance, le modèle sous-estime la valeur des t_{max} pour deux tiers des fermentations et surestime la valeur de t_{max} uniquement pour les fermentations avec une concentration initiale en azote de 70 mg/L. La fermentation MS70_100_28C présente un écart relatif important de 34,209% pour la première phase de croissance qui peut s'expliquer par une phase de latence très courte comparée aux autres fermentations réalisées à 18°C et donc une valeur de t_{max} faible. Pour l'ensemble des fermentations de calibration, les valeurs de t_{max} sont bien représentées par le modèle pour les deux phases de croissance.

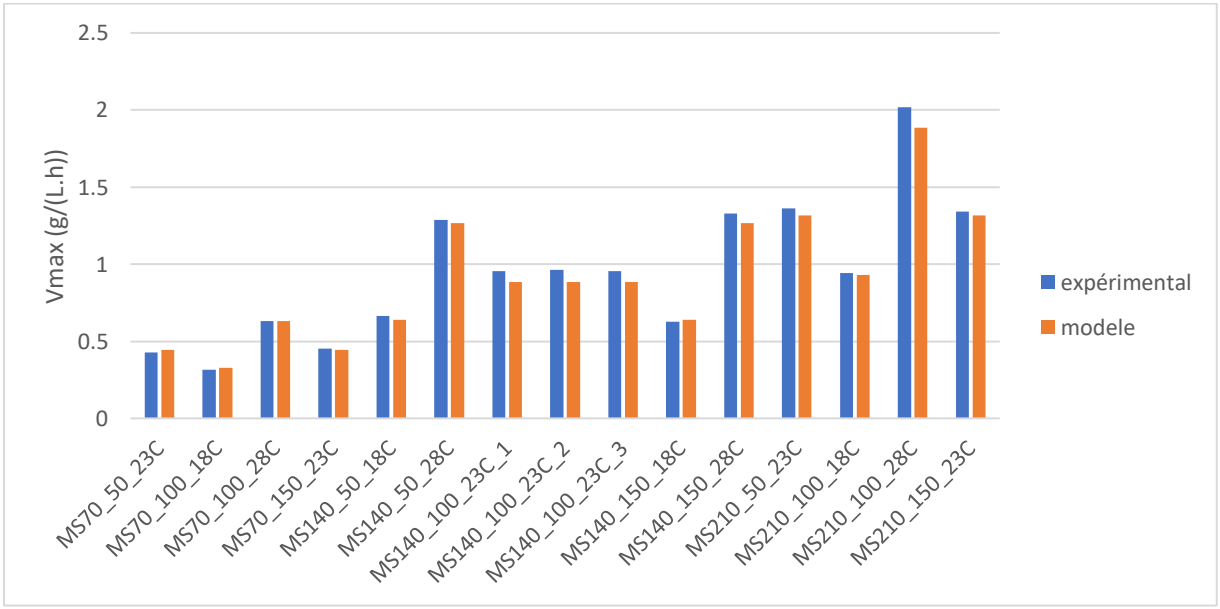


Figure IV.48 Valeurs expérimentales et prédites par le modèle pour le V_{max} pendant la première phase de croissance.

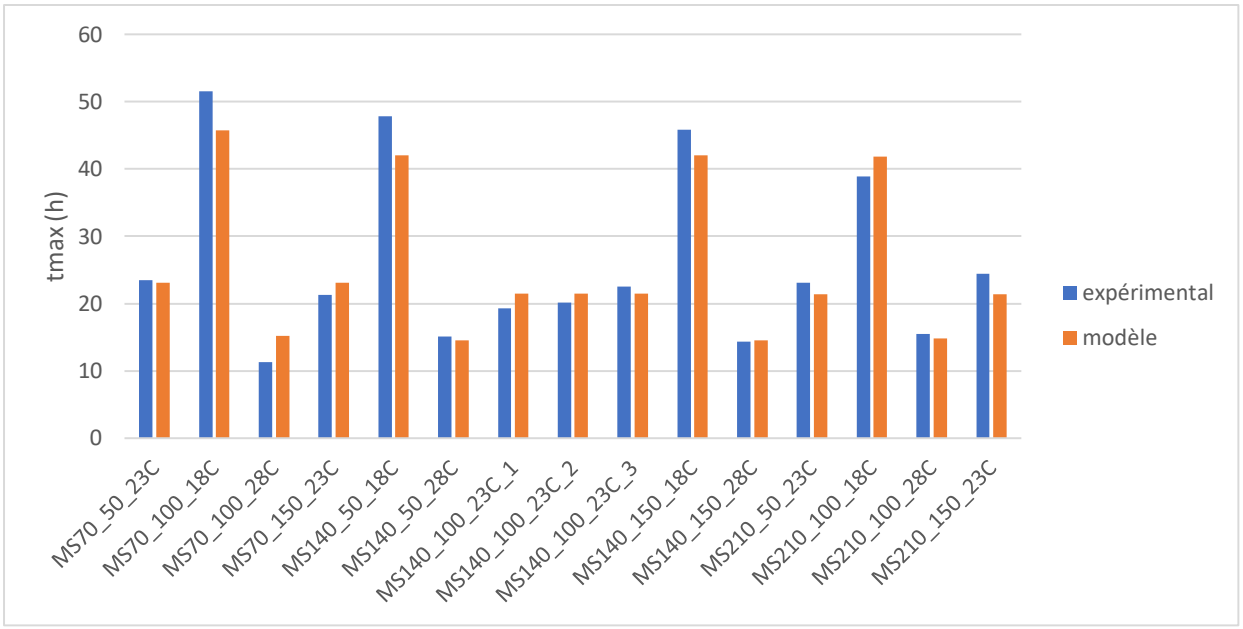


Figure IV.49 Valeurs expérimentales et prédites par le modèle pour le t_{max} pendant la première phase de croissance.

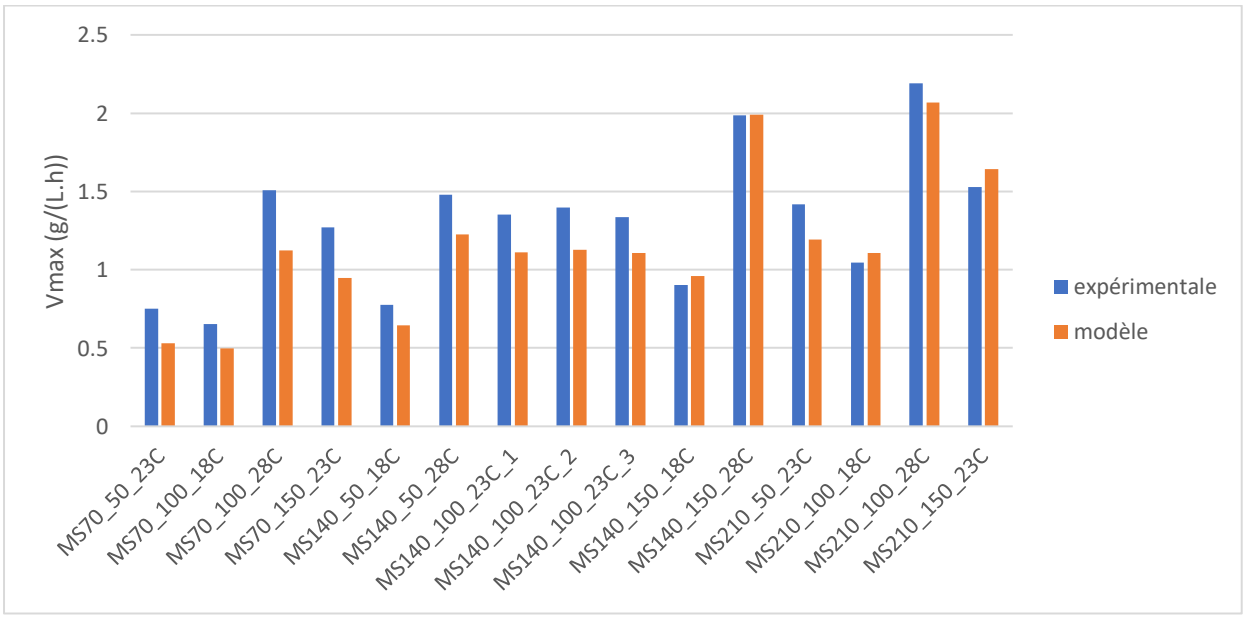


Figure IV.50 Valeurs expérimentales et prédites par le modèle pour le V_{max} pendant la deuxième phase de croissance.

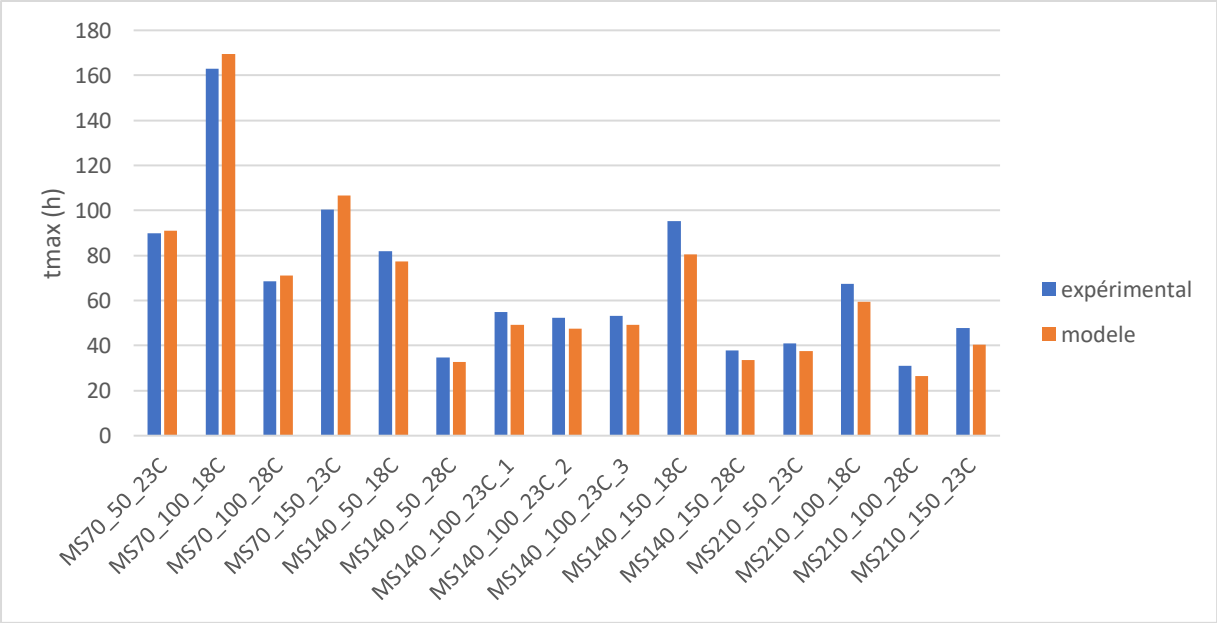


Figure IV.51 Valeurs expérimentales et prédites par le modèle pour le t_{max} pendant la deuxième phase de croissance.

Le Tableau IV.33 présente les valeurs moyennes de l'écart relatif de la valeur prédite par le modèle à la valeur expérimentale pour V_{max} et t_{max} pour chaque phase de croissance et pour chaque valeur des conditions expérimentales (concentration initiale en azote, concentration en azote ajouté et température). Pour l'ajout d'azote, la moyenne n'est pas calculée pour la première phase de croissance car l'ajout d'azote est effectué après.

Le modèle simule mieux la valeur de t_{max} pendant la première phase de croissance pour une concentration initiale en azote de 140 mg/L alors que la valeur de V_{max} pendant la première phase de croissance est moins bien prédite pour une concentration initiale en azote faible. Pour la deuxième phase, plus la concentration initiale en azote est élevée, mieux le modèle estime la valeur de V_{max} alors que la valeur de t_{max} est mieux prédite pour une concentration initiale faible en azote. Ces résultats sont en accord avec les résultats précédents sur la construction des deux modèles de la cinétique principale, où les fermentations avec une concentration initiale en azote faible étaient les moins bien simulées par les deux modèles construits.

Quelle que soit la température, le modèle permet de bien décrire les valeurs de V_{max} et t_{max} pendant la première phase de croissance avec des écarts relatifs similaires. Pour la deuxième phase de croissance, le modèle décrit moins bien la valeur de V_{max} pour une température de 23°C alors que la capacité de prédiction de t_{max} par le modèle n'est pas impactée par la température. La température présente une moins grande variabilité en fonction des trois conditions expérimentales que la concentration initiale en azote et la concentration en azote ajouté. L'écart relatif entre les valeurs estimées et expérimentales pour les V_{max} et t_{max} étant faible, la prise en charge de la température par le modèle est bonne pour les trois conditions de température considérées.

En conclusion, le modèle prenant en compte l'effet de la température permet de bien représenter les cinétiques des quinze fermentations utilisées pour sa calibration (valeur maximale de NRMSE de 0,0572 pour le CO_2 et de 0,109 pour la vitesse de dégagement de CO_2). Ce modèle estime bien aussi les valeurs de V_{max} et de t_{max} pour les deux phases de croissance. La structure choisie pour prendre en compte l'effet de la température dans le modèle de la cinétique principale semble donc pertinente pour simuler une fermentation alcoolique isotherme en conditions œnologiques avec une température comprise entre 18 et 28°C.

Tableau IV.33 Valeurs moyennes de l'écart relatif à la valeur expérimentale pour V_{max} et t_{max} pour chaque phase de croissance pour toutes les fermentations et pour chaque valeurs des conditions expérimentales. Les valeurs ne sont pas indiquées pour la première phase de croissance et pour l'azote ajouté car l'ajout d'azote est effectué après la première phase de croissance.

		V_{max1}	t_{max1}	V_{max2}	t_{max2}
	Moyenne	3,781%	8,939%	15,593%	8,698%
N0 (mg/L)	70	2,452%	13,920%	26,051%	3,779%
	140	4,850%	6,746%	13,589%	9,347%
	210	3,239%	7,908%	8,642%	12,483%
T (°C)	18	2,627%	9,808%	13,212%	9,226%
	23	4,732%	7,422%	18,949%	8,278%
	28	3,270%	10,837%	12,101%	8,905%
Naj (mg/L)	50	-	-	19,876%	5,272%
	100	-	-	16,393%	8,740%
	150	-	-	9,909%	12,052%

V.B.5. Validation du modèle

Le modèle a été validé en utilisant les données de trois fermentations anisothermes dont la température varie entre 18°C et 28°C (le profil de température est présenté dans la partie III.F.2).

V.B.5.a) Prédiction du CO_2

Comme le montre la Figure IV.52, le modèle simule assez bien le CO_2 et la vitesse de dégagement de CO_2. Graphiquement la fermentation S11 est la fermentation la moins bien simulée pour le CO_2 dégagé car après l'ajout d'azote la reprise de l'activité fermentaire simulée est trop lente par rapport aux données expérimentales. Pour toutes les fermentations, la production de CO_2 simulée par le modèle est en avance en début de fermentation par rapport aux données expérimentales. Cette avance semble être liée à la température car la fermentation S11 (avec une température initiale de 25°C) présente la plus grande avance alors que la fermentation S13 (avec une température initiale de 19°C) présente la moins grande avance. L'avance peut s'expliquer par la solubilité du CO_2 qui est inversement proportionnelle à la température (Carroll et al., 1991) et par une phase de latence observée expérimentalement mais que le modèle ne simule pas. Pour la même raison, la valeur de t_{max} est sous-estimée par le modèle. La valeur du V_{max} est bien estimée pendant la première phase de croissance, mais sous-estimée après l'ajout d'azote pour les trois fermentations.

Le coefficient statistique NRMSE a été calculé pour le CO_2 et le r_{CO2} pour les trois fermentations. Les valeurs sont présentées dans le Tableau IV.34. Le modèle simule bien les fermentations anisothermes et présente une meilleure adéquation aux données du CO_2 dégagé qu'aux données de la vitesse de dégagement de CO_2 (valeur moyenne de NRMSE de 0,0689 et de 0,118 respectivement). La fermentation S11 est la fermentation la moins bien simulée par le modèle d'après les valeurs de NRMSE (valeurs de 0,0883 et de 0,150 pour le CO_2 et le r_{CO2} respectivement), ce qui est cohérent avec la Figure IV.52.

Tableau IV.34 Valeurs de NRMSE pour les fermentations de validation

Fermentations	NRMSE	
	CO_2	r_{CO2}
S11	0,088	0,150
S12	0,062	0,105
S13	0,057	0,101

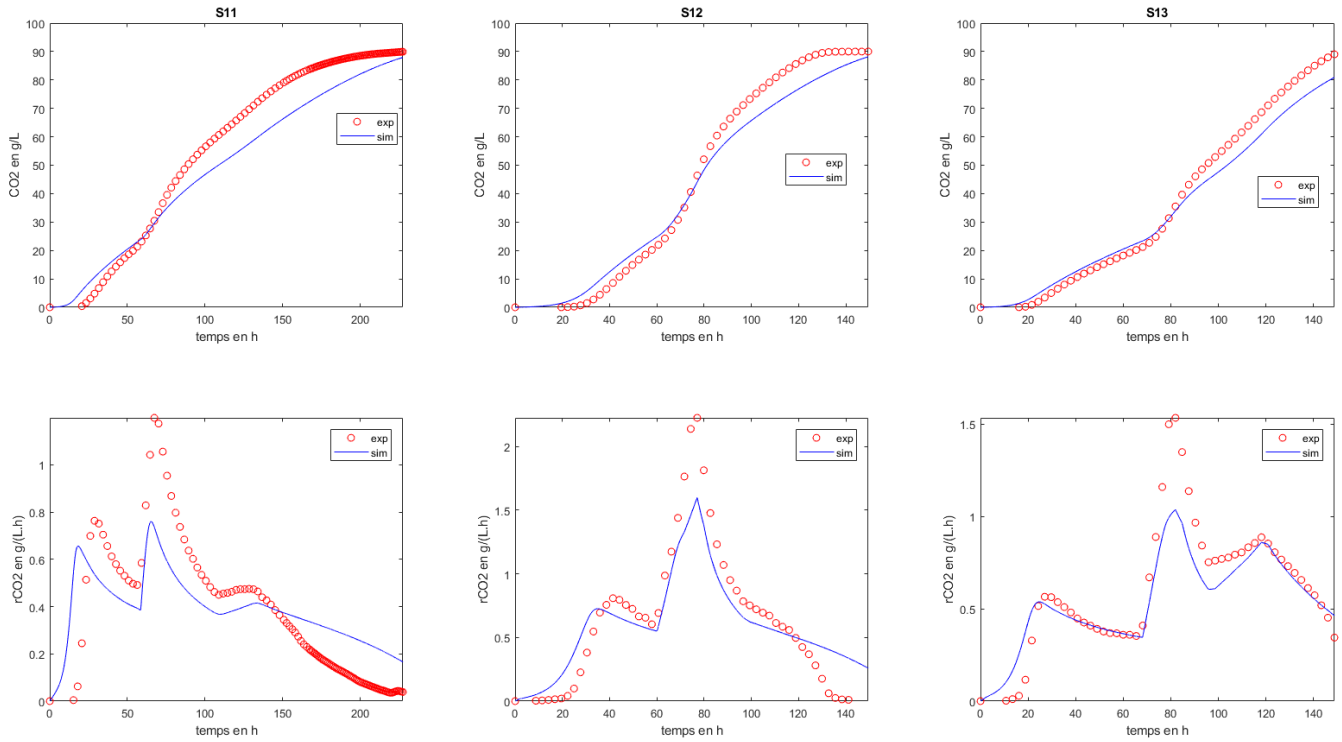


Figure IV.52 Données expérimentales et simulées pour les trois fermentations de validation

V.B.5.b) Prédiction des valeurs de V_{max} et de t_{max}

Le Tableau IV.35 présente les valeurs expérimentales et simulées de V_{max} et de t_{max} ainsi que l'écart relatif de la valeur simulée à la valeur expérimentale pour les deux phases de croissance et pour les trois fermentations de validation. Le modèle sous-estime les valeurs de V_{max} et de t_{max} pour les deux phases de croissance et pour les trois fermentations. Pendant la première phase de croissance, le modèle prédit assez bien la valeur de V_{max} (écart relatif moyen de -9,578%). La valeur de t_{max} est moins bien estimée pendant la première phase de croissance (valeur moyenne de -20,052%) principalement pour la fermentation S11.

Pour la deuxième phase de croissance, le modèle sous-estime fortement les valeurs de V_{max} (écart relatif moyen de 43,812% et l'écart relatif minimum de 31,282% pour la fermentation S11) mais prédit bien la valeur de t_{max} (écart relatif moyen de 5,376%).

Tableau IV.35 Valeurs expérimentales et prédites par le modèle de V_{max} et de t_{max} pour les deux phases de croissance et écart relatif de la valeur prédite par le moyenne à la valeur expérimentale pour les trois fermentations de validation.

		V_{max1}	t_{max1}	V_{max2}	t_{max2}
S11	Expérimentale	0,763	28,82	1,199	67,32
	Modèle	0,655	18,246	0,812	66,150
	Ecart relatif	-14,179%	-36,690%	-32,282%	-1,738%
S12	Expérimentale	0,808	41,42	2,225	77,08
	Modèle	0,731	35,012	0,993	69,022
	Ecart relatif	-9,601%	-15,471%	-55,376%	-10,455%
S13	Expérimentale	0,565	27	1,534	81,97
	Modèle	0,537	24,842	0,863	78,744
	Ecart relatif	-4,949%	-7,994%	-43,777%	-3,935%

V.B.6. Conclusion

Le modèle de la cinétique principale, construit à partir de quatre fermentations faites à 24°C, a été modifié pour y intégrer la température à partir de données (CO_2 produit et vitesse de production de CO_2) de quinze fermentations isothermes avec une température allant de 18°C à 28°C. Le modèle présente une bonne adéquation aux données de calibration, selon les valeurs de NRMSE et prédit bien les valeurs de V_{max} et de t_{max} pendant les deux phases de croissance pour les quinze fermentations de calibration.

Le modèle a été validé par des données de trois fermentations (CO_2 produit et vitesse de production de CO_2) anisothermes. Les représentations graphiques et les valeurs de NRMSE montrent une bonne capacité du modèle à simuler ces fermentations. Le modèle présente également une capacité de prédiction des valeurs de V_{max} et de t_{max} assez bonne pour les trois fermentations de validation sauf pour la valeur de V_{max} après l'ajout de l'azote qui est sous-estimée. Ce résultat n'est pas surprenant pour la première phase de croissance car la température est constante avant l'ajout d'azote. Une recalibration du modèle présenté avec des données de fermentations anisothermes permettraient d'améliorer les capacités de simulation du modèle.

V.C. Conclusion

Dans ce chapitre, deux modèles de la cinétique principale ont été construits. Les modèles simulent l'évolution temporelle de la biomasse, de substrats (sucre et azote assimilable), de produits de la fermentation (éthanol et CO_2), de composés intra-cellulaires (azote intra-cellulaire et transporteurs du sucre) et de l'activité cellulaire. Les deux modèles ont été calibrés grâce à des données (biomasse, azote, CO_2 produit et vitesse de dégagement de CO_2) de quatre fermentations réalisées à 24°C avec des concentrations initiales en azote différentes et un ajout d'azote fait à 20 g/L de CO_2 produit avec différentes concentrations en azote. Les deux modèles ont été validés grâce à des données de seize fermentations faites à 24°C et avec des concentrations initiales en azote différentes et des conditions d'ajout différent (timing d'ajout d'azote et concentration en azote ajouté). Le modèle 1 a été choisi comme modèle de la cinétique principale car il présente une meilleure adéquation aux données de validation, une meilleure capacité de prédiction des valeurs de V_{max} et de t_{max} et est moins sensible aux variations des valeurs des paramètres que le modèle 2.

Le modèle a été implémenté et recalibré pour intégrer la température grâce à des données (CO_2 produit et vitesse de production de CO_2) de quinze fermentations isothermes avec une température allant de 18°C à 28°C. Le modèle présente de bonnes capacités de simulation de trois fermentations anisothermes dont la température évolue entre 18°C et 28°C. Le modèle possède une bonne capacité de prédiction des valeurs de V_{max} et de t_{max} pour les fermentations de validation. L'utilisation de fermentations anisothermes pour la calibration du modèle permettraient d'améliorer les capacités de simulation du modèle.

Le modèle de la cinétique principale, auquel a été intégrée la température, servira de base à la construction du modèle de la synthèse des arômes

VI. Modélisation de la synthèse des arômes

Le métabolisme des arômes est relié au métabolisme de l'azote et au métabolisme central du carbone (Styger et al., 2011; Swiegers et al., 2005). En effet, les alcools supérieurs dérivent du pyruvate à plus de 90% et à moins de 10% des acides aminés (de la valine pour l'isobutanol et de la leucine pour l'alcool isoamylique) (Rollero et al., 2017; Swiegers et al., 2005) ; l'acétate d'isoamyle a pour précurseur l'alcool isoamylique et l'acétyl-CoA (Hirst et al., 2016) et les esters d'éthyle ont pour précurseur l'éthanol et un acyl-CoA (hexanoyl-CoA pour l'hexanoate d'éthyle et l'octanoyl-CoA pour l'octanoate d'éthyle) (Styger et al., 2011).

Mouret et al. (2014) ont pu établir des relations entre la consommation du sucre et la production totale des composés volatils aromatiques en fonction des conditions expérimentales. Afin de modéliser la production des arômes lors de la fermentation œnologique, il est donc nécessaire de relier cette production aux variables prises en compte dans le modèle de la cinétique principale décrit précédemment. Des variables de la cinétique principale ou leurs vitesses de production ou de consommation (comme les concentrations en sucre ou en azote, le CO_2 produit ou la vitesse de production de CO_2) seront donc intégrées dans les équations de production des arômes. Le modèle de la synthèse des arômes construit dans cette partie viendra ainsi compléter le modèle de la cinétique principale.

Les arômes étant des composés volatiles, une partie s'évapore en cours de fermentation en fonction de la température et du débit de CO_2 ; la concentration restante dans le liquide est alors inférieure à celle produite par les levures. Les équations mathématiques du modèle devront permettre de modéliser cette production totale des arômes par les levures mais également d'estimer les concentrations liquide (qui donne les caractéristiques organoleptiques au vin) ainsi que les pertes gazeuses.

Morakul et al. (2011) ont modélisé ces pertes en arômes par évaporation. Ils considèrent l'équilibre entre la phase gazeuse et la phase liquide par le ratio entre les concentrations en gaz et en liquide $k = \frac{C_{gaz}}{C_{liq}}$. Ce ratio est spécifique à l'arôme considéré et dépend de la température et de la concentration en éthanol (cf. eq V.1).

$$ln(k_{arome}) = F_1 + F_2 E - \frac{F_3 + F_4 E}{R}\left(\frac{1000}{T} - \frac{1000}{T_{ref}}\right) \qquad (V.1)$$

Avec R la constante des gaz parfaits, T la température en kelvin et T_{ref} la température de référence valant 293K.

Les constantes F_1, F_2, F_3 et F_4 dépendent des arômes et sont présentées dans le tableau II.10 du paragraphe II.C.3.b.(2) de la synthèse bibliographique.

Les pertes en arômes à un instant t sont calculées par l'équation V.2 avec Q_{CO2} la vitesse spécifique de dégagement de CO_2 en (L_{CO2}/L_{mout})/h (cf eq V.3).

$$Pertes(t) = Q_{CO2} k_{arome} C_{liq} \qquad (V.2)$$

$$Q_{CO2} = \frac{1000RT}{M_{CO2} P_{ATM}} \frac{dCO_2}{dt} \qquad (V.3)$$

Avec R la constante des gaz parfaits, T la température, M_{CO2} la masse molaire du CO_2 et P_{ATM} la pression atmosphérique.

L'évolution de la concentration liquide en arômes est alors calculée par bilan matière selon l'équation V.4.

$$\frac{dC_{liq}}{dt} = \frac{dC_{tot}}{dt} - Q_{CO2} k_{arome} C_{liq} \qquad (V.4)$$

L'ajout d'azote ne modifie pas les équilibres gaz-liquide de chaque arôme. De plus, la température est déjà intégrée dans les équations de pertes en arômes. Les équations développées par Morakul et al. (2011) reste donc valable pour les fermentations œnologiques anisothermes avec ajout d'azote que nous cherchons à modéliser. Seule la production totale en arômes va être modifiée par la température de culture et l'ajout d'azote. Par conséquent, dans ce chapitre, le travail de modélisation de la production des arômes ne portera que sur la production totale des

arômes considérés (isobutanol, alcool isoamylique, acétate d'isoamyle, hexanoate d'éthyle et octanoate d'éthyle). Les pertes en arômes et concentrations liquides en arômes seront calculées en utilisant les équations V.2 et V.4.

Le travail de modélisation est d'abord effectué sur l'acétate d'isoamyle car, des cinq arômes considérés, l'acétate d'isoamyle est l'arôme dont la production est la plus sensible à l'effet de la température, à la concentration initiale en azote et à l'ajout d'azote. La modélisation des quatre autres arômes considérés est faite dans un second temps en prenant pour base le travail de modélisation réalisé pour la synthèse de l'acétate d'isoamyle.

VI.A. Modélisation de la synthèse de l'acétate d'isoamyle

Deux modèles de la synthèse de l'acétate d'isoamyle ont été construits : un premier modèle présentant une discontinuité et un deuxième modèle sans discontinuité.

VI.A.1. Construction des modèles

VI.A.1.a) Modèle avec discontinuité

Le modèle avec discontinuité développé est basé sur le modèle de Mouret et al. (2015).

Mouret et al. (2014) ont montré qu'il existe une relation entre la consommation du sucre et la production des composés volatils en fonction des conditions expérimentales. Ainsi dans le modèle de Mouret et al. (2015) établi que pour un fermenteur batch, la vitesse de production d'acétate d'isoamyle est couplée à la vitesse de consommation des sucres par un rendement (cf. eq V.5).

$$\frac{dIAA}{dt} = -Y_{IAA}\frac{dS}{dt} \qquad (V.5)$$

Avec Y_{IAA} le rendement de conversion du sucre en acétate d'isoamyle en g_{IAA}/g_S. Mouret et al. (2015) ont montré que ce rendement varie au cours de la fermentation et peut être modéliser par 2 valeurs constantes, le changement de valeur étant déterminé par degré d'avancement de la fermentation. Grâce à l'analyse d'un plan d'expérience à 2 facteurs (N_0, T), ils ont également déterminé une relation mathématique entre le logarithme néperien du rendement de conversion, la concentration initiale en azote (N_0) et la température de fermentation (T (cf. eq V.6).

$$ln(Y_{IAA}) = \begin{cases} D_1 + D_2N_0 + D_3T + D_4N_0^2 + D_5T^2 + D_6N_0T & si \quad S_0 - S_{conso} < S_{trans} \\ D_7 + D_8N_0 + D_9T + D_{10}N_0^2 + D_{11}T^2 + D_{12}N_0T & si \quad S_0 - S_{conso} \geq S_{trans} \end{cases} \qquad (V.6)$$

Avec S_0 la concentration initiale en sucre en g/L, S_{conso} la quantité de sucre consommée en g/L, S_{trans} la concentration en sucre à la transition en g/L et D_1, …, D_{12} les paramètres du modèle de Mouret et al. (2015).

S_{trans} est défini en fonction de la concentration initiale en azote selon la relation de l'équation V.7.

$$S_{trans} = \begin{cases} 55\,g/L & si N_0 < 230\,mg/L \\ 11.4 + 0.186N_0 & sinon \end{cases} \qquad (V.7)$$

Le modèle de Mouret et al. (2015) ne permet pas d'intégrer ni l'ajout d'azote ni le caractère anisotherme des fermentations car il n'est basé que sur la concentration initiale en azote et sur une température isotherme de fermentation. Nous proposons dans ce travail de modifier le modèle de Mouret et al. (2015) pour intégrer l'ajout d'azote en cours de fermentation ainsi que l'effet de la température.

L'équation (V.5) de la vitesse de la production d'acétate d'isoamyle est conservée car elle n'est pas modifiée par l'ajout d'azote mais l'équation (V.6) du rendement de conversion est modifiée pour intégrer l'ajout d'azote.

Dans le premier modèle proposé, la concentration initiale en azote est remplacé par la concentration totale en azote (concentration initiale et concentration ajouté) après l'ajout d'azote dans l'équation du rendement de conversion du sucre en acétate d'isoamyle du modèle de Mouret et al. (2015) (cf. eq V.8).

$$ln(Y_{IAA}) = \begin{cases} D_1 + D_2N_0 + D_3T + D_4N_0^2 + D_5T^2 + D_6N_0T \quad avant ajout \\ D_1 + D_2(N_0 + N_{aj}) + D_3T + D_4(N_0 + N_{aj})^2 + D_5T^2 + D_6(N_0 + N_{aj})T \quad après ajout \quad si \quad S_0 - S_{conso} < S_{trans} \\ D_7 + D_8(N_0 + N_{aj}) + D_9T + D_{10}(N_0 + N_{aj})^2 + D_{11}T^2 + D_{12}(N_0 + N_{aj})T \quad si \quad S_0 - S_{conso} \geq S_{trans} \end{cases} (V.8)$$

Avec N_{aj} la concentration en azote ajouté.

Pour chaque phase de production, le logarithme népérien du rendement de conversion du sucre en acétate d'isoamyle est décomposé en six termes :

- Un terme indépendant des conditions expérimentales
- Deux termes dépendant de la température : un terme d'effet linéaire et un terme d'effet quadratique
- Deux termes dépendant de la concentration totale en azote (concentration initiale en azote avant l'ajout d'azote et concentration initiale plus la concentration en azote ajouté après l'ajout d'azote) : un effet d'effet linéaire et un terme d'effet quadratique
- Un terme d'effet croisé entre la température et la concentration totale en azote (concentration initiale en azote avant l'ajout d'azote et concentration initiale plus la concentration en azote ajouté après l'ajout d'azote).

Le modèle présente donc deux discontinuités :

- Une discontinuité en fonction de l'ajout d'azote qui modifie les conditions expérimentales
- Une discontinuité en fonction du sucre consommé qui modifie les valeurs des paramètres de l'équation.

Or dans la gamme de concentration initiale d'ajout d'azote (70 à 210 mg/L) choisie comme domaine possible pour le projet STARWINE et la modélisation, la valeur de S_{trans} est de 55 g/L de sucre consommé ce qui correspond à une production de CO_2 de 25,35 g/L environ. Dans le projet, l'ajout d'azote se fait pour un avancement de 20 g/L de CO_2 dégagé. Les discontinuités étant effectuées à des avancements de fermentation proches, le modèle est simplifié en supprimant la discontinuité liée à la consommation du sucre. La modification des paramètres du rendement de conversion du sucre en arôme est alors effectuée à l'ajout d'azote selon l'équation V.9.

$$ln(Y_{IAA}) = \begin{cases} D_1 + D_2N_0 + D_3T + D_4N_0^2 + D_5T^2 + D_6N_0T \quad avant\ ajout \\ D_7 + D_8(N_0 + N_{aj}) + D_9T + D_{10}(N_0 + N_{aj})^2 + D_{11}T^2 + D_{12}(N_0 + N_{aj})T \quad après\ ajout \end{cases} (V.5)$$

Les valeurs des paramètres sont calibrées en deux temps :

- Dans un premier temps, les paramètres D_1 à D_6, correspondant à la phase de production avant ajout d'azote sont calibrés.
- Dans un second temps, les paramètres D_7 à D_{12} de la phase de production après l'ajout d'azote sont calibrés en utilisant les valeurs des paramètres D_1 à D_6 déterminées précédemment.

Les paramètres ont été calibrés en séparant les deux phases de production car la calibration des douze paramètres simultanément ne permettait pas une détermination correcte des paramètres de la première phase de production avant l'ajout d'azote (D_1 à D_6). En effet, les erreurs entre expérience et simulation sur cette partie de la courbe étaient très faibles devant les erreurs sur la deuxième partie de courbe, ce qui mettaient artificiellement plus de poids sur la détermination des paramètres D_7 à D_{12}.

La calibration des paramètres se fait à partir de données de quinze fermentations isothermes réalisées à trois conditions de concentration initiale d'azote (70, 140 et 210 mg/L), de température (18, 23 et 28°C) et de concentration d'azote ajouté (50, 100 et 150 mg/L) et validés sur les données de trois fermentations anisothermes. Les conditions expérimentales des fermentations de calibration et de validation sont présentées dans le chapitre matériel et méthodes.

Les valeurs calibrées des paramètres sont présentées et comparées aux valeurs des paramètres du modèle de Mouret et al. (2015) dans le Tableau V.36. Dans la phase de production avant ajout d'azote, les valeurs des paramètres du modèle (D_1, D_2, …, D_6) sont proches des valeurs des paramètres du modèle de Mouret et al. (2015). Cette observation est peu surprenante car l'ajout d'azote est effectué après cette phase de production, donc les conditions expérimentales sont les mêmes entre cette étude et celle de Mouret et al. (2015). Dans la phase de production après l'ajout d'azote, les valeurs calibrées des paramètres (D_7, D_8, …, D_{12}) sont du même ordre que les valeurs du modèle

de Mouret et al. (2015). Cette observation est surprenante car un ajout d'azote est pris en compte dans ce travail alors qu'il n'est pas considéré par Mouret et al. (2015).

Tableau V.36 Valeurs des paramètres du modèle avec discontinuité comparées aux valeurs des paramètres du modèle de Mouret et al. (2015) pour l'acétate d'isoamyle

Paramètres	Valeurs calibrées	Valeurs du modèle de Mouret et al. (2015)
D_1	-6,3382	-5,33
D_2	$5{,}0405.10^{-3}$	$3{,}3.10^{-3}$
D_3	$-3{,}9719.10^{-2}$	$-1{,}08.10^{-3}$
D_4	$1{,}2164.10^{-4}$	0
D_5	$1{,}2947.10^{-3}$	$2{,}15.10^{-3}$
D_6	$2{,}206.10^{-6}$	0
D_7	-12,8565	-13,6
D8	$2{,}5813.10^{-2}$	$2{,}48.10^{-2}$
D_9	$4{,}6362.10^{-1}$	$4{,}58.10^{-1}$
D_{10}	$-2{,}377.10^{-5}$	$-2{,}00.10^{-3}$
D_{11}	$-7{,}5278.10^{-3}$	$-7{,}58.10^{-3}$
D_{12}	$-4{,}9984.10^{-4}$	$-3{,}74.10^{-4}$

Le modèle construit ci-dessus présente une discontinuité ce qui rend l'utilisation du modèle par une loi de contrôle plus compliquée qu'un modèle sans discontinuité. Un modèle sans discontinuité est proposé dans la partie suivante.

VI.A.1.b) Modèle sans discontinuité

Dans cette partie, un deuxième modèle est construit. Il reprend le même bilan matière que le modèle avec discontinuité construit précédemment (cf. eq V.1). Le rendement de conversion du sucre en acétate d'isoamyle est quant à lui défini comme une variable d'état du modèle qui évolue en fonction du temps.

Expérimentalement, le rendement de conversion du sucre en acétate d'isoamyle est nul en début de fermentation et augmente en cours de la fermentation jusqu'à un rendement maximale (Mouret et al., 2014). La vitesse de production de CO_2 étant représentative de l'activité fermentaire des levures et donc du métabolisme de celle-ci, la vitesse d'évolution du rendement de conversion du sucre en acétate d'isoamyle est donc définie comme fonction de cette vitesse de production de CO_2 (cf. eq V.10).

$$\frac{dY_{IAA}}{dt} = \left(Y_{IAA,max} - Y_{IAA}\right)\alpha_{IAA} e^{\frac{r_{CO2}}{K_{rCO2}}} \qquad (V.10)$$

Avec $Y_{IAA,max}$ en g_{IAA}/g_S, α_{IAA} en h^{-1} et K_{rCO2} en $g_{CO2}/(L.h)$ les trois paramètres du modèle.

Cette équation permet bien de prendre en compte une valeur nulle du rendement de conversion du sucre en acétate d'isaomyle à t=0 : $Y_{IAA}(t=0) = 0$ et une valeur qui augmente avec l'activité biologique (r_{CO2}) et tend vers un rendement maximal $Y_{IAA,max}$. : $\lim_{Y_{IAA} \to Y_{IAA,max}} \left(Y_{IAA,max} - Y_{IAA}\right) = 0$

Le modèle intègre indirectement la concentration initiale en azote et la concentration d'azote ajouté car la vitesse de dégagement de CO_2 est corrélée à la concentration en azote présente dans le milieu (cf. eq V.10).

Les trois paramètres du modèle sont calibrés pour chacune des trois conditions de température (18, 23 et 28°C) pour déterminer d'éventuelles relations entre les paramètres et la température. Les Figure V.53, Figure V.54 et Figure V.55 présentent les relations entre la température et les trois paramètres calibrés pour chaque condition de

température. Y_{max} et K_{rCO2} diminue quand la température augmente. α_{IAA} augmente quand la température augmente ce qui est cohérent avec la bibliographie car dans la gamme de température considérée, l'activité enzymatique augmente avec la température.

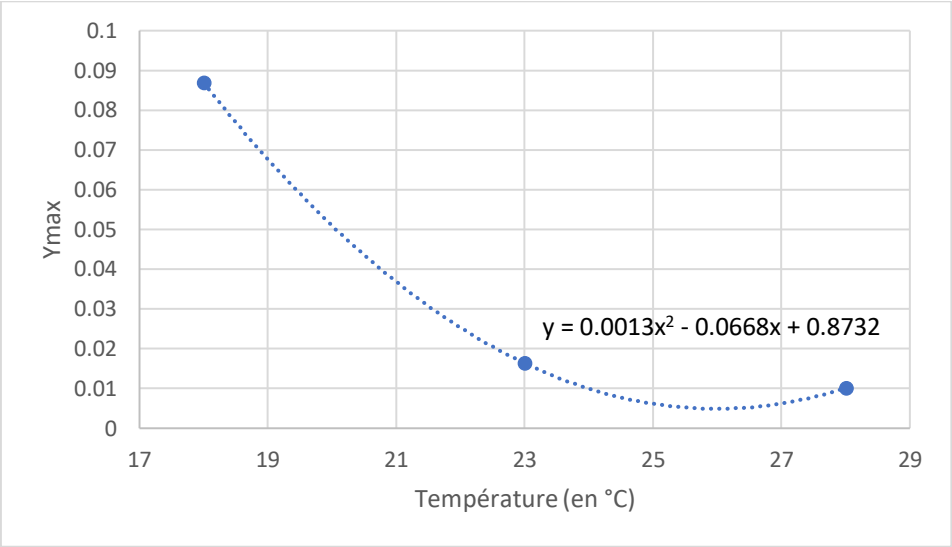


Figure V.53 Relation entre Y_{max} et la température.

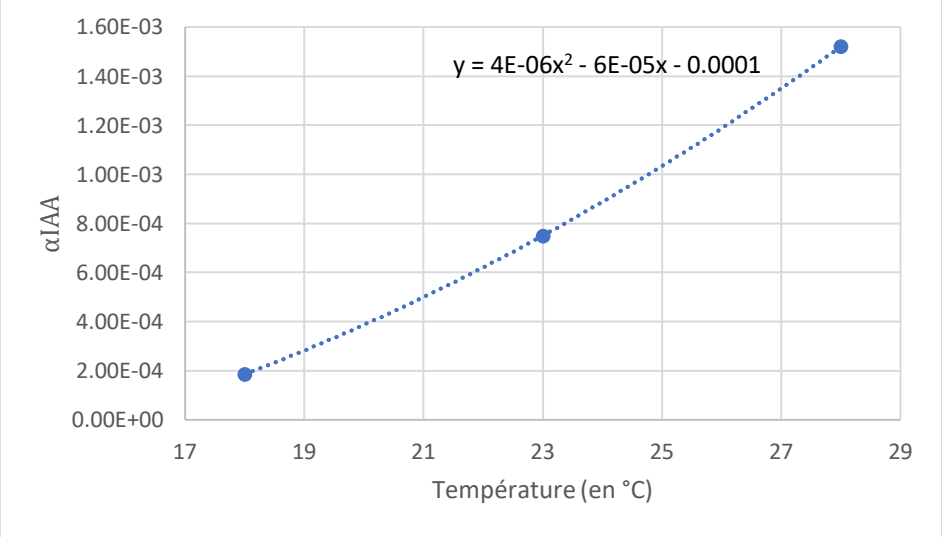


Figure V.54 relation entre α_{IAA} et la température

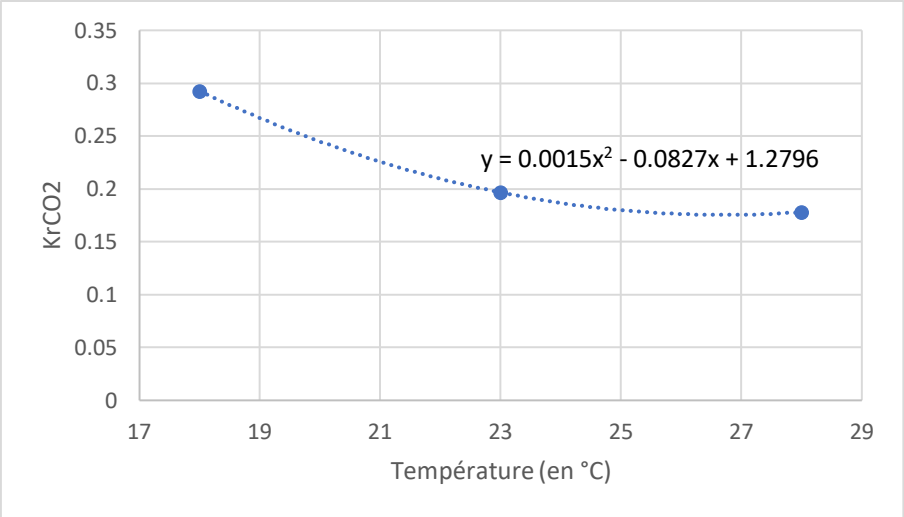


Figure V.55 relation entre K_{rCO2} et la température

Comme le montrent les Figure V.53, Figure V.54 et Figure V.55, il existe une relation quadratique entre chaque paramètre et la température telle que $Paramètres = aT^2 + bT + c$ avec a, b et c trois constantes. Les coefficients a, b et c de la relation entre chaque paramètre et la température sont calibrés avec toutes les fermentations et les relations finales entre les paramètres et la température sont données dans les équations V.11 à V.13.

$$Y_{IAA,max} = 1.286110^{-3}T^2 - 6.683710^{-2}T + 8.732410^{-1} \quad (V.11)$$

$$\alpha_{IAA} = 4.124810^{-6}T^2 - 5.629610^{-5}T - 1.378410^{-4} \quad (V.12)$$

$$K_{rCO2} = 1.550110^{-3}T^2 - 8.273110^{-2}T + 1.2792 \quad (V.13)$$

Le modèle sans discontinuité construit dans cette partie définit la vitesse de production de l'acétate d'isoamyle par l'équation (V.5) et le rendement de conversion du sucre en acétate d'isoamyle par l'équation (V.10). Les variations des paramètres du modèle en fonction de la température sont définies par les équations (V.11) à (V.13).

Deux modèles de la production de l'acétate d'isoamyle ont été construit dans cette partie. Dans la partie suivante, les deux modèles sont comparés aux fermentations de calibration puis sont validés sur les données de trois fermentations anisothermes.

VI.A.2. Comparaison des données simulées aux données expérimentales des fermentations de calibration

VI.A.2.a) Simulation des fermentations de calibration

Les Figure 56, Figure 57, Figure 586 et Figure 59 représente les données expérimentales et simulées par les modèles avec et sans discontinuité pour les quinze fermentations de calibration. Les deux modèles construits simulent bien la cinétique de production de l'acétate d'isoamyle. Cependant les deux modèles surestiment la production finale pour la fermentation MS140_50_18C et sous-estiment la production finale pour MS70_100_18C et MS70_150_23C. Pour la fermentation MS140_50_18C, une augmentation de la production de l'acétate d'isoamyle est observée dans les cinquante dernières heures alors que cette production n'est pas cohérente avec l'ajout d'une faible dose d'azote et qu'il devrait y avoir un ralentissement de la production de métabolites secondaires puisque la vitesse de production de CO_2 est quasiment nulle en fin de fermentation. La production finale est bien prédite pour les autres fermentations. Sur l'ensemble des fermentations, le modèle sans discontinuité semble meilleur que le modèle avec discontinuité. Pour le triplicat, qui est le point central du plan d'expérience, (MS140_100_23C), une faible variabilité des données expérimentales est observée. Pour le triplicat, les deux modèles simulent mieux la fermentation représentée en point noir car elle présente deux fois plus de point de

mesure que chacune des deux autres fermentations du triplicat ce qui augmente le poids de cette fermentation lors de la calibration des paramètres.

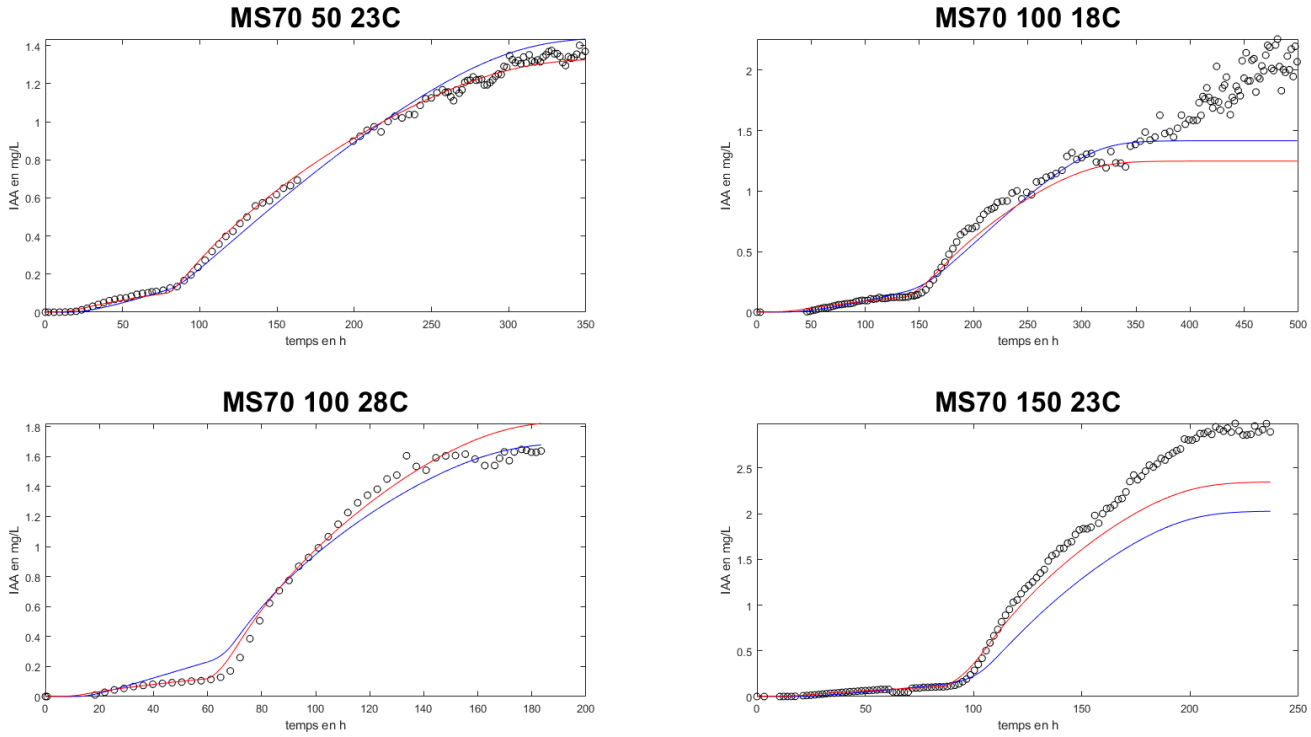


Figure 56. Données expérimentales (en noir) et simulées par les modèles avec discontinuité (en rouge) et sans discontinuité (en bleu) pour les fermentations de calibration avec une concentration initale en azote de 70 mg/L.

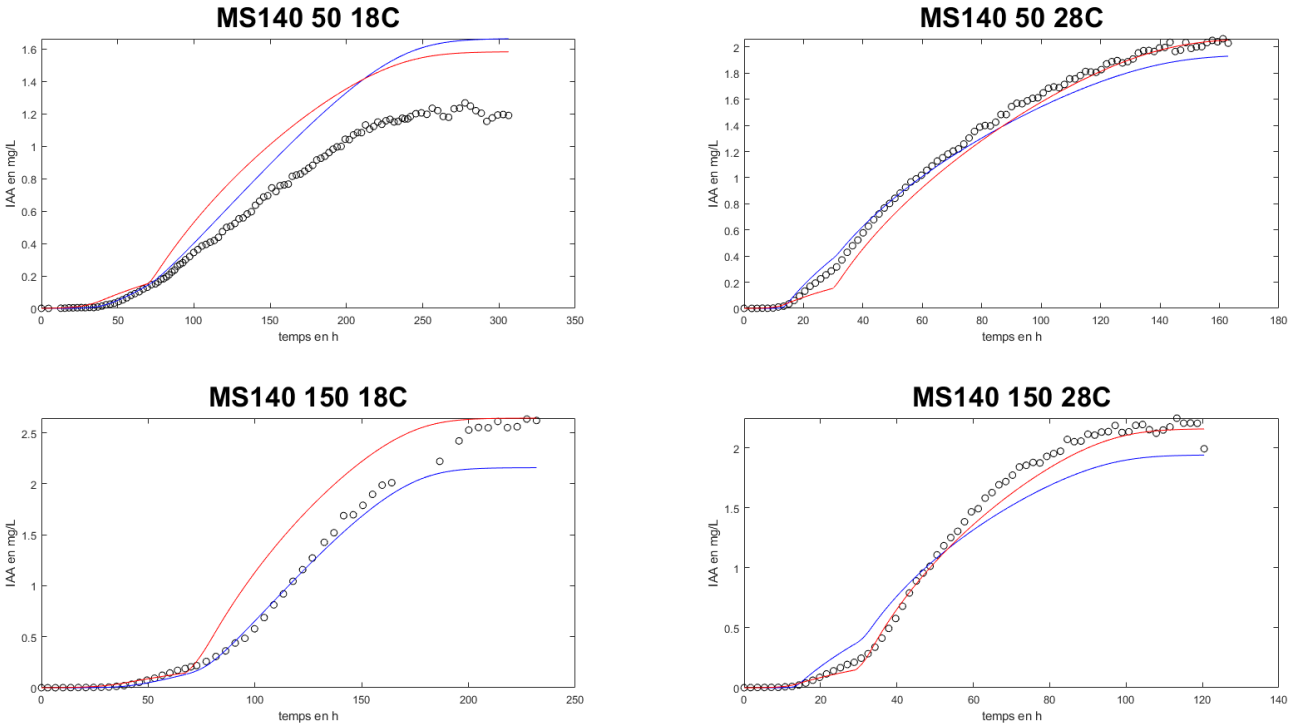


Figure 57 Données expérimentales (en noir) et simulées par les modèles avec discontinuité (en rouge) et sans discontinuité (en bleu) pour les fermentations de calibration avec une concentration initale en azote de 140 mg/L.

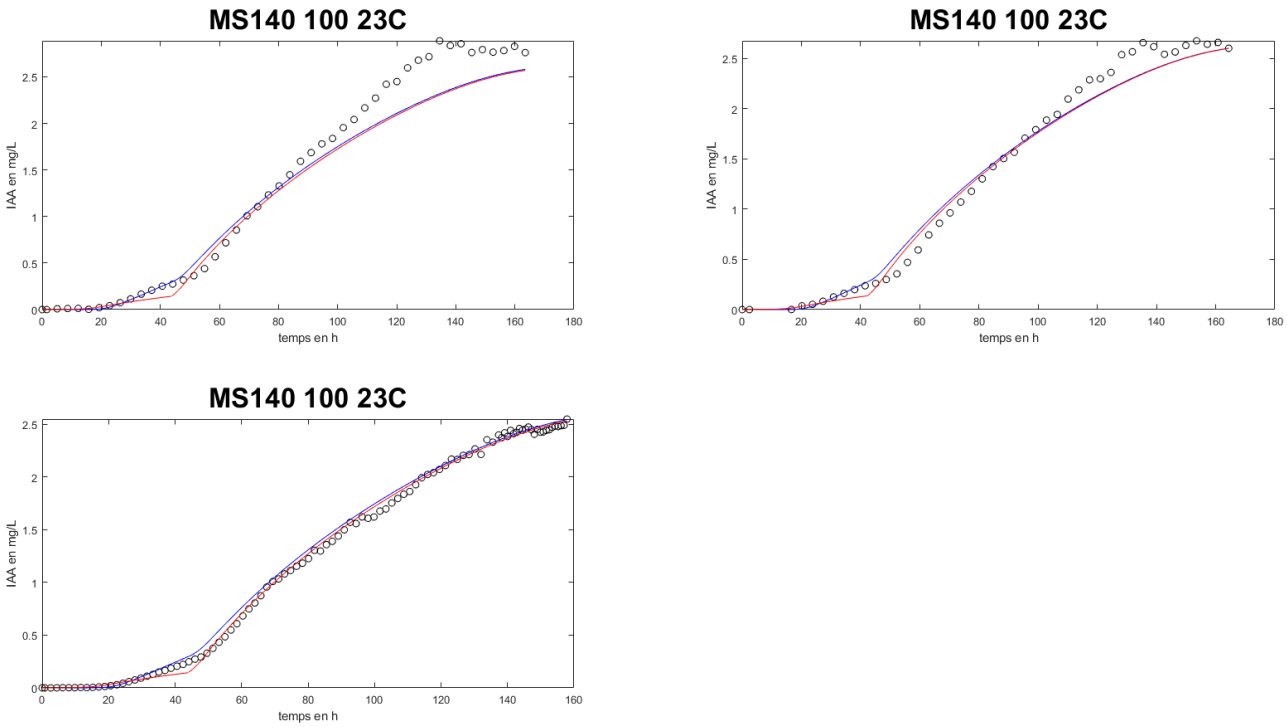


Figure 586 Données expérimentales (en noir) et simulées par les modèles avec discontinuité (en rouge) et sans discontinuité (en bleu) pour les fermentations de calibration du triplicat.

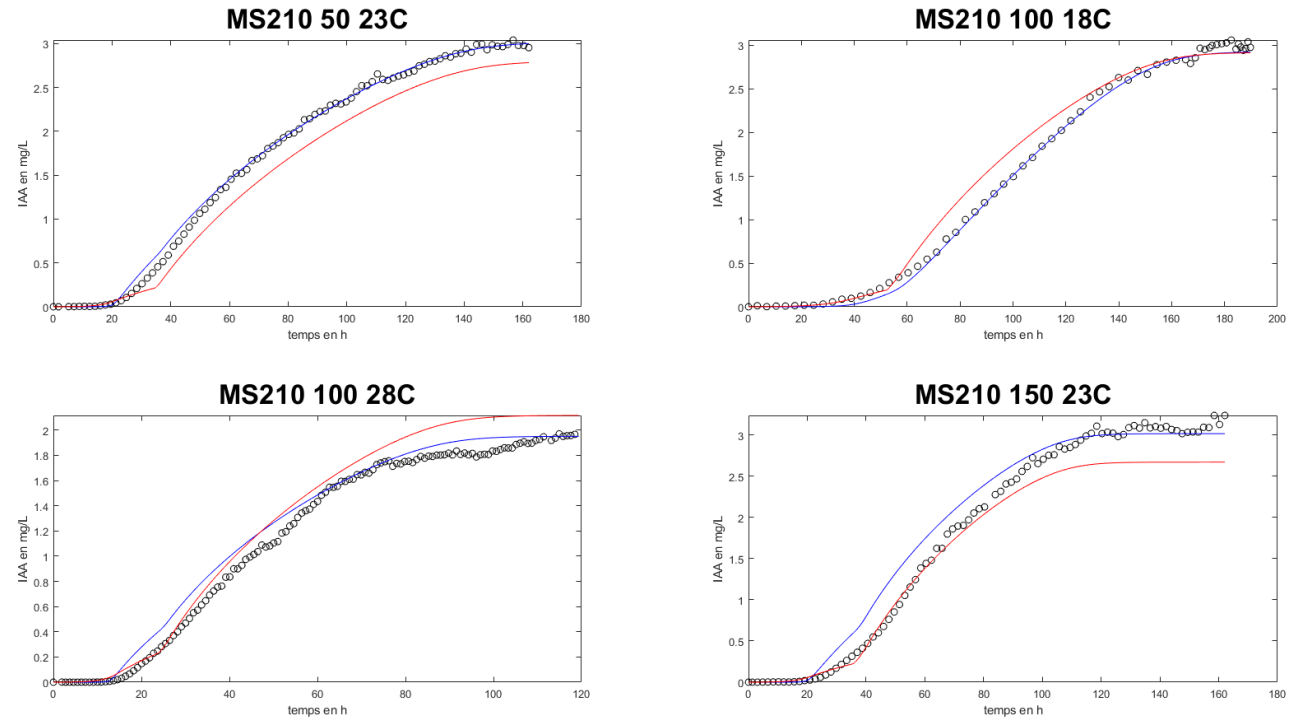


Figure 59 Données expérimentales (en noir) et simulées par les modèles avec discontinuité (en rouge) et sans discontinuité (en bleu) pour les fermentations de calibration avec une concentration initale en azote de 210 mg/L

VI.A.2.a) Adéquation des modèles aux données de calibration

Le coefficient statistique NRMSE a été calculé pour les quinze fermentations et pour les deux modèles construits (cf. Tableau V.37). Ceux-ci présentent une bonne adéquation aux données expérimentales : les deux modèles ne présentent des valeurs de NRMSE supérieures à 0,1 que pour trois fermentations seulement (MS70_100_18C, MS140_50_18C et MS140_150_18C pour le modèle avec discontinuité et MS70_100_18C, MS70_150_23C et MS70_100_28C pour le modèle sans discontinuité). Les valeurs moyennes de NRMSE sont de 0,0771 et 0,0726 respectivement pour le modèle avec discontinuité et le modèle sans discontinuité. Le modèle avec discontinuité présente une meilleure adéquation pour les fermentations avec une concentration initiale en azote faible (N_0=70mg/L, NRMSE moyen de 0,0867 et de 0,106 pour les modèles avec et sans discontinuité respectivement) tandis que le modèle sans discontinuité présente une meilleure adéquation pour les fermentations avec une concentration initiale en azote élevée (N_0=210mg/L, NRMSE moyen de 0,0698 et de 0,0385 pour les modèles avec et sans discontinuité respectivement).

Tableau V.37 Valeurs du coefficient NRMSE pour les deux modèles construits et pour les quinze fermentations de calibration.

	NRMSE	
Fermentations	Modèle avec discontinuité	Modèle sans discontinuité
MS70_50_23C	0,0193	0,0420
MS70_100_18C	0,175	0,134
MS70_100_28C	0,0544	0,0506
MS70_150_23C	0,0980	0,171
MS140_50_18C	0,207	0,197
MS140_50_28C	0,0364	0,0399
MS140_100_23C_1	0,0812	0,0780
MS140_100_23C_2	0,0448	0,0464
MS140_100_23C_3	0,0158	0,0218
MS140_150_18C	0,111	0,0680
MS140_150_28C	0,0350	0,0860
MS210_50_23C	0,0718	0,0192
MS210_100_18C	0,0505	0,0208
MS210_100_28C	0,0792	0,0510
MS210_150_23C	0,0778	0,0629

Les deux modèles construits présentent des performances équivalentes sur les fermentations de calibration. L'utilisation de fermentations de calibration peut permettre de discriminer les deux modèles.

VI.A.3. Validation et comparaison des modèles

Les deux modèles ont été validés sur les données de trois fermentations anisothermes dont les conditions expérimentales sont présentées dans le chapitre matériel et méthodes.

La Figure V.60 montre les données expérimentales et simulées par les modèles avec et sans discontinuité pour les fermentations de validation. Graphiquement, le modèle discontinu simule mieux la cinétique de la production d'acétate d'isoamyle que le modèle continu. Pour les fermentations S12 et S13, le modèle continu sous-estime la

production finale de l'acétate d'isoamyle de 30% et de 28% par rapport à la valeur expérimentale respectivement alors que le modèle discontinu estime bien la production finale d'acétate d'isoamyle et la cinétique de la production d'acétate d'isoamyle. De plus, pour les fermentations S12 et S13, un retard dans la production expérimentale en acétate d'isoamyle est observé après l'ajout d'azote. Ce retard s'explique par l'augmentation de la température après l'ajout d'azote ce qui ralentit la production d'acétate d'isoamyle. Par contre, quand la température diminue (fermentation S11), l'effet de l'ajout d'azote est observé sans retard. Cet éventuel retard dû à la variation de la température en cours de culture n'est pas pris en compte dans les modèles et n'est donc pas observé sur les simulations. Pour la fermentation S11, le modèle discontinu surestime la production de l'acétate d'isoamyle de 14% par rapport à la valeur expérimentale en fin de fermentation alors que le modèle continu estime bien la production finale en acétate d'isoamyle. Cependant pour cette même fermentation, le modèle discontinu estime mieux la cinétique de production de l'acétate d'isoamyle que le modèle continu notamment pendant la variation de la température entre 60 et 120 heures. En effet, expérimentalement l'ajout d'azote et la diminution de la température de 25 à 20°C (entre 59 et 108 heures) conduit à une augmentation de la production d'acétate d'isoamyle et l'augmentation de la température de 20 à 23°C (entre 108 et 133 heures) conduit à une phase pendant laquelle la vitesse expérimentale de production de l'acétate d'isoamyle était constante mais ces effets ne sont pas observés sur les simulations des données.

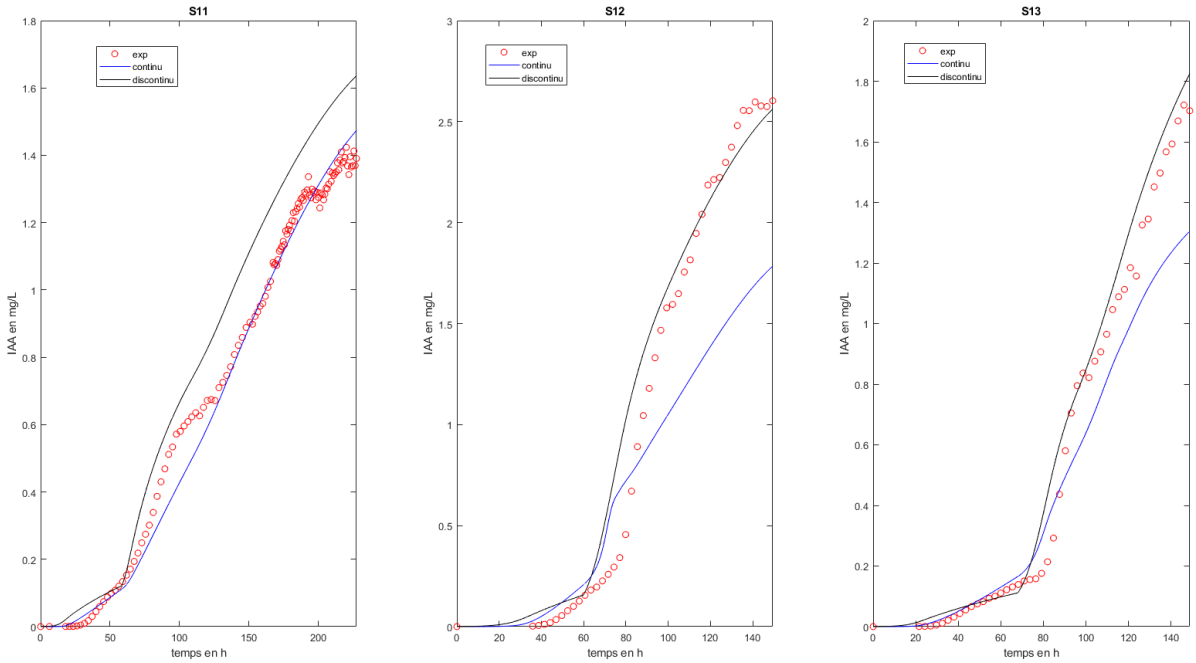


Figure V.60 Données expérimentales (points rouges) et simulées par les modèles avec discontinuité (ligne continue noire) et sans discontinuité (ligne continue bleue) de la production totale en acétate d'isoamyle pour les trois fermentations anisothermes de validation.

Le Tableau V.38 montre les valeurs de NRMSE pour la production de l'acétate d'isoamyle calculées pour les données des fermentations de validation et les données simulées par les modèles discontinu et continu. Ces données confirment les résultats vus graphiquement (cf. Figure V.60) : le modèle continu simule mieux la fermentation S11 et le modèle discontinu simule mieux les fermentations S12 et S13. Si la valeur moyenne de NRMSE pour chaque modèle est considérée (0,0847 et 0,115 pour les modèles discontinu et continu respectivement), le modèle discontinu présente globalement une meilleure adéquation aux données de validation que le modèle continu. Les deux modèles ont été construits à partir de fermentations isothermes à différentes températures. Ils prennent en compte l'effet de la température mais pas l'effet d'une variation de température en cours de fermentation.

Tableau V.38 Valeurs de NRMSE pour la production totale de l'acétate d'isoamyle pour les modèles discontinu et continu pour les fermentations de validation.

Fermentations	Modèle discontinu	Modèle continu
S11	0,123	0,0391
S12	0,0785	0,203
S13	0,0538	0,103

VI.A.4. Conclusion

Deux modèles dynamiques pour décrire la production d'acétate d'isoamyle ont été construits. Pour les deux modèles, la vitesse de production de l'acétate d'isoamyle est couplée à la vitesse de consommation du sucre. Pour le premier modèle, le rendement de conversion du sucre en acétate d'isoamyle présente une discontinuité lors de l'ajout d'azote alors que le rendement du deuxième modèle est défini par une fonction continue. Le modèle avec discontinuité comprend plus de paramètres que le modèle sans discontinuité : douze paramètres (D_1 à D_{12}) pour le modèle avec discontinuité contre trois paramètres ($Y_{IAA,max}$, α_{IAA} et K_{rCO2}) pour le modèle sans discontinuité. Selon les coefficients NRMSE, les deux modèles ont un bon ajustement pour l'ensemble des fermentations de calibration mais le modèle avec discontinuité est légèrement meilleur pour les fermentations avec une concentration initiale en azote faible et le modèle sans discontinuité est meilleur pour les fermentations avec une concentration initiale en azote élevée. Les données de trois fermentations anisothermes ont permis de valider les deux modèles. Le modèle avec discontinuité présente une meilleure adéquation aux données de validation que le modèle sans discontinuité selon le coefficient NRMSE. Cependant les fermentations de validation ont été faites avec une concentration initiale en azote faible ou moyenne (90 ou 150 mg/L) et le modèle avec discontinuité a un meilleur ajustement pour les fermentations de calibration avec une concentration initiale en azote faible. Il faudrait comparer les deux modèles construits sur une fermentation de validation réalisée avec une concentration initiale en azote élevée.

VI.B. Modélisation de la synthèse des autres arômes

Dans cette partie, un modèle avec discontinuité de la production des quatre autres arômes considérés (alcool isoamylique, isobutanol, hexanoate d'éthyle et octanoate d'éthyle) est établi. La construction de ce modèle se base sur le modèle avec discontinuité de production de l'acétate d'isoamyle proposé dans le paragraphe précédent.

VI.B.1. Construction du modèle

La relation entre la vitesse de production des quatre arômes considérés et la vitesse de consommation du sucre est conservée telle que décrite dans le modèle de Mouret et al. (2015) car elle n'est pas modifiée par l'ajout d'azote (cf. eq V.14).

$$\frac{dArome}{dt} = -Y_{arome}\frac{dS}{dt} \qquad (V.14)$$

Avec Y_{arome} le rendement de conversion du sucre en arôme en g_{arome}/g_S.

Ce rendement est déterminé en deux parties comme pour le modèle avec discontinuité de production d'acétate d'isoamyle : avant et après ajout d'azote. Pour l'alcool isoamylique, l'hexanoate d'éthyle et l'octanoate d'éthyle, le logarithme népérien du rendement de conversion du sucre en arôme (Y_{arome}) est calculé à partir de la concentration totale en azote (avant l'ajout, la concentration initiale et après ajout la concentration initiale et la concentration ajoutée) et de la température de fermentation (cf. eq V.15) avec une équation semblable à celle proposée pour l'acétate d'isoamyle.

$$ln(Y_{arome}) = \begin{cases} D_1 + D_2N_0 + D_3T + D_4N_0^2 + D_5T^2 + D_6N_0T \quad avant\ ajout \\ D_7 + D_8(N_0 + N_{aj}) + D_9T + D_{10}(N_0 + N_{aj})^2 + D_{11}T^2 + D_{12}(N_0 + N_{aj})T \quad après\ ajout \end{cases} \qquad (V.15)$$

Pour l'isobutanol, l'équation (12) est modifiée pour intégrer deux termes supplémentaires (effet linéaire et effet quadratique) dépendant de la concentration en azote ajouté dans la deuxième phase de production après l'ajout d'azote (cf. eq V.16).

$$ln(Y_{isobutanol}) = \begin{cases} D_1 + D_2N_0 + D_3T + D_4N_0^2 + D_5T^2 + D_6N_0T \quad avantajout \\ D_7 + D_8(N_0 + N_{aj}) + D_9T + D_{10}(N_0 + N_{aj})^2 + D_{11}T^2 + D_{12}(N_0 + N_{aj})T + D_{13}N_{aj} + D_{14}N_{aj}^2 \quad après ajout \end{cases} \quad (V.16)$$

Le Tableau V.39 présente les valeurs des paramètres pour l'isobutanol, l'alcool isoamylique, l'hexanoate d'éthyle et l'octanoate d'éthyle après calibration et elles sont comparées aux valeurs du modèle de Mouret et al. (2015). Pour les paramètres D_{13} et D_{14} de l'équation du rendement de conversion du sucre en isobutanol, le modèle de Mouret et al. (2015) n'a pas de paramètres équivalents ni aucun autre modèle de la littérature. La plupart des paramètres du modèle sont du même ordre de grandeur que les valeurs du modèle de Mouret et al. (2015) pour les 4 arômes mais la valeur de quelques paramètres sont éloignées des valeurs du modèle de Mouret et al. (2015).

Tableau V.39 Comparaison des valeurs des paramètres du modèle avec discontinuité avec les valeurs des paramètres du modèle de Mouret et al. (2015)pour l'isobutanol, l'alcool isoamylique, l'hexanoate d'éthyle et l'octanoate d'éthyle.

Paramètres	Isobutanol		Alcool isoamylique		Hexanoate d'éthyle		Octanoate d'éthyle	
	Calibrés	Mouret	Calibrés	Mouret	Calibrés	Mouret	Calibrés	Mouret
D_1	-2,8891	-3,35	-1,484	-1,24	-14,6361	-15,7	-11,8411	-3,68
D_2	$-8{,}081.10^{-4}$	$-2{,}64.10^{-3}$	$-3{,}2735.10^{-3}$	$-6{,}4.10^{-3}$	$-1{,}5206.10^{-2}$	$-1{,}5.10^{-3}$	$-7{,}2466.10^{-4}$	$-2{,}04.10^{-3}$
D_3	$8{,}923.10^{-2}$	0,1	$1{,}5267.10^{-1}$	$1{,}61.10^{-1}$	$8{,}8641.10^{-1}$	$8{,}46.10^{-1}$	$-1{,}9851.10^{-1}$	$-1{,}42.10^{-1}$
D_4	$-3{,}507.10^{-6}$	$-3{,}2.10^{-6}$	$2{,}0062.10^{-5}$	$1{,}24.10^{-5}$	0	0	0	0
D_5	0	0	$-3{,}4674.10^{-3}$	$-2{,}67.10^{-3}$	$-2{,}2942.10^{-2}$	$-2{,}3.10^{-2}$	$1{,}2447.10^{-2}$	$1{,}74.10^{-3}$
D_6	$-3{,}4829.10^{-5}$	$-1{,}44.10^{-4}$	$-1{,}1276.10^{-4}$	$-1{,}14.10^{-4}$	$9{,}0534.10^{-4}$	$9{,}37.10^{-4}$	$4{,}5714.10^{-4}$	$1{,}41.10^{-3}$
D_7	-9,3812	-9,02	-4,5263	-4,26	-7,9601	-7,97	-9,1797	-9,87
D_8	$2{,}106.10^{-2}$	$2{,}05.10^{-2}$	$7{,}8371.10^{-3}$	$8{,}14.10^{-4}$	$5{,}0386.10^{-3}$	$4{,}72.10^{-3}$	$7{,}4241.10^{-3}$	$8{,}48.10^{-3}$
D_9	0,44363	0,368	$3{,}2446.10^{-1}$	$3{,}14.10^{-1}$	$1{,}539.10^{-1}$	$1{,}56.10^{-1}$	$3{,}4159.10^{-1}$	$3{,}08.10^{-1}$
D_{10}	$-1{,}9009.10^{-5}$	$-2{,}25.10^{-5}$	$-2{,}5424.10^{-5}$	$-1{,}78.10^{-5}$	0	0	$-1{,}3004.10^{-5}$	$-1{,}06.10^{-5}$
D_{11}	$-4{,}8188.10^{-3}$	$-4{,}28.10^{-3}$	$-6{,}682.10^{-3}$	$-6{,}25.10^{-3}$	$-2{,}3992.10^{-3}$	$-2{,}48.10^{-3}$	$-9{,}1197.10^{-3}$	$-6{,}19.10^{-3}$
D_{12}	$-3{,}517.10^{-3}$	$-3{,}45.10^{-5}$	0	0	$-2{,}2078.10^{-4}$	$-1{,}55.10^{-4}$	$-6{,}6806.10^{-5}$	$-5{,}78.10^{-5}$
D_{13}	$3{,}517.10^{-3}$	-	-	-	-	-	-	-
D_{14}	$-4{,}4611.10^{-5}$	-	-	-	-	-	-	-

Pour l'octanoate d'éthyle, les seuls paramètres dont l'ordre de grandeur n'est pas le même que pour le modèle de Mouret et al. (2015) sont D_5 et D_6. Ces paramètres correspondent respectivement à l'effet quadratique de la température et à l'effet croisé de la température et de la concentration initiale en azote.

Pour l'hexanoate d'éthyle, seule la valeur de D_2 n'est pas du même ordre de grandeur que celle du modèle de Mouret et al. (2015). Ce paramètre correspond à l'effet linéaire de la concentration initiale en azote dans la première phase de production.

Pour l'octanoate d'éthyle et l'hexanoate d'éthyle, les valeurs des paramètres de la deuxième phase de production après l'ajout d'azote sont du même ordre de grandeur que celles du modèle de Mouret et al. (2015). Ce résultat peut être surprenant car dans l'étude de Mouret et al. (2015) l'ajout d'azote n'est pas pris en compte alors que l'ajout d'azote est considéré dans cette étude.

Pour l'alcool isoamylique, la valeur du paramètre D_8 n'a pas le même ordre de grandeur que celle du modèle de Mouret et al. (2015). Ce paramètre correspond à la concentration totale en azote (concentration initiale et

concentration ajoutée). L'ajout d'azote semble donc avoir un effet important sur la production d'alcool isoamylique.

Pour l'isobutanol, les paramètres dont la valeur n'est pas du même ordre que celle du modèle de Mouret et al. (2015) sont D_6 et D_{12}. D_6 correspond à l'effet croisé de la température et de la concentration initiale en azote dans la première phase de production avant ajout et D_{12} à l'effet croisé de la température et de la concentration totale en azote (concentration initiale et concentration ajoutée) lors de la deuxième phase de production, après l'ajout d'azote. Pour D_{12}, cette modification peut venir de l'ajout d'azote qui modifie la concentration totale en azote.

VI.B.2. Simulation des fermentations de calibration

Les Figure 61 à Figure 76 montrent les données simulées par le modèle avec discontinuité et expérimentales de la production totale d'isobutanol, d'alcool isoamylique, d'hexanoate d'éthyle et d'octanoate d'éthyle pour les fermentations de calibration. L'hexanoate d'éthyle est l'arôme le mieux simulé et l'octanoate d'éthyle est l'arôme le moins bien simulé.

La production finale d'isobutanol (cf. Figure 61, Figure 62, Figure 63 et Figure 64) est surestimée par le modèle pour trois fermentations (de 41%, de 50% et de 32% d'écart relatif de la valeur simulée à la valeur expérimentale pour MS70_50_23C, pour MS70_100_28C et pour MS70_150_23C respectivement) et est sous-estimée pour quatre conditions expérimentales (l'écart relatif de la valeur simulée à la valeur expérimentale est compris entre 28% et 31% par rapport à la valeur expérimentale pour le triplicat, de 23% pour MS140_150_18C et de 26% pour MS140_150_28C). La cinétique de production et la production finale d'isobutanol sont bien simulées pour les autres fermentations. La production d'isobutanol est donc correctement simulée pour l'ensemble des fermentations.

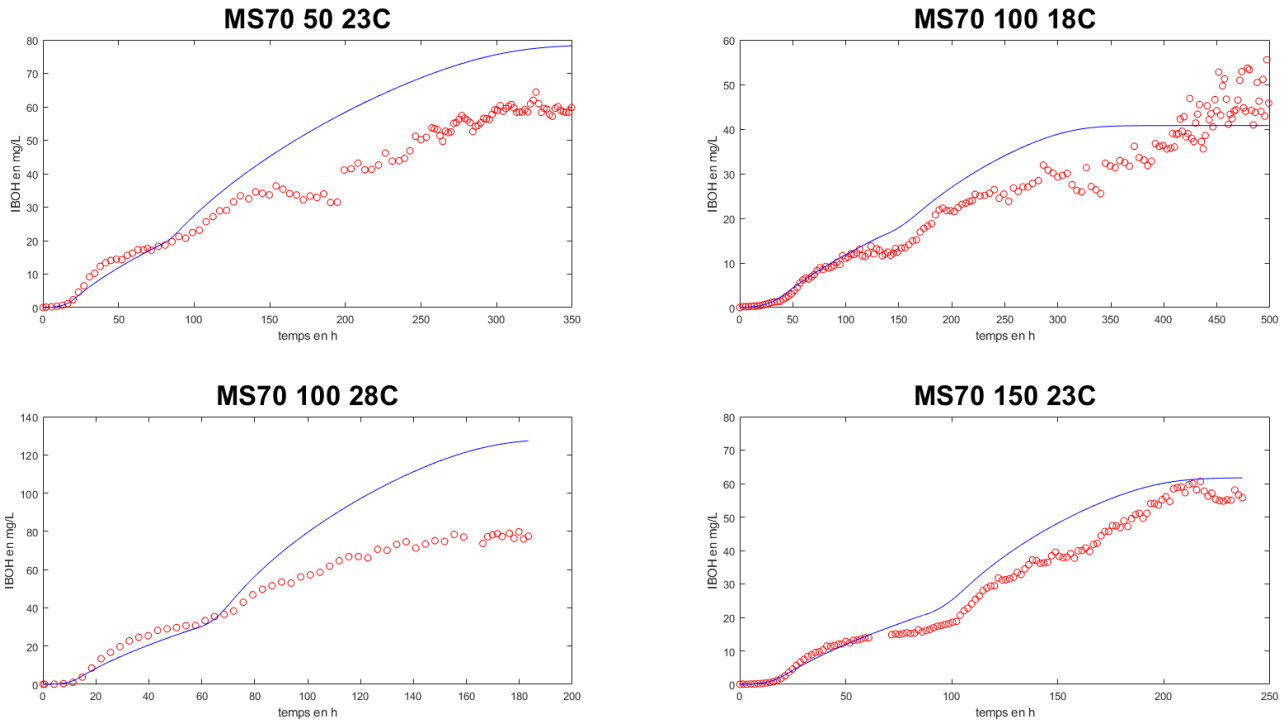


Figure 61 Données expérimentales (points rouges) et simulées (ligne bleue continue) par le modèle avec discontinuité de la production totale d'isobutanol pour les fermentations de calibration avec une concentration initiale en azote de 70 mg/L.

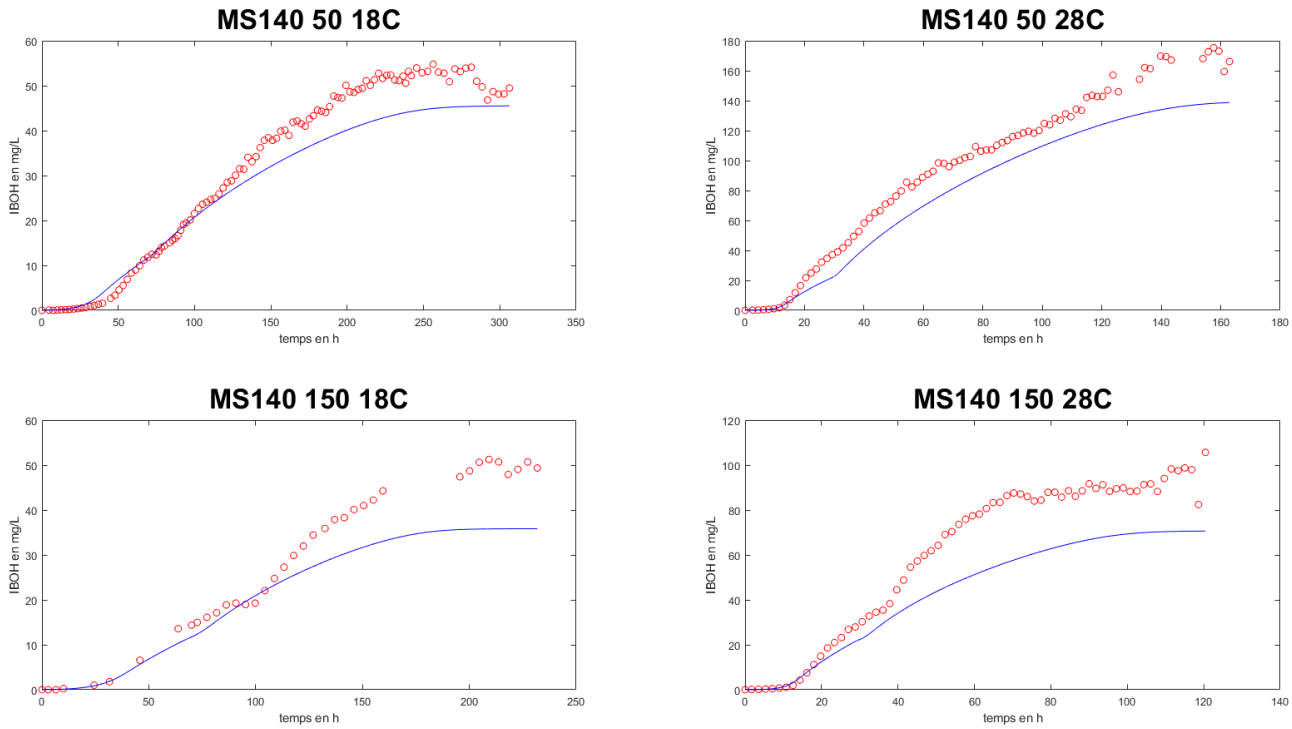


Figure 62 Données expérimentales (points rouges) et simulées (ligne bleue continue) par le modèle avec discontinuité de la production totale d'isobutanol pour les fermentations de calibration avec une concentration initiale en azote de 140 mg/L.

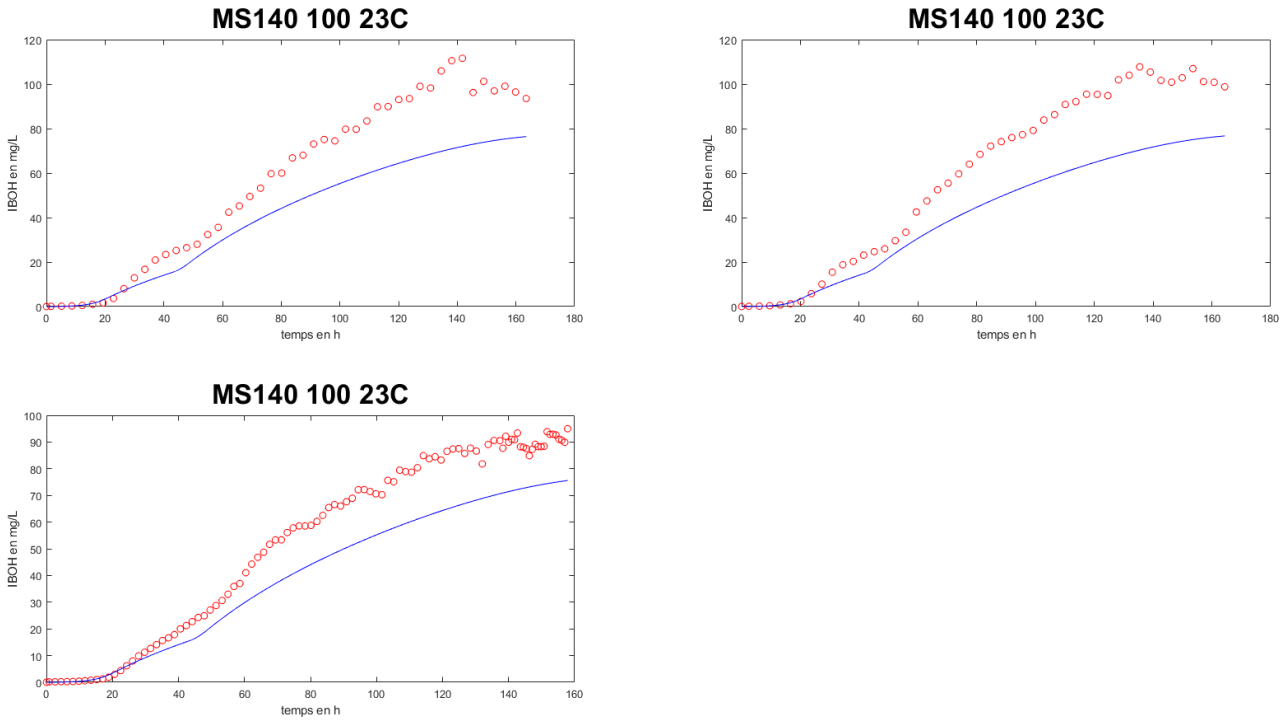


Figure 63 Données expérimentales (points rouges) et simulées (ligne bleue continue) par le modèle avec discontinuité de la production totale d'isobutanol pour les fermentations de calibration du triplicat.

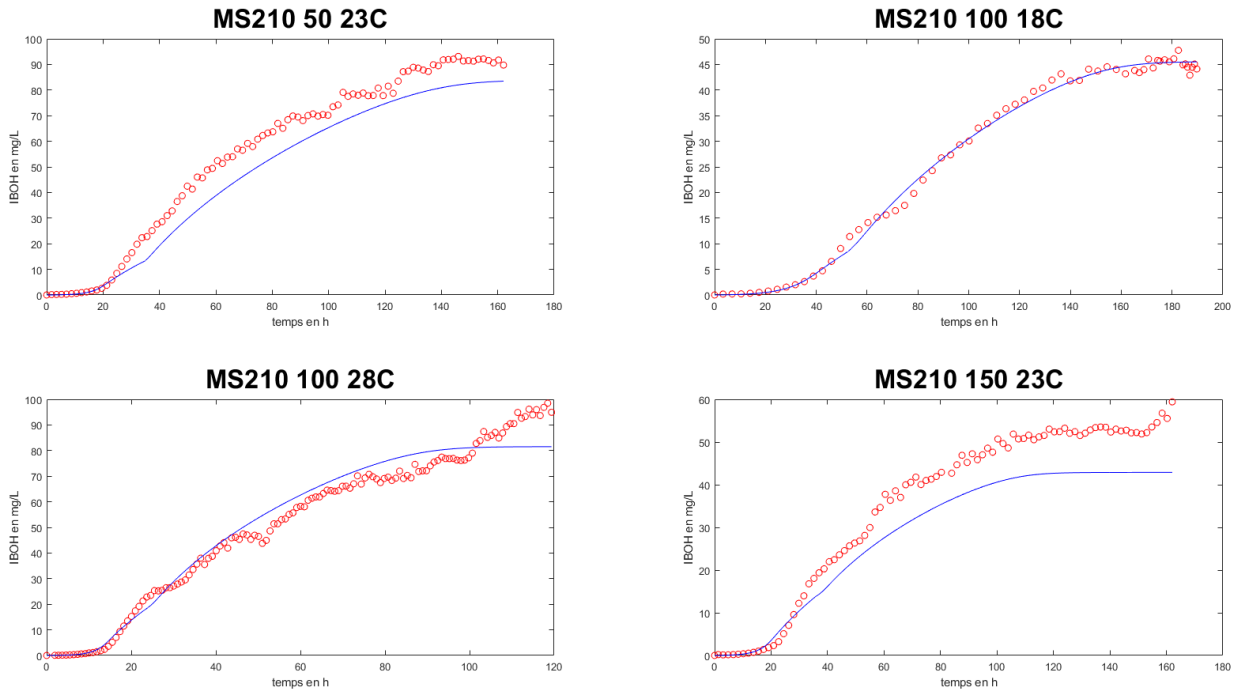


Figure 64 Données expérimentales (points rouges) et simulées (ligne bleue continue) par le modèle avec discontinuité de la production totale d'isobutanol pour les fermentations de calibration avec une concentration initiale en azote de 210 mg/L.

Le modèle sous-estime la production finale d'alcool isoamylique (cf. Figure 65, Figure 66, Figure 67 et Figure 68) pour deux fermentations (l'écart relatif de la valeur simulée à la valeur expérimentale est de 31% pour MS140_50_28C et de 21% pour MS210_50_23C) et simule mal la dynamique de production pour deux fermentations (MS70_100_28C et MS70_150_23C). Pour la fermentation MS70_100_18C, la production finale en alcool isoamylique est surestimée par le modèle avec un écart relatif à la valeur expérimentale de 60%, cependant les données de la fermentation MS70_100_18C présente certainement un biais de mesure car elles montrent une augmentation de la production totale de l'alcool isoamylique en toute fin de fermentation alors que l'activité des levures est faible (production de CO_2 très faible) et que cette augmentation ne correspond pas à un ajout d'azote ou à une modification de la température. Sur l'ensemble des fermentations de calibration, la production de l'alcool isamylique est assez bien simulée.

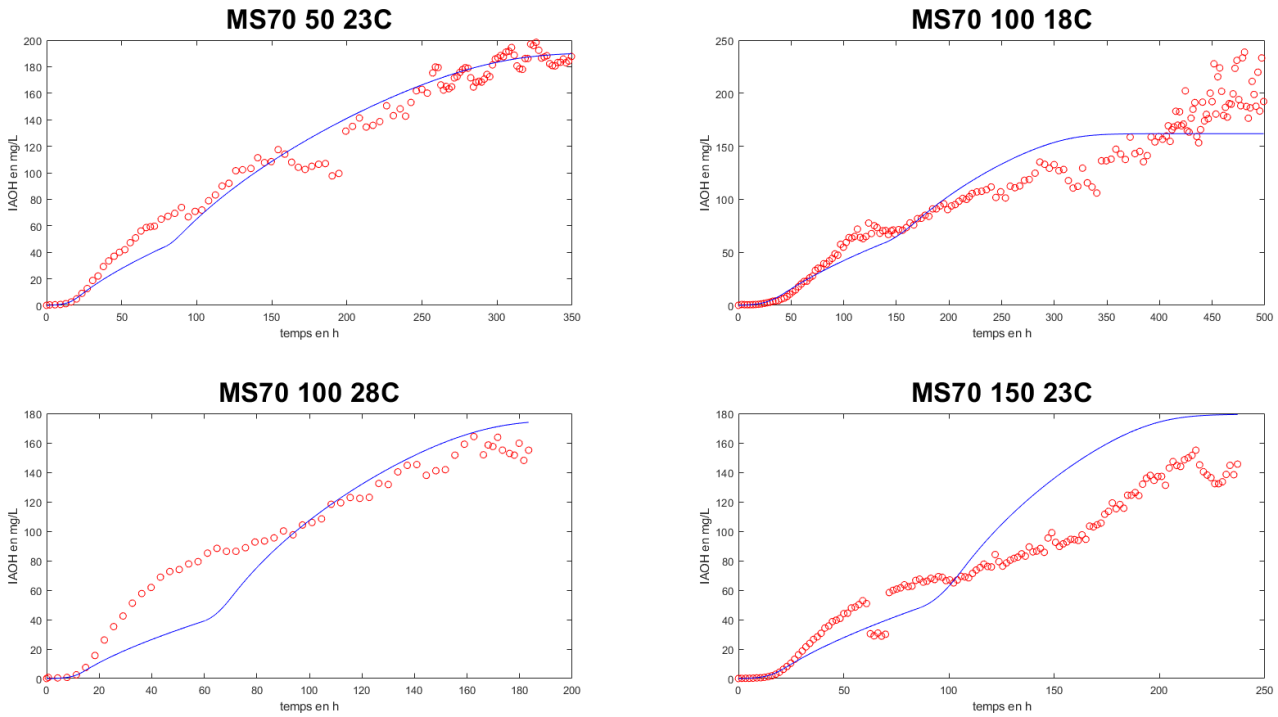


Figure 65 Données expérimentales (points rouges) et simulées (ligne bleue continue) par le modèle avec discontinuité de la production totale d'alcool isoamylique pour les fermentations avec une concentration initiale en azote de 70 mg/L.

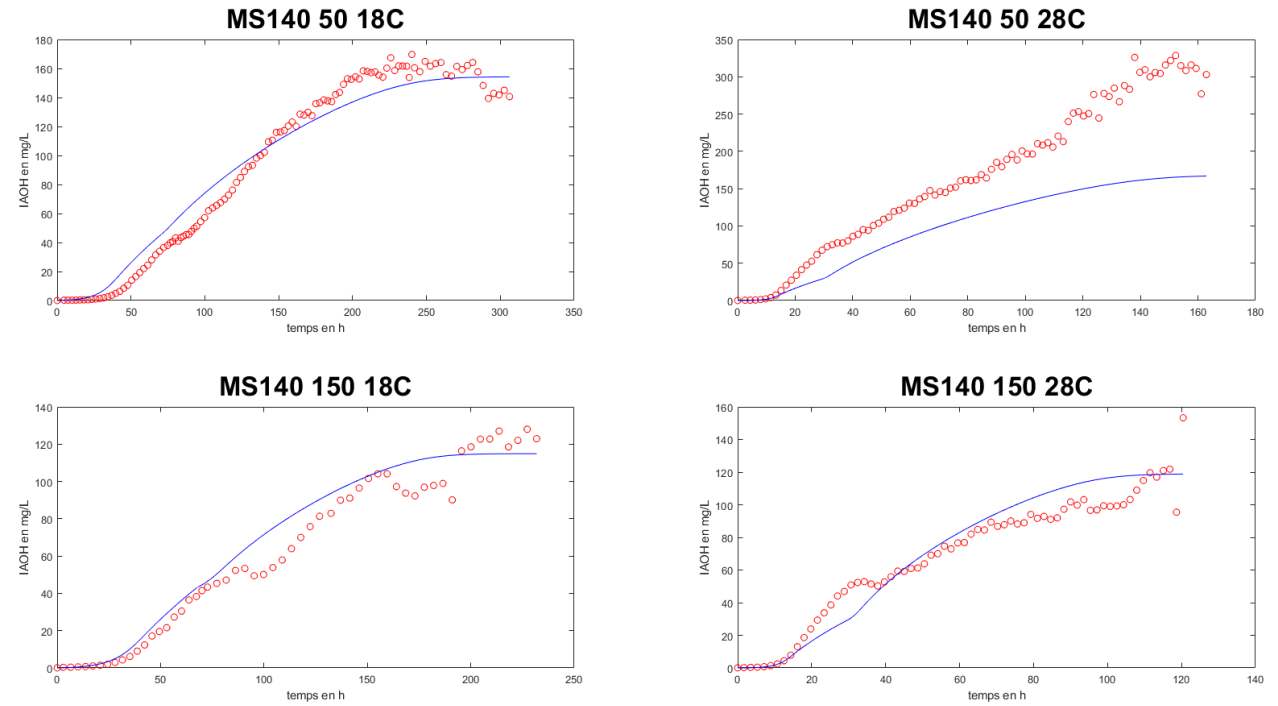


Figure 66 Données expérimentales (points rouges) et simulées (ligne bleue continue) par le modèle avec discontinuité de la production totale d'alcool isoamylique pour les fermentations avec une concentration initiale en azote de 140 mg/L.

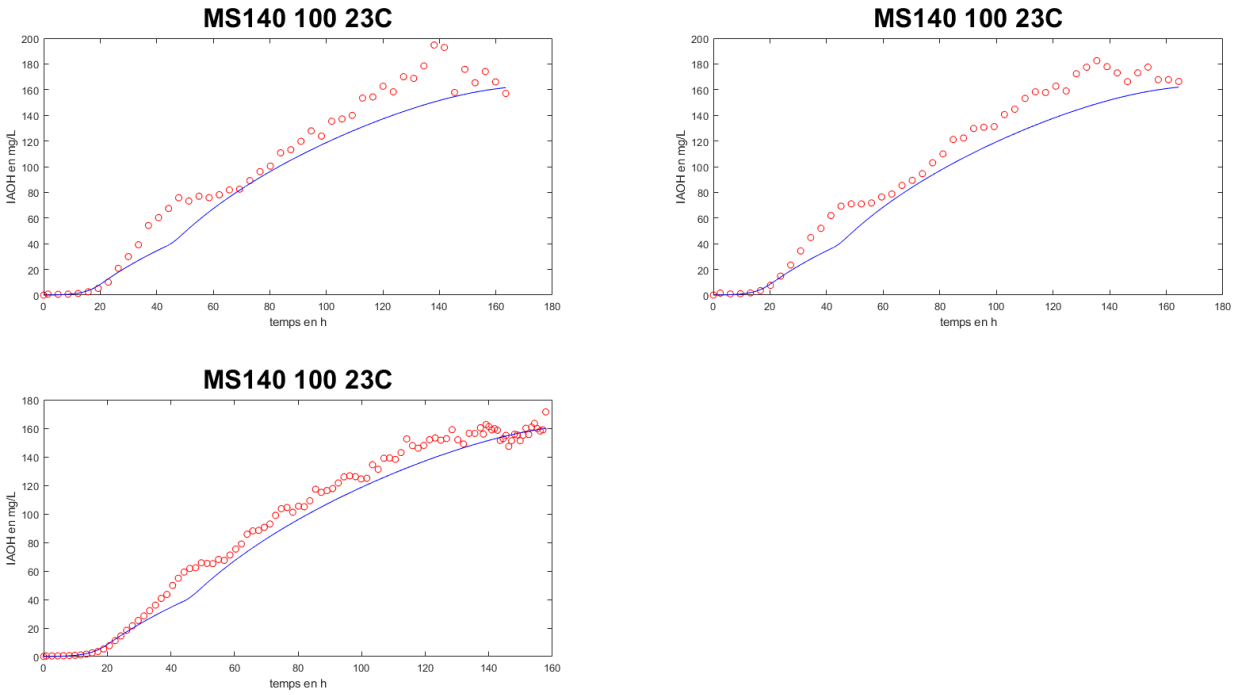


Figure 67 Données expérimentales (points rouges) et simulées (ligne bleue continue) par le modèle avec discontinuité de la production totale d'alcool isoamylique pour les fermentations du triplicat.

51

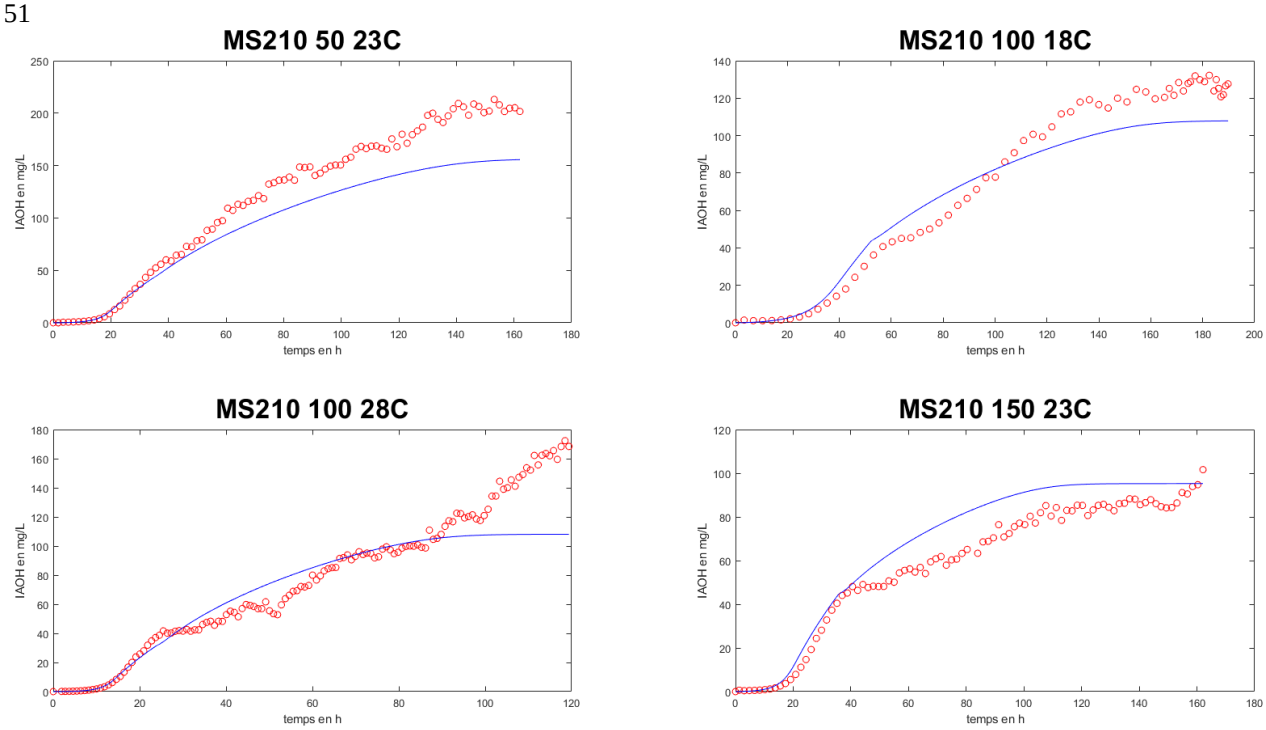


Figure 68 Données expérimentales (points rouges) et simulées (ligne bleue continue) par le modèle avec discontinuité de la production totale d'alcool isoamylique pour les fermentations avec une concentration initiale en azote de 210 mg/L.

Le modèle simule bien la dynamique de la production de l'hexanoate d'éthyle (cf. Figure 69, Figure 70, Figure 71 et Figure 72) pour l'ensemble des fermentations de calibration. Le modèle estime bien la production finale en hexanoate d'éthyle pour douze fermentations sur quinze ; le modèle sous-estime la production finale pour MS70_100_18C (l'écart relatif de la valeur simulée à la valeur expérimentale de 22%) et surestime la production finale pour MS140_100_23C_2 et MS210_150_23C (l'écart relatif de la valeur simulée à la valeur expérimentale est de 23% et de 26% respectivement).

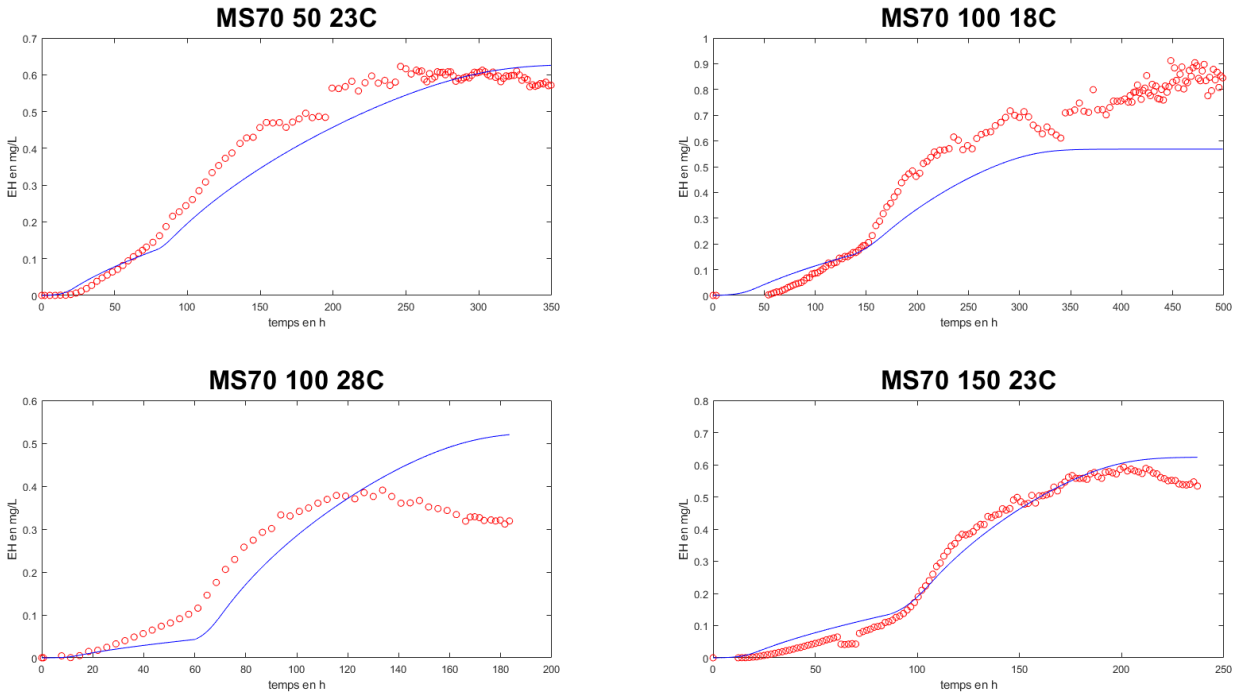


Figure 69 Données expérimentales (points rouges) et simulées (ligne bleue continue) par le modèle avec discontinuité de la production totale d'hexanoate d'éthyle pour les fermentations de calibration pour une concentration initiale en azote de 70 mg/L.

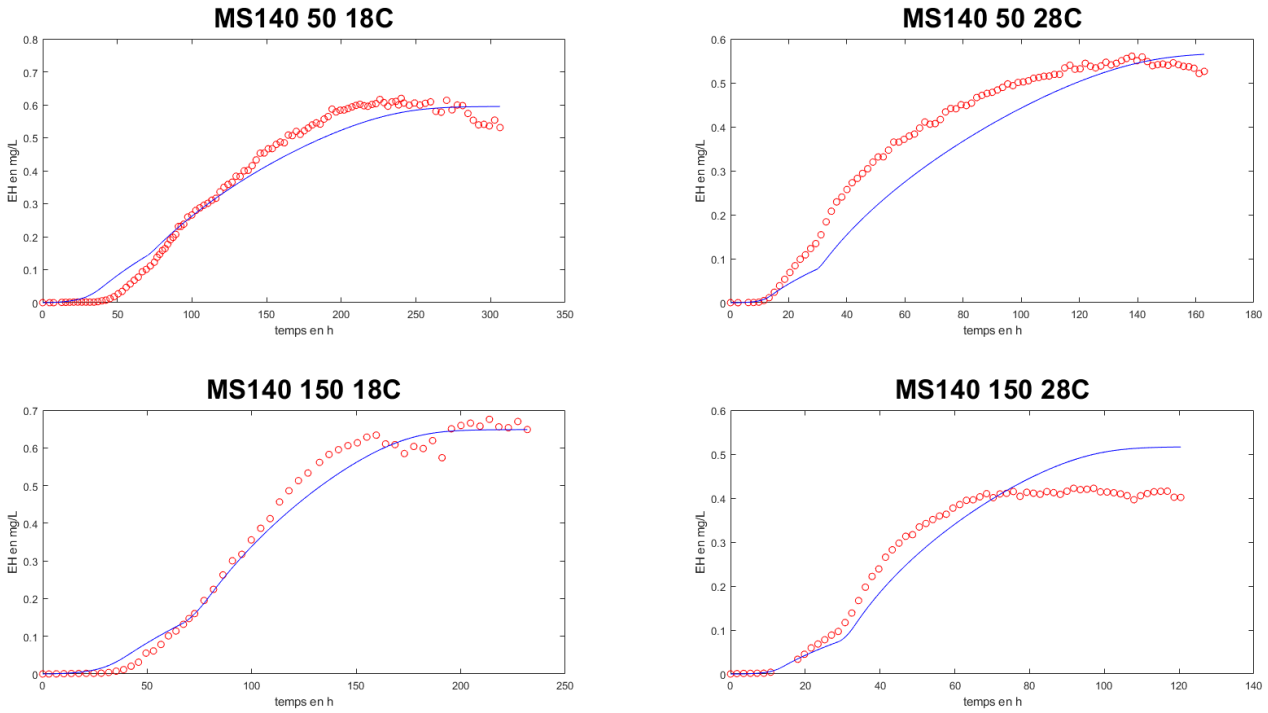


Figure 70 Données expérimentales (points rouges) et simulées (ligne bleue continue) par le modèle avec discontinuité de la production totale d'hexanoate d'éthyle pour les fermentations de calibration pour une concentration initiale en azote de 140 mg/L.

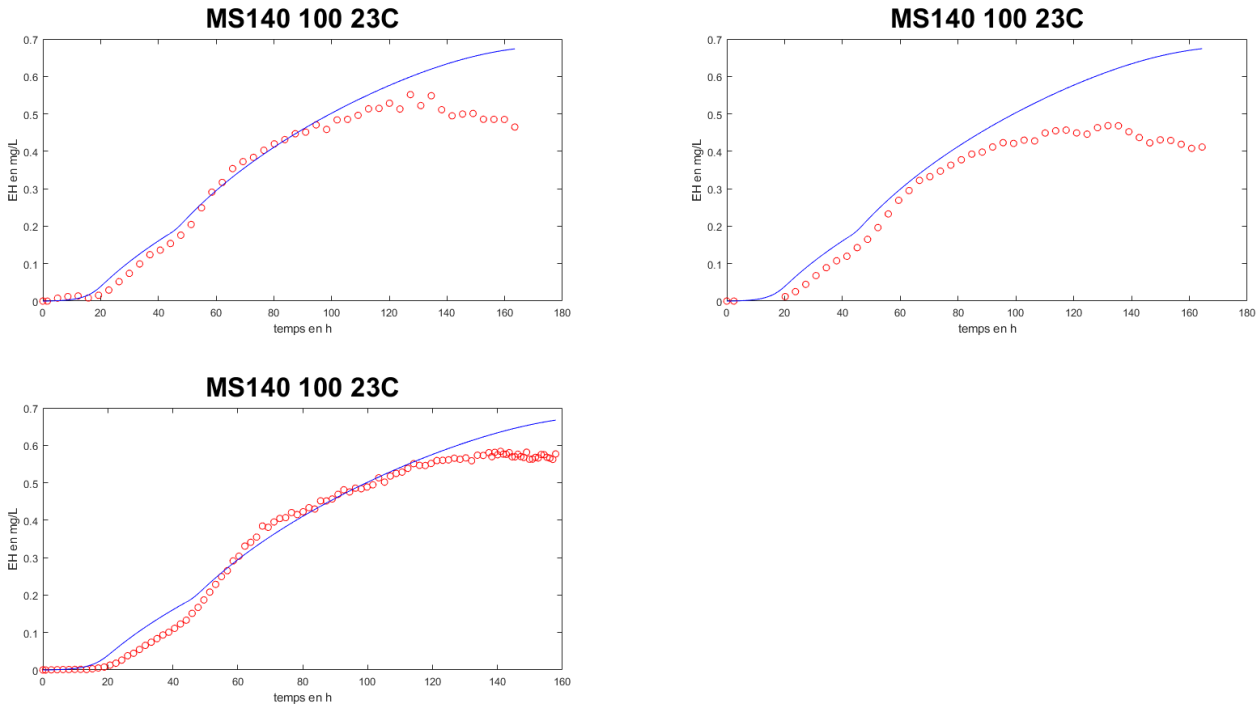


Figure 71 Données expérimentales (points rouges) et simulées (ligne bleue continue) par le modèle avec discontinuité de la production totale d'hexanoate d'éthyle pour les fermentations de calibration du triplicat.

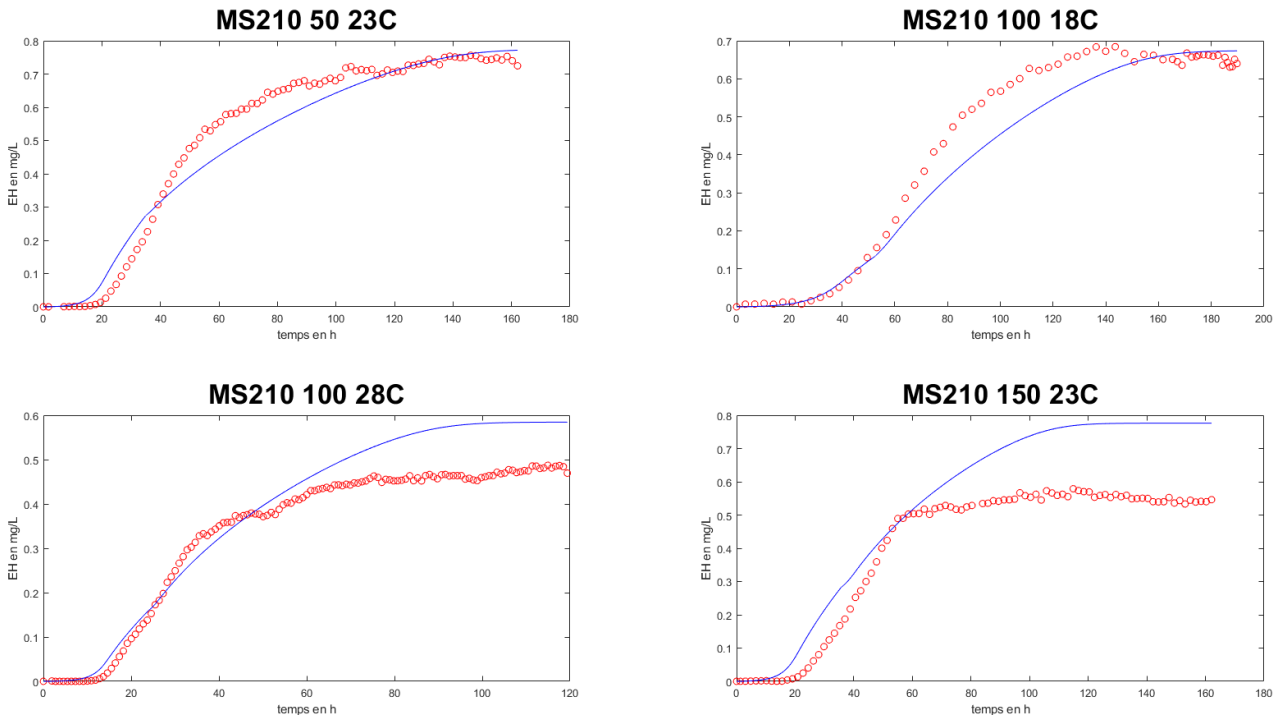


Figure 72 Données expérimentales (points rouges) et simulées (ligne bleue continue) par le modèle avec discontinuité de la production totale d'hexanoate d'éthyle pour les fermentations de calibration pour une concentration initiale en azote de 210 mg/L.

Le modèle sous-estime la production finale d'octanoate d'éthyle pour quatre fermentations (cf. Figure 73, Figure 74, Figure 75 et Figure 76) : l'écart relatif de la valeur simulée à la valeur expérimentale est de 31%, de 21%, de 45% et de 43% pour MS70_50_23C, MS140_50_18C, MS140_50_28C et MS210_50_23C. Un ajout faible en azote serait donc mal pris en compte par le modèle de synthèse de l'octanoate d'éthyle. Le modèle surestime la production finale pour trois fermentations (l'écart relatif de la valeur simulée à la valeur expérimentale est de 73%, de 22% et de 145% pour MS70_100_28C, MS70_150_23C et MS140_100_23C_2 respectivement). L'écart très

important pour la fermentation MS140_100_23C_2 provient potentiellement de problèmes de mesure expérimentales car pour MS140_100_23C_2, la production finale est de 0,183 mg/L alors que la production finale est de 0,437 mg/L et de 0,516 mg/L pour les fermentations MS140_100_23C_1 et MS140_100_23C_3 respectivement. Le modèle ne simule correctement la cinétique de production que pour trois fermentations (MS140_100_23C_3, MS140_150_18C et MS210_100_18C) avec une erreur sur le titre final inférieur à 7%. Globalement la production de l'octanoate d'éthyle est mal simulée par le modèle.

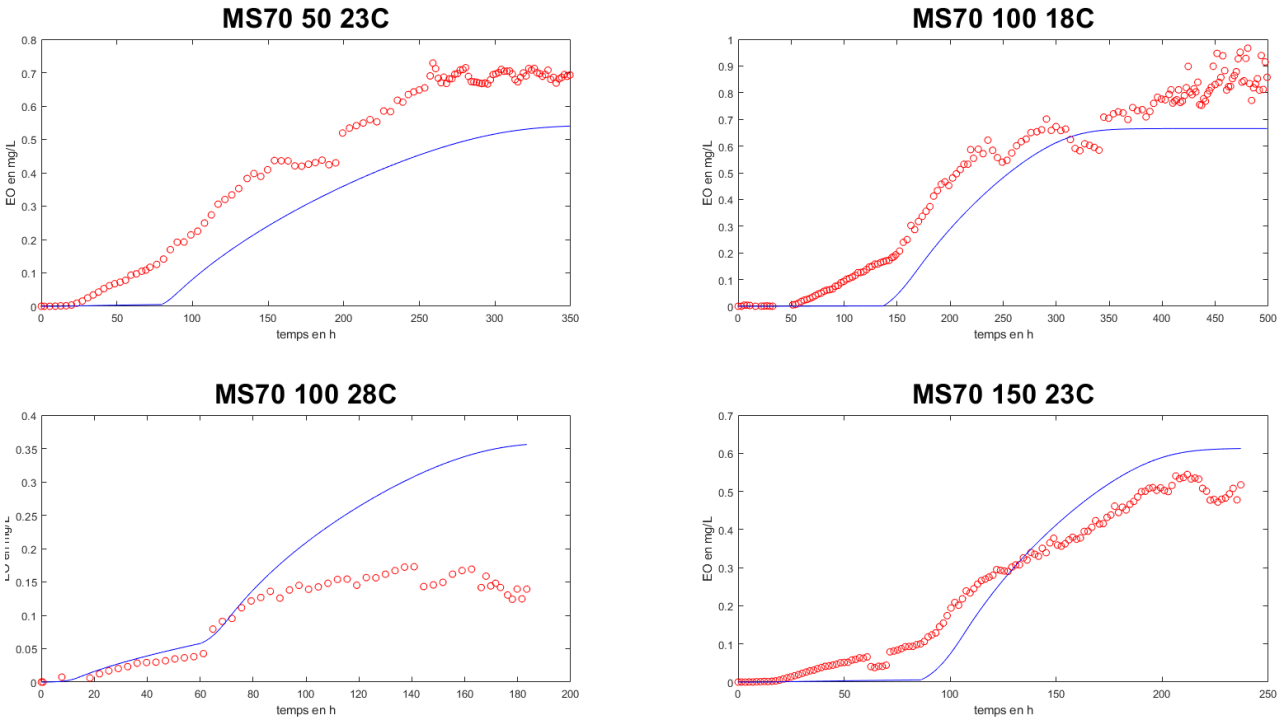


Figure 73 Données expérimentales (points rouges) et simulées (ligne bleue continue) par le modèle avec discontinuité de la production totale d'octanoate d'éthyle pour les fermentations de calibration avec une concentration initiale en azote de 70 mg/L.

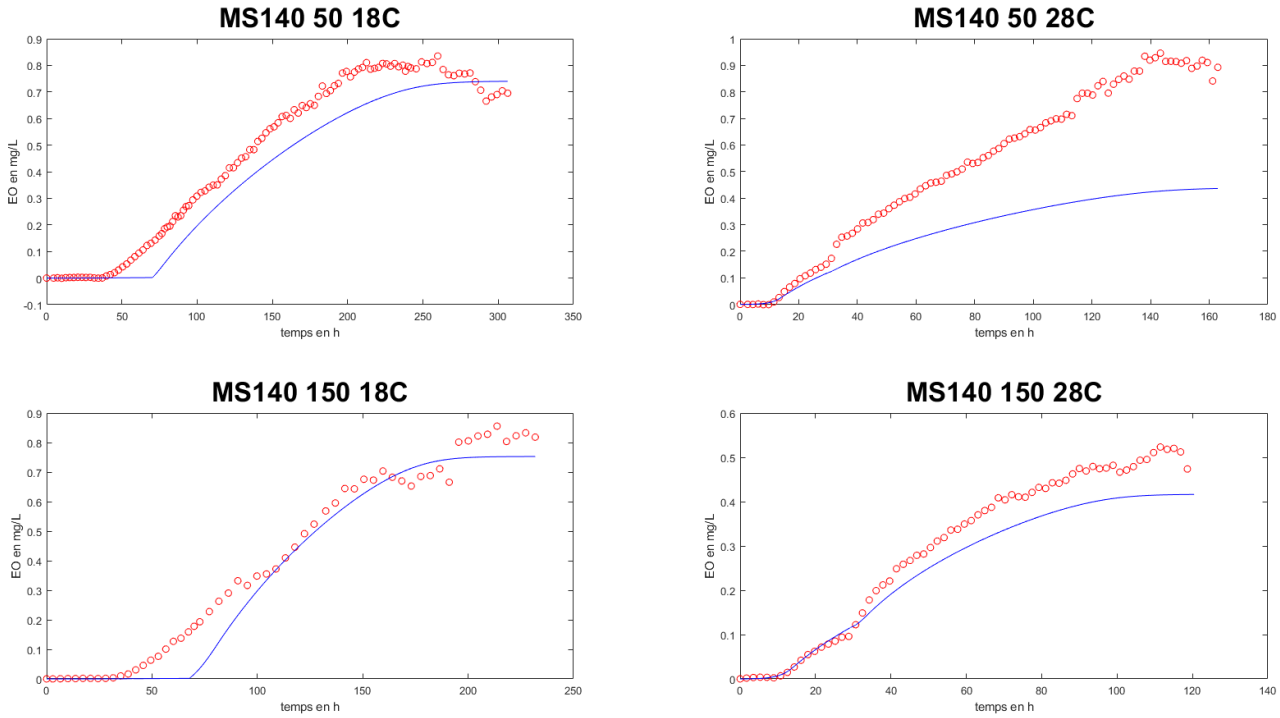


Figure 74 Données expérimentales (points rouges) et simulées (ligne bleue continue) par le modèle avec discontinuité de la production totale d'octanoate d'éthyle pour les fermentations de calibration avec une concentration initiale en azote de 140 mg/L.

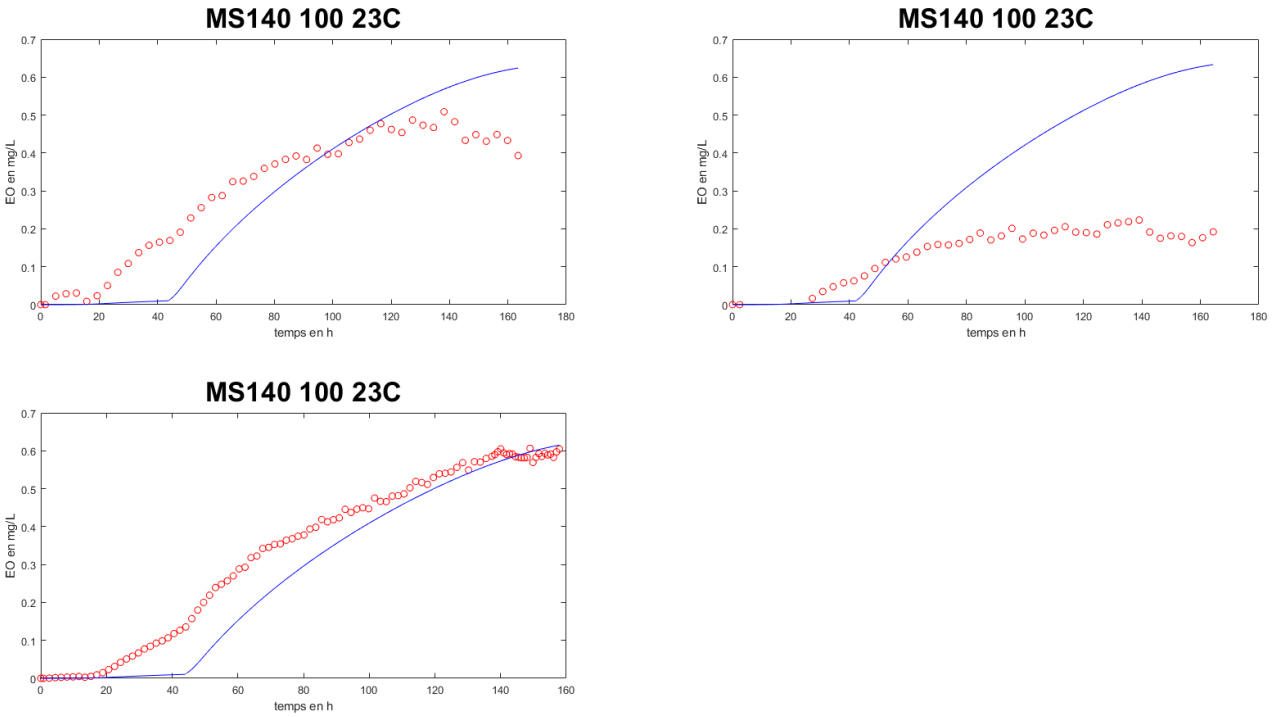


Figure 75 Données expérimentales (points rouges) et simulées (ligne bleue continue) par le modèle avec discontinuité de la production totale d'octanoate d'éthyle pour les fermentations de calibration du triplicat.

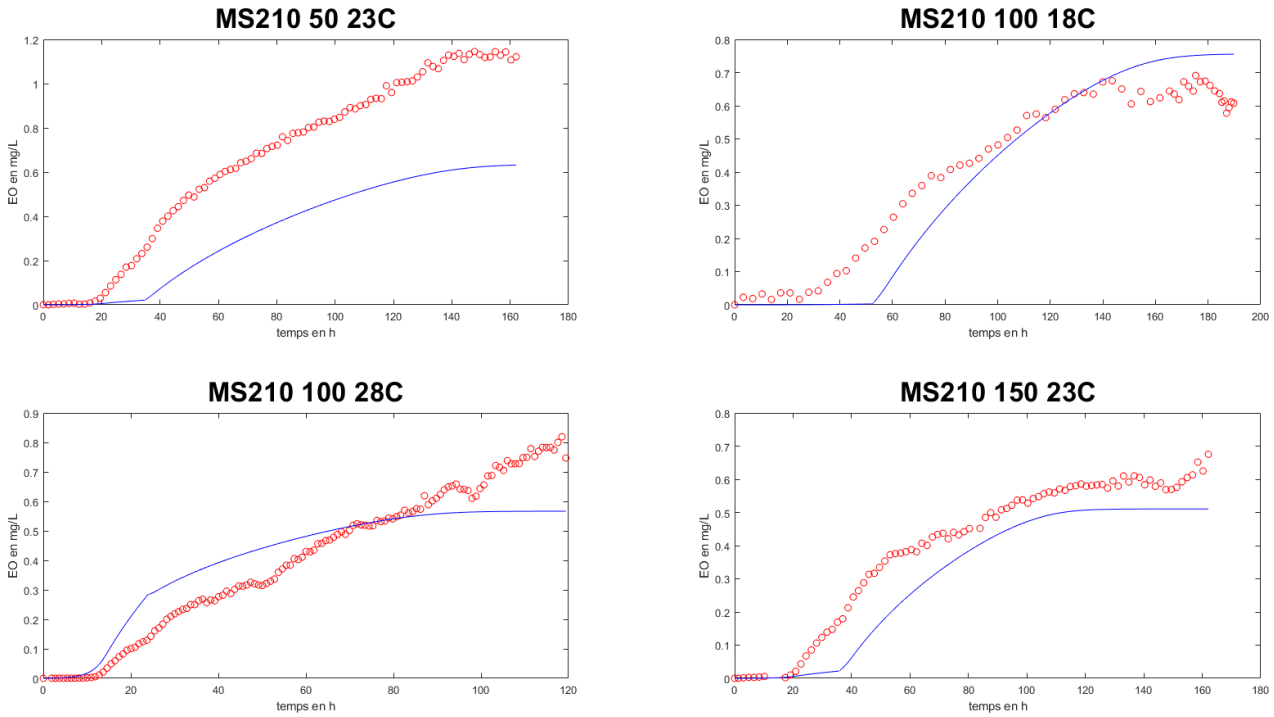


Figure 76 Données expérimentales (points rouges) et simulées (ligne bleue continue) par le modèle avec discontinuité de la production totale d'octanoate d'éthyle pour les fermentations de calibration avec une concentration initiale en azote de 210 mg/L.

VI.B.1. Adéquation du modèle aux données de calibration

Le Tableau V.39 présente les valeurs de NRMSE calculées pour le modèle avec discontinuité de production de l'isobutanol, de l'alcool isoamylique, de l'hexanoate d'éthyle et de l'octanoate d'éthyle et pour les fermentations de calibration coupées quand la production de CO_2 atteint 75 g/L.

D'après les valeurs de NRMSE, l'hexanoate d'éthyle est l'arôme le mieux simulé. Les valeurs de NRMSE pour l'hexanoate d'éthyle vont de 0,0429 à 0,151 avec une valeur moyenne de 0,0920. Sept fermentations sur quinze ont une valeur de NRMSE supérieure à 0,1. Le modèle avec discontinuité de production de l'hexanoate d'éthyle présentant donc une bonne adéquation aux données de calibration, il peut être utilisé pour simuler la production de cet arôme.

La production en isobutanol est également assez bien représentée : la valeur moyenne de NRMSE est de 0,120 et seules deux fermentations présentent des valeurs de NRMSE de plus de 0,2 (MS70_150_23C et MS120_50_18C), ce qui confirme les observations graphiques (cf. Figure 61, Figure 62, Figure 63 et Figure 64**Error! Reference source not found.**). Sur l'ensemble des données de calibration, le modèle de production d'isobutanol présente une assez bonne adéquation aux données de calibration. Les valeurs de NRMSE montrent que la production en alcool isoamylique est assez bien décrite : la valeur moyenne de NRMSE est de 0,135 et deux fermentations seulement présente une valeur de NRMSE de plus de 0,2 (MS70_50_23C et MS70_100_28C). En prenant en compte les quinze fermentations de calibration, le modèle avec discontinuité de production de l'alcool isoamylique présente une assez bonne adéquation aux données de calibration.

Les valeurs de NRMSE pour l'octanoate d'éthyle confirment les observations graphiques (cf. Figure 73, Figure 74, Figure 75 et Figure 76) : cet arôme est mal simulé par le modèle avec discontinuité. La valeur moyenne de NRMSE est de 0,212 et une seule fermentation présente une valeur de NRMSE inférieure à 0,1 (MS140_150_28C). Le modèle de production de l'octanoate d'éthyle ne présente donc pas une bonne adéquation aux données de calibration. La structure de l'équation du rendement en octanoate d'éthyle devrait donc être modifiée pour permettre une meilleure prédiction pour cette variable.

Tableau V.40 Valeurs de NRMSE du modèle avec discontinuité de production de l'isobutanol, l'alcool isoamylique, de l'hexanoate d'éthyle et de l'octanoate d'éthyle pour les fermentations de calibration

Fermentations	Isobutanol	Alcool isoamylique	hexanoate d'éthyle	octanoate d'éthyle
MS70_50_23C	0,113	0,234	0,105	0,224
MS70_100_18C	0,103	0,151	0,133	0,190
MS70_100_28C	0,193	0,209	0,134	0,277
MS70_150_23C	0,237	0,145	0,0596	0,152
MS140_50_18C	0,0769	0,0749	0,624	0,132
MS140_50_28C	0,204	0,116	0,151	0,289
MS140_100_23C_1	0,0918	0,156	0,429	0,208
MS140_100_23C_2	0,0932	0,175	0,104	0,476
MS140_100_23C_3	0,0656	0,145	0,0485	0,161
MS140_150_18C	0,0887	0,106	0,0525	0,112
MS140_150_28C	0,0948	0,196	0,0856	0,0964
MS210_50_23C	0,111	0,108	0,0948	0,321
MS210_100_18C	0,0739	0,0271	0,113	0,146
MS210_100_28C	0,101	0,0606	0,0572	0,204
MS210_150_23C	0,156	0,118	0,136	0,223

Tableau V.41 Valeurs moyennes de NRMSE pour le modèle avec discontinuité de production de l'isobutanol, l'alcool isoamylique, de l'hexanoate d'éthyle et de l'octanoate d'éthyle pour les différentes conditions expérimentales (concentration initiale en azote, concentration en azote ajouté et température).

Conditions expérimentales		Isobutanol	Alcool isoamylique	hexanoate d'éthyle	octanoate d'éthyle
Concentration initiale en azote (mg/L)	70	0,162	0,185	0,108	0,211
	140	0,102	0,138	0,0781	0,206
	210	0,111	0,0783	0,100	0,223
Concentration d'azote ajouté (mg/L)	50	0,126	0,133	0,103	0,234
	100	0,103	0,132	0,0904	0,237
	150	0,144	0,141	0,0834	0,146
Température (°C)	18	0,0857	0,0899	0,0903	0,145
	23	0,124	0,154	0,0844	0,252
	28	0,149	0,145	0,107	0,209

Le Tableau V.41 montre la moyenne des valeurs des NRMSE pour le modèle de production de l'isobutanol, de l'alcool isoamylique, de l'hexanoate d'éthyle et de l'octanoate d'éthyle pour chacune des valeurs des trois conditions expérimentales (concentration initiale d'azote, concentration d'azote ajouté et température). Concernant la concentration initiale en azote, la production en hexanoate d'éthyle est mieux simulée pour une concentration moyenne alors que la production en alcool isoamylique est mieux simulée pour une concentration élevée. Le modèle a la même précision pour la simulation de la concentration en isobutanol et en octanoate d'éthyle pour toutes les concentrations initiales en azote

Les capacités de simulation du modèle ne sont pas modifiées par la concentration en azote ajouté pour l'alcool isoamylique, l'isobutanol et l'hexanoate d'éthyle. Par contre, la production en octanoate d'étyle est mieux simulée

pour une concentration en azote ajouté élevée (valeur moyenne de NRMSE de 0,234, de 0,237 et de 0,146 pour une concentration en azote ajouté de 50, 100 et 150 mg/L respectivement).

La simulation de la production en hexanoate d'éthyle n'est pas impactée par la température de fermentation. Par contre, es capacités de prédiction du modèle de production des autres arômes sont modifiées par la température Les productions en isobutanol, en alcool isoamylique et en octanoate d'éthyle sont mieux simulées pour une température faible.

VI.B.2. Validation du modèle

La Figure V.77 présente les données simulées par le modèle avec discontinuité et expérimentales de production totale d'isobutanol, d'alcool isoamylique, d'hexanoate d'éthyle et d'octanoate d'éthyle pour les trois fermentations anisothermes de validation. Comme pour l'acétate d'isoamyle, expérimentalement un temps de retard est observé entre le timing d'ajout d'azote et l'instant où l'effet de l'ajout d'azote est observé sur les cinétiques de production des arômes pour les fermentations S12 et S13. Ce décalage temporel peut provenir de l'augmentation de la température de fermentation qui débute à l'ajout d'azote. Ce phénomène n'est pas pris en compte par le modèle. La fermentation S11 est la mieux simulée et la fermentation S12 est la moins bien simulée. Cette différence vient potentiellement plus de la vitesse de variation du profil de température des fermentations que de la concentration initiale en azote ou de la concentration en azote ajouté. En effet, le modèle a été calibré avec des fermentations isothermes et donc ne prend pas en compte l'augmentation ou la diminution de la température en cours de fermentation.

Graphiquement, l'hexanoate d'éthyle est l'arôme le mieux simulé, comme pour les données de calibration. Le modèle estime bien la production finale pour les trois fermentations de validation (l'écart relatif entre les valeurs prédite et expérimentale est de 0,7%, de 4% et de 14% pour les fermentations S11, S12 et S13 respectivement). Cependant la production est légèrement surestimée avant l'ajout d'azote et légèrement sous-estimée après ajout d'azote.

L'isobutanol est bien simulée par le modèle avec discontinuité en début de fermentation mais la vitesse de production est surestimée après l'ajout d'azote pour les fermentations S11 et S13 et conduit à une sur-estimation assez importante du titre final (l'écart relatif entre les valeurs finales prédite et expérimentale est de 30% et de 39% respectivement). Par contre, le modèle sous-estime l'augmentation de la production d'isobutanol après l'ajout d'azote pour la fermentation S12 ce qui entraine une sous-estimation importante du titre final (l'écart relatif entre les valeurs finales prédite et expérimentale est de 32%).

Le modèle avec discontinuité simule bien la cinétique de production d'alcool isoamylique pour la fermentation S11 mais simule moins bien les fermentations S12 et S13. L'écart relatif entre la concentration finale simulée et expérimentale variée suivant les conditions expérimentales (8%, 15% et 31% pour S11, S12 et S13 respectivement). La moins bonne simulation de la fermentation S13 peut être due aux concentrations initiale et ajouté en azote. En effet, le modèle simule moins bien les fermentations de calibration ayant des concentrations initiale et ajoutée en azote proches (MS70_100_18C, MS70_100_28C et MS70_150_23C). Pour la fermentation S12, l'assez mauvaise simulation de la production de l'alcool isoamylique par le modèle avec discontinuité provient potentiellement de la variation du profil de température de la fermentation qui est assez rapide.

L'octanoate d'éthyle est l'arôme le moins bien simulé par le modèle avec discontinuité ce qui est en adéquation avec les résultats de la calibration. Le modèle estime relativement bien la production finale en octanoate d'éthyle : le modèle surestime la production finale de 12% pour S11 et sous-estime la production finale de 15% pour S12 et de 18% pour S13. Cependant la cinétique de production de l'octanoate d'éthyle est mal simulée. En effet, le modèle simule une production quasiment nulle avant l'ajout d'azote. La production simulée est donc sous-estimée pendant toute la fermentation pour S12 et S13 et la majeure partie de S11 (le modèle sous-estime la production dans les deux cents premières heures de fermentation sur 247 heures). De plus, pour les fermentations S12 et S13, la production expérimentale augmente rapidement après l'ajout d'azote avant d'atteindre un palier ce qui n'est pas observée sur les simulations.

Le Tableau V.42 montre les valeurs de NRMSE calculées pour le modèle de production totale d'isobutanol, d'alcool isoamylique, d'hexanoate d'éthyle et d'octanoate d'éthyle pour les trois fermentations de validation. La production d'hexanoate d'éthyle présente des valeurs de NRMSE faibles avec une valeur moyenne de 0,110 et des valeurs minimale et maximale de 0,0916 et de 0,135. D'après les valeurs de NRMSE, l'hexanoate d'éthyle est

l'arôme le mieux simulé. L'alcool isoamylique et l'isobutanol sont assez bien simulés selon les valeurs de NRMSE (valeur moyenne de 0,142 et de 0,194 respectivement). L'octanoate d'éthyle est l'arôme le moins bien simulé avec une valeur moyenne de NRMSE de 0,641. Cet écart est principalement dû à la production avant l'ajout d'azote : comme le montre la Figure V.77, la production d'octanoate d'éthyle simulée par le modèle avec discontinuité est quasiment nulle avant l'ajout d'azote ce qui provoque un écart pouvant être important entre les données expérimentales et simulées pour les trois fermentations de validation.

Le modèle de production est donc validé pour l'hexanoate d'éthyle, pour l'alcool isoamylique et pour l'isobutanol mais n'est pas validé pour l'octanoate d'éthyle.

Tableau V.42 Valeurs de NRMSE pour le modèle avec discontiuité de production totale d'isobutanol, d'alcool isoamylique, d'hexanoate d'éthyle et d'octanoate d'éthyle pour les trois fermentations de validation.

Fermentations	Isobutanol	Alcool isoamylique	hexanoate d'éthyle	octanoate d'éthyle
S11	0,199	0,119	0,103	0,722
S12	0,238	0,139	0,135	0,581
S13	0,145	0,167	0,0916	0,620

VI.B.1. Conclusion

Un modèle avec discontinuité a été proposé à partir du modèle de Mouret et al. (2015) et du modèle discontinu construit pour l'acétate d'isoamyle pour simuler la production totale de l'isobutanol, de l'alcool isoamylique, de l'hexanoate d'éthyle et de l'octanoate d'éthyle. Ce modèle présente une discontinuité au moment de l'ajout d'azote et la concentration en azote ajouté a été prise en compte. Le modèle a été calibré à partir de données de quinze fermentations faites avec plusieurs conditions de température, de concentration initiale en azote et de concentration en azote ajouté. Le modèle a été validé avec trois fermentations anisothermes pour la production de l'hexanoate d'éthyle, l'alcool isoamylique et l'isobutanol mais présente une mauvaise adéquation aux données de validation pour l'octanoate d'éthyle.

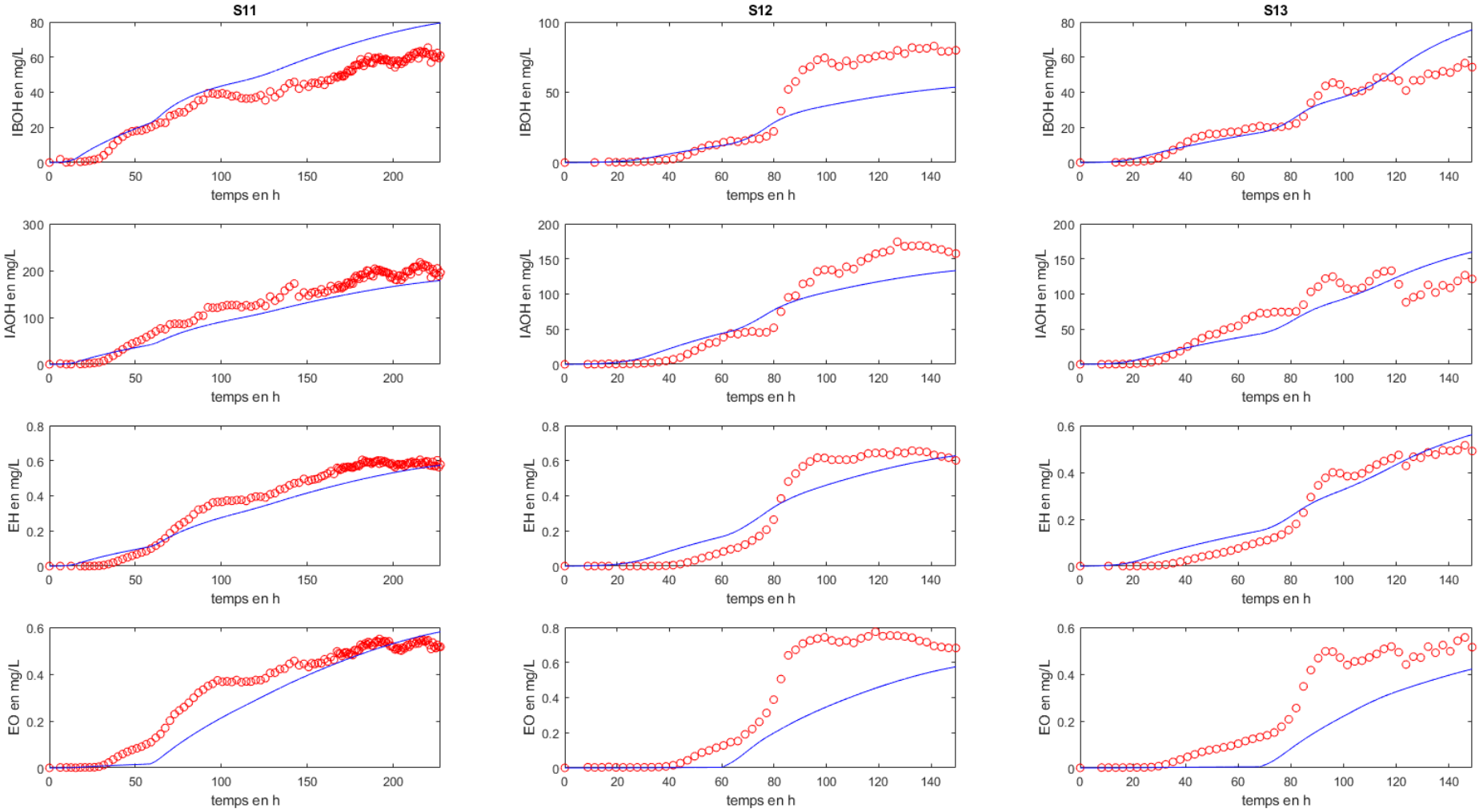


Figure V.77 Données expérimentales (point rouge) et simulées par le modèle avec discontinuités (ligne bleue continue) de la production d'isobutanol (première ligne), d'alcool isoamylique (deuxième ligne), d'hexanoate d'éthyle (troisième ligne) et d'octanoate d'éthyle (quatrième ligne). La première colonne représente les données pour la fermentation S11, la deuxième les données pour la fermentation S13 et la troisième pour la fermentation S13.

VI.C. Conclusion générale

Dans un premier temps, deux modèles de la production totale de l'acétate d'isoamyle ont été construits. Les deux modèles s'appuient sur l'étude de Mouret et al. (2014) qui établit une relation entre la production d'acétate d'isoamyle et la consommation du sucre.

Le premier modèle dérive du modèle de Mouret et al. (2015). Le rendement de conversion du sucre en acétate d'isoamyle présente une discontinuité à l'ajout d'azote avec une première phase de production faible et une deuxième phase de production plus élevée. Le rendement de conversion du sucre en acétate d'isoamyle dépend des conditions expérimentales (température, concentration initiale en azote pour les deux phases de production et concentration en azote ajouté pour la deuxième phase de production) de la fermentation.

Le deuxième modèle est construit *ex nihilo*. Dans ce modèle, le rendement de conversion du sucre en acétate d'isoamyle est défini par une fonction continue dépendant de la vitesse de dégagement de CO_2 qui est corrélée avec la concentration en azote dans le milieu de fermentation (concentration initiale et concentration ajoutée). Une relation quadratique est observée entre les trois paramètres du modèle sans discontinuité et la température.

Les deux modèles ont été calibrés à partir des données de quinze fermentations isothermes faites avec plusieurs conditions expérimentales (température, concentration initiale en azote et concentration en azote ajouté) (cf. Matériel et Méthodes). Les deux modèles présentent une adéquation globale équivalente aux données de calibration mais le modèle avec discontinuité est meilleur pour les fermentations avec une concentration initiale en azote faible et le modèle sans discontinuité est meilleur pour les fermentations avec une concentration initiale en azote élevée.

Les deux modèles ont été validés à partir des données de trois fermentations anisothermes avec des conditions expérimentales différentes (profil de température, concentration initiale en azote et concentration en azote ajouté) (cf. Matériel et Méthodes). Les deux modèles simulent bien les trois fermentations de validation mais le modèle avec discontinuité est légèrement meilleur que le modèle sans discontinuité. Ce résultat peut être dû au fait que les fermentations de validation sont faites avec une concentration initiale en azote faible ou moyenne et que le modèle avec discontinuité simule mieux les fermentations de calibration avec une concentration initiale en azote faible.

Dans un second temps, un modèle de la synthèse de quatre arômes (isobutanol, alcool isoamylique, hexanoate d'éthyle et octanoate d'éthyle) a été construit. Le modèle s'appuie sur la relation entre la production d'arômes et la consommation du sucre (Mouret et al., 2014). Il est basé sur le modèle de Mouret et al. (2015) et sur le travail effectué sur la production d'acétate d'isoamyle. Les rendements de conversion du sucre en chaque arôme présentent une discontinuité quand l'ajout d'azote est effectué. Pendant la première phase de production avant l'ajout d'azote, le rendement de conversion dépend de la température et de la concentration initiale en azote. Pendant la deuxième phase de production après l'ajout d'azote, le rendement de conversion dépend de la température, de la concentration initiale en azote et de la concentration en azote ajouté. Dans la deuxième phase de production, le rendement de conversion du sucre en isobutanol a été modifié pour intégrer deux termes supplémentaires d'effet de la concentration en azote ajouté (effets simple et quadratique).

Le modèle de la production des arômes a été calibré à partir des données de quinze fermentations isothermes faites avec différentes conditions expérimentales (température, concentration initiale en azote et concentration en azote ajouté) (cf. Matériel et Méthodes) et montre que la structure choisie est satisfaisante pour l'isobutanol, l'alcool isoamylique et l'hexanoate d'éthyle mais pas pour l'octanoate d'éthyle.

Le modèle a été validé grâce à des données de trois fermentations anisothermes faites avec différentes conditions expérimentales (profil de température, concentration initiale en azote et concentration en azote ajouté) (cf. Matériel et Méthodes). Le modèle présente une bonne adéquation aux données de validation pour l'hexanoate d'éthyle et l'isobutanol et une assez bonne adéquation pour l'alcool isoamylique mais, comme attendu, présente une mauvaise adéquation aux données de validation pour l'octanoate d'éthyle.

Le modèle de production des arômes pourra donc être utilisé pour estimer les concentrations en acétate d'isoamyle, isobutanol, alcool isoamylique, hexanoate d'éthyle mais un travail supplémentaire reste à réaliser pour modéliser la production d'octanoate d'éthyle.

VII. Conclusions et perspectives

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit s'inscrit dans un projet visant à contrôler le profil aromatique des vins pour répondre à la demande des consommateurs. Plusieurs articles présentent les composés aromatiques influençant les qualités organoleptiques des vins. Si les voies de synthèse de ces arômes sont connues, les mécanismes de régulation de leur métabolisme ne sont pas encore élucidés. Cependant il a été montré que l'ajout d'azote en cours de fermentation (autorisé par les législations française et européenne) a une influence sur leur synthèse. La régulation de la température peut également permettre d'éviter une partie de l'évaporation des arômes en cours de culture. Ainsi, afin d'obtenir un profil aromatique défini, la faisabilité d'une stratégie de contrôle en temps réel (détermination de la dose optimale d'azote à ajouter et la régulation de la température après ajout d'azote) est étudiée dans le projet. Les lois de commande définissant cette stratégie de contrôle s'appuient sur un modèle mathématique de la fermentation œnologique développé durant cette thèse. Ce modèle doit décrire l'évolution des concentrations des variables d'état (sucre, éthanol et CO2) et des composés aromatiques (ici cinq arômes choisis comme représentatifs des grandes familles de composés aromatiques) pour des fermentations anisothermes et comportant un ajout d'azote.

Durant cette thèse, les questions auxquelles nous avons cherché à répondre étaient :

- Un modèle de la cinétique principale peut-il intégrer l'ajout d'azote ?
- Un modèle continu de la production des arômes peut-il être construit ?
- Un modèle de production des arômes prenant en compte l'ajout d'azote peut-il être construit ?

Notre étude bibliographique a montré que même si la fermentation alcoolique est un sujet de recherche depuis plusieurs décennies, il existe peu de modèle de la fermentation alcoolique en conditions œnologiques. Seuls trois modèles de la cinétique principale de la fermentation alcoolique en conditions œnologiques prennent en compte la limitation en azote de la fermentation et aucun modèle ne prend en compte l'ajout d'azote en cours de fermentation.

Un seul modèle de la synthèse des arômes pendant la fermentation alcoolique en conditions œnologiques a été publié. Ce modèle présente deux phases de production des arômes avec une discontinuité en fonction de la consommation du sucre. Ce modèle prend en compte l'influence de la concentration initiale en azote et de la température mais n'intègre pas l'ajout d'azote en cours de fermentation. Ces travaux de thèse se sont donc intéressés à la modélisation de l'effet de l'ajout d'azote sur la cinétique principale et sur la production d'arôme.

Deux modèles de la cinétique principale de fermentation en conditions œnologiques ont été construits à partir de modèles de la littérature : le premier modèle est basé sur le modèle de Malherbe et al. (2004) et le deuxième modèle sur le modèle de Brou et al. (2020). Ils prennent en compte l'évolution dynamique de la concentration des substrats (sucre et azote), des produits (biomasse, éthanol et CO_2) et de variables d'état caractérisant l'état métabolique des levures : l'azote intra-cellulaire, les transporteurs de sucre et l'activité cellulaire.

Ils ont été calibrés avec des données de quatre fermentations réalisées à 24°C avec différentes concentrations initiales en azote (70, 140 et 210 mg/L) et un ajout d'azote réalisé à 20 g/L de CO_2 dégagé avec différentes concentrations (50, 100 et 150 mg/L). Les deux modèles ont ensuite été validés sur les données de seize fermentations réalisées à 24°C avec différentes concentrations initiales en azote (70, 140 et 210 mg/L) et différentes concentrations d'azote ajouté (50, 100 et 150 mg/L) à différents avancements de la fermentation (20, 35 et 50 g/L de CO_2 dégagé). Les deux modèles montrent de bonnes capacités de prédiction des concentrations même pour des ajouts d'azote effectués à des avancements de réaction différents de celui utilisé pour la calibration.

Dans le premier modèle, la prise en compte d'une variable d'état représentant l'azote stocké intracellulairement a permis de remplacer la loi logistique utilisée par Malherbe qui n'était fonction que de l'azote initial et de pouvoir ainsi simuler la recroissance des levures après ajout d'azote. Cette variable permet, pour les deux modèles, de simuler une croissance résiduelle alors que l'azote est épuisé dans le milieu de culture.

L'ajout de la variable représentant l'activité cellulaire permet de décrire la perte d'activité métabolique en cours de culture et donc une reprise fermentaire (vitesse de dégagement du CO_2) plus ou moins importante suivant le temps écoulé entre la fin de la croissance cellulaire et l'ajout d'azote.

Les deux modèles présentent également une bonne capacité de prédiction des valeurs de V_{max} et de t_{max} pour les deux phases de croissance, paramètres représentatifs de la fermentation œnologiques et de la quantité d'azote présent dans le milieu. Ainsi, à partir de la mesure en ligne de la vitesse de dégagement de CO_2, les modèles peuvent être utilisé pour déterminer la concentration initiale en azote qui était présente dans le moût de fermentation. Cette donnée pourra ensuite être utilisée comme initialisation dans la simulation de différents scénarios d'ajout d'azote et de contrôle de la température pour optimiser le profil aromatique final des vins.

Une analyse de sensibilité a été réalisée et a montré que le premier modèle issu du modèle de Malherbe est assez peu sensible aux variations des valeurs des paramètres alors que le deuxième modèle issu du modèle de Brou diverge pour la variation de deux paramètres.

En vue d'une utilisation du modèle dans une loi de commande, le modèle construit à partir du modèle de Malherbe a été retenu pour la suite de la thèse car il présente une meilleure adéquation aux données de validation, une meilleure capacité de prédiction des valeurs de V_{max} et de t_{max} et est moins sensible aux variations des valeurs des paramètres que le deuxième modèle dérivé du modèle de Brou.

Le développement de la structure du modèle de la cinétique principale a d'abord été réalisé pour des fermentations isothermes à 24°C mais la température est rarement régulée durant les fermentations œnologiques. L'effet de la température a donc été intégré dans le modèle de la cinétique principale. Ce modèle intègre déjà la température dans le taux de croissance maximale ; ce terme provient du modèle de Malherbe et n'a pas été recalibré car aucune donnée de biomasse n'était disponible à des températures autres que 24°C.

Les paramètres du modèle ont été calibrés pour différentes températures à partir des données du CO_2 produit et de la vitesse de production de CO_2 de quinze fermentations isothermes faites à plusieurs températures (18, 23 et 28°C) et plusieurs concentrations initiales en azote (70, 140 et 210 mg/L) et avec un ajout d'azote réalisé à 20 g/L de CO_2 dégagé avec différentes concentrations en azote ajouté (50,100 et 150 mg/L). De cette recalibration, plusieurs relations quadratiques ou linéaires entre la température et certains paramètres du modèle (vitesses spécifiques maximales de consommation du sucre et de l'azote, vitesse spécifique maximale de production de transporteurs du sucre et vitesse de perte de l'activité cellulaire) ont été établies et intégrées dans le modèle de la cinétique principale.

Le modèle de la cinétique principale prenant en compte l'effet de la température a été validé grâce aux données de trois fermentations anisothermes réalisées avec différents profils de température comportant des augmentations et des diminutions de la température de fermentation entre 18 et 28°C, différentes concentrations initiales en azote (90 et 150 mg/L) et un ajout d'azote à 20 g/L de CO_2 dégagé avec plusieurs concentrations en azote (70, 110 et 130 mg/L). Il permet de bien décrire les différentes cinétiques de fermentations et simuler les concentrations présentes en cours de fermentation, même avec des profils de variation de température peu classique en fermentation œnologique. De plus, il présente une assez bonne capacité de prédiction des valeurs de V_{max} et de t_{max} (l'écart relatif entre la valeur expérimentale et la valeur prédite est de 6,2% et de 26,2% pour V_{max} et t_{max} respectivement pour la première phase de croissance et de 17,2% et de 6,1% pour V_{max} et t_{max} pour la deuxième phase de croissance).

Ainsi un modèle de la cinétique principale de la fermentation a été développé et validé. Il permet de calculer les concentrations en sucre, biomasse, azote et éthanol présentes dans le moût de fermentation ainsi que la vitesse de dégagement de CO_2 et la quantité de CO_2 produite. C'est, à notre connaissance, le seul modèle permettant de simuler des fermentations œnologiques anisothermes comportant un ajout d'azote.

Le but du projet étant de contrôler le profil aromatique des vins, ce modèle de la cinétique principale a été complété par la modélisation de la synthèse des arômes. La vitesse de production des arômes est proportionnelle à la vitesse de consommation du sucre mais le rendement de conversion n'est pas constant en cours de fermentation (Mouret et al., 2015) car il y a très peu de formation d'arômes pendant la croissance levurienne. Ce métabolisme secondaire s'intensifie en phase stationnaire quand il y a une carence d'éléments nutritifs tels que l'azote. Le travail réalisé pour modéliser la synthèse des arômes s'est donc focalisé sur la description mathématique de la variation de ce rendement de conversion en fonction de l'azote initial, de l'azote ajouté et de la température. Les données de quinze fermentations isothermes faites à plusieurs températures (18, 23 et 28°C) et plusieurs concentrations

initiales en azote (70, 140 et 210 mg/L) et avec un ajout d'azote réalisé à 20 g/L de CO_2 dégagé avec différentes concentrations en azote ajouté (50,100 et 150 mg/L) ont été utilisées pour la construction et la calibration de ces modèles. D'abord deux modèles de la synthèse de l'acétate d'isoamyle ont été construits car c'est l'arôme le plus sensible à l'effet de la température et de l'ajout d'azote. Le premier modèle de la synthèse des arômes est dérivé du modèle de Mouret et al. (2015). Pour ce modèle, le rendement de conversion du sucre en acétate d'isoamyle dépend des conditions expérimentales (température, concentration initiale en azote et concentration en azote ajouté) et présente une discontinuité lors de l'ajout d'azote. Dans le deuxième modèle de la synthèse des arômes, le rendement est considéré comme une variable d'état et sa variation dépend de la vitesse de dégagement du CO_2, représentative de l'activité fermentaire. Ceci permet d'avoir une variation continue de la valeur du rendement et de s'affranchir de la discontinuité du premier modèle qui pourrait être problématique pour une utilisation dans une loi de commande. La calibration montre que la structure choisie pour ces deux modèles permet de décrire assez correctement la production d'acétate d'isoamyle avec une augmentation du rendement de production suite à l'ajout d'azote.

Les deux modèles ont été validés avec des données de trois fermentations anisothermes présentant des profils de température différents variant entre 18°C et 28°C, des concentrations initiales en azote différentes (90 et 150 mg/L) et un ajout d'azote à 20 g/L de CO_2 dégagé avec différentes concentrations (70, 110 et 130 mg/L). Le premier modèle présentant la discontinuité permet de mieux simuler les données de ces 3 fermentations bien qu'il ne permette pas de prendre en compte un retard de la production lorsque la température augmente après l'ajout d'azote. L'utilisation de données de fermentation présentant des variations de température est à envisager pour modifier la structure des deux modèles pour tenir compte de l'effet de la pente de température et améliorer ainsi la prédiction des modèles.

Pour les autres arômes considérés dans le projet, la structure de modèle retenue est celle qui donne les meilleures prédictions pour l'acétate d'isoamyle : les rendements de conversion du sucre en arômes présentent une discontinuité quand l'ajout d'azote est effectué et dépendent des conditions expérimentales (température, concentration initiale en azote et concentration en azote ajouté). Deux termes ont été ajouté au modèle de l'isobutanol pour prendre en compte un effet de la quantité d'azote ajouté et non plus seulement de l'azote total comme pour les autres arômes. La structure choisie pour ces équations permet de décrire correctement les productions d'isobutanol, d'alcool isoamylique et d'hexanoate d'éthyle pour la majorité des fermentations de calibration. Par contre, la structure du modèle ne convient pas pour décrire la dynamique de production de l'octanoate d'éthyle. Comme pour l'acétate d'isoamyle, les prédictions des concentrations en arômes pour l'isobutanol, l'alcool isoamylique et l'hexanoate d'éthyle lors des fermentations anisothermes sont convenables mais les variations les plus rapides de température ont certainement un effet sur la dynamique de changement du rendement ou sur les équilibres gaz-liquide des arômes qu'il faudrait prendre en compte dans le modèle pour améliorer ses capacités de prédiction.

Il a été montré qu'il était possible d'intégrer l'effet de l'azote ajouté en cours de fermentation œnologique dans un modèle de la cinétique principale et de la production de quatre arômes sur les cinq définis dans le projet StarWine. Un modèle continu de la production d'acétate d'isoamyle a été développé mais il s'est montré moins performant en termes de capacité de prédiction que le modèle présentant une discontinuité lors de l'ajout d'azote. Dans le cadre du projet StarWine, cette discontinuité peut ne pas être gênante pour l'utilisation du modèle dans la loi de commande car elle se situe au moment de l'ajout d'azote qui a été défini pour le projet à 20 g/L de CO_2 dégagé. En effet, la quantité d'azote à ajouter sera calculée par une boucle ouverte entre t_{max} de la première phase de croissance et 20 g/L de CO_2 dégagé et le contrôle de la température en boucle fermée ne démarrera qu'après cet ajout d'azote.

Les travaux réalisés durant cette thèse ont permis de développer un modèle de la fermentation œnologique et de la production d'arômes durant celle-ci. Ce modèle prend en compte la variation de température pendant la fermentation et également l'effet d'un ajout d'azote en cours de culture. Il est composé par les équations (VI.1 à VI.20).

- Biomasse :

$$\frac{dX}{dt} = k_1(T)X\left(1 - \frac{Q_0}{N_{intra}}\right)\left(1 - \frac{E}{E_{max}}\right)A \qquad (VI.1)$$

- Sucre :

$$\frac{dS}{dt} = -v_{ST}(S,E)N_{ST}X \qquad (VI.2)$$

Avec :

$$v_{ST}(S,E) = \frac{k_2 S}{S + K_s + K_{S1}SE^{\alpha_S}} \qquad (VI.3)$$

- Ethanol :

$$\frac{dE}{dt} = \frac{-1}{Y_{\frac{E}{S}}}\frac{dS}{dt} \qquad (VI.4)$$

- CO_2 :

$$\frac{dCO_2}{dt} = \frac{-1}{Y_{\frac{CO2}{S}}}\frac{dS}{dt} \qquad (VI.5)$$

- Azote :

$$\frac{dN}{dt} = -X\mu_N(N,E)A \qquad (VI.6)$$

Avec :

$$\mu_N(N,E) = \frac{k_3 N}{N + K_N + K_{NI}NE^{\alpha_N}} \qquad (VI.7)$$

- Azote intra-cellulaire :

$$\frac{dN_{intra}}{dt} = \mu_N(N,E) - \left(\frac{\alpha_1}{X} + \frac{N_{intra}}{X}\right)\frac{dX}{dt} - \frac{1}{Y_{nst}}\left(k_{nst}\left(1 - \frac{Q_{0nst}}{N_{intra}}\right) - k_{dnst}\right) \qquad (VI.8)$$

- Transporteurs du sucre :

$$\frac{dN_{ST}}{dt} = k_{nst}\left(1 - \frac{Q_{0nst}}{N_{intra}}\right) - k_{dnst}\frac{N_{ST}}{K_{NST} + N_{ST}} - \frac{N_{ST}}{X}\frac{dX}{dt} \qquad (VI.9)$$

- Activité cellulaire :

$$\frac{dA}{dt} = \frac{1}{X}\frac{dX}{dt}(1 - A) - \kappa A \qquad (VI.10)$$

- Isobutanol :

$$\frac{dIBOH}{dt} = -Y_{IBOH}\frac{dS}{dt} \qquad (VI.11)$$

Avec :

$$ln(Y_{IBOH}) = \begin{cases} D_1 + D_2N_0 + D_3T + D_4N_0^2 + D_5T^2 + D_6N_0T \quad avantajout \\ D_7 + D_8(N_0 + N_{aj}) + D_9T + D_{10}(N_0 + N_{aj})^2 + D_{11}T^2 + D_{12}(N_0 + N_{aj})T + D_{13}N_{aj} + D_{14}N_{aj}^2 \quad aprèsajout \end{cases} \qquad (VI.12)$$

- Alcool isoamylique :

$$\frac{dIAOH}{dt} = -Y_{IAOH}\frac{dS}{dt} \qquad (VI.13)$$

Avec :

$$ln(Y_{IAOH}) = \begin{cases} D_1 + D_2N_0 + D_3T + D_4N_0^2 + D_5T^2 + D_6N_0T & avant\ ajout \\ D_7 + D_8(N_0 + N_{aj}) + D_9T + D_{10}(N_0 + N_{aj})^2 + D_{11}T^2 + D_{12}(N_0 + N_{aj})T & après\ ajout \end{cases} \qquad (VI.14)$$

- Acetate d'isoamyle :

$$\frac{dIAA}{dt} = -Y_{IAA}\frac{dS}{dt} \qquad (IV.15)$$

Avec :

$$ln(Y_{IAA}) = \begin{cases} D_1 + D_2N_0 + D_3T + D_4N_0^2 + D_5T^2 + D_6N_0T & avant\ ajout \\ D_7 + D_8(N_0 + N_{aj}) + D_9T + D_{10}(N_0 + N_{aj})^2 + D_{11}T^2 + D_{12}(N_0 + N_{aj})T & après\ ajout \end{cases} \qquad (VI.16)$$

- Hexanoate d'éthyle :

$$\frac{dEH}{dt} = -Y_{EH}\frac{dS}{dt} \qquad (VI.17)$$

Avec :

$$ln(Y_{EH}) = \begin{cases} D_1 + D_2N_0 + D_3T + D_4N_0^2 + D_5T^2 + D_6N_0T & avant\ ajout \\ D_7 + D_8(N_0 + N_{aj}) + D_9T + D_{10}(N_0 + N_{aj})^2 + D_{11}T^2 + D_{12}(N_0 + N_{aj})T & après\ ajout \end{cases} \qquad (VI.18)$$

- Octanoate d'éthyle :

$$\frac{dEO}{dt} = -Y_{EO}\frac{dS}{dt} \qquad (VI.19)$$

Avec :

$$ln(Y_{EO}) = \begin{cases} D_1 + D_2N_0 + D_3T + D_4N_0^2 + D_5T^2 + D_6N_0T & avant\ ajout \\ D_7 + D_8(N_0 + N_{aj}) + D_9T + D_{10}(N_0 + N_{aj})^2 + D_{11}T^2 + D_{12}(N_0 + N_{aj})T & après\ ajout \end{cases} \qquad (VI.20)$$

Il comporte 87 paramètres dont les valeurs sont données dans les Tableau VI.43 et Tableau VI.44.

Tableau VI.43 Paramètres du modèle de la cinétique principale

Paramètres	Valeurs
k_1	$\alpha_{k1}T - \beta_{k1}$
α_{k1}	0,0287
β_{k1}	0,3
k_2	$2{,}04.10^{-4} * T^2 - 6{,}12.10^{-3} * T + 6{,}46.10^{-2}$
K_S	30,0
K_{SI}	$4{,}66.10^{-3}$
α_S	1,29
$Y_{E/S}$	2,17
$Y_{CO2/S}$	2,17
k_3	$2{,}009.10^{-6} * T^2 - 8{,}2177.10^{-5} * T + 1{,}9034.10^{-3}$
K_N	0,04105
K_{NI}	0,02635
α_N	1,195
Q_0	0,0001347
E_{max}	94,67
k_{nst}	$7{,}45.10^{-3} * T^2 - 4{,}27.10^{-1} * T + 6{,}63$
k_{dnst}	1,97
K_{nst}	12,14
Y_{nst}	694,8
Q_{0nst}	$1{,}23.10^{-4}$
α_1	0,0004795
κ	$1{,}2668.10^{-3} * T - 7{,}8394.10^{-3}$

Tableau VI.44 Paramètres du modèle de la synthèse des arômes

Paramètres	IBOH	IAOH	IAA	EH	EO
D_1	-2,8891	-1,484	-6,3382	-1,484	-1,484
D_2	$-8{,}081.10^{-4}$	$-3{,}2735.10^{-3}$	$5{,}0405.10^{-3}$	$-3{,}2735.10^{-3}$	$-3{,}2735.10^{-3}$
D_3	$8{,}923.10^{-2}$	$1{,}5267.10^{-1}$	$-3{,}9719.10^{-2}$	$1{,}5267.10^{-1}$	$1{,}5267.10^{-1}$
D_4	$-3{,}507.10^{-6}$	$2{,}0062.10^{-5}$	$1{,}2164.10^{-4}$	$2{,}0062.10^{-5}$	$2{,}0062.10^{-5}$
D_5	0	$-3{,}4674.10^{-3}$	$1{,}2947.10^{-3}$	$-3{,}4674.10^{-3}$	$-3{,}4674.10^{-3}$
D_6	$-3{,}4829.10^{-5}$	$-1{,}1276.10^{-4}$	$2{,}206.10^{-6}$	$-1{,}1276.10^{-4}$	$-1{,}1276.10^{-4}$
D_7	-9,3812	-4,5263	-12,8565	-4,5263	-4,5263
D_8	$2{,}106.10^{-2}$	$7{,}8371.10^{-3}$	$2{,}5813.10^{-2}$	$7{,}8371.10^{-3}$	$7{,}8371.10^{-3}$
D_9	0,44363	$3{,}2446.10^{-1}$	$4{,}6362.10^{-1}$	$3{,}2446.10^{-1}$	$3{,}2446.10^{-1}$
D_{10}	$-1{,}9009.10^{-5}$	$-2{,}5424.10^{-5}$	$-2{,}377.10^{-5}$	$-2{,}5424.10^{-5}$	$-2{,}5424.10^{-5}$
D_{11}	$-4{,}8188.10^{-3}$	$-6{,}682.10^{-3}$	$-7{,}5278.10^{-3}$	$-6{,}682.10^{-3}$	$-6{,}682.10^{-3}$
D_{12}	$-3{,}517.10^{-3}$	0	$-4{,}9984.10^{-4}$	0	0
D_{13}	$3{,}517.10^{-3}$	-	-	-	-
D_{14}	$-4{,}4611.10^{-5}$	-	-	-	-

Les perspectives issues de ces travaux concernent l'amélioration des modèles de la cinétique principale et de la synthèse des arômes par les aspects suivants :

- Prise en compte des ajouts d'azote à différents avancements de la fermentation.
  En effet, les modèles construits ont été calibrés pour des fermentations avec un ajout d'azote fait à un avancement de la fermentation de 20 g/L de CO_2 dégagé. Cependant, en cave, l'ajout d'azote, s'il est effectué, est réalisé à différents avancements de la fermentation, généralement dans la première moitié de la fermentation car il permet un recroissance de la biomasse et une reprise de l'activité cellulaire. Le modèle développé a montré une capacité à prédire les cinétiques principales pour des ajouts d'azote effectué à 35 et 50g/L de CO_2 dégagé mais cette capacité de prédiction pourrait être améliorée en calibrant le modèle avec des données de concentration en azote, biomasse et CO_2 dégagé obtenus lors de fermentations comportant des ajouts d'azote à différents avancements de fermentation.
  Pour les équations décrivant le changement de valeur du rendement de conversion du sucre en arôme, il a été choisi de fusionner la discontinuité due à l'ajout d'azote à celle observée expérimentalement correspondant à une augmentation du métabolisme secondaire car elles étaient proches en termes d'avancement de la réaction. Pour prendre en compte des ajouts d'azote à des avancements de réactions différents de 20 g/L de CO_2 dégagé, il faudra analyser les données expérimentales (en particulier le rendement de conversion du sucre en arômes) de fermentations réalisées avec des ajouts d'azote à différents avancements de fermentation. Si trois zones sont déterminées pour la valeur du rendement, le modèle avec discontinuité de la synthèse des arômes devra donc être modifié et comporter deux discontinuités : une liée à l'ajout d'azote et l'autre liée à l'augmentation du métabolisme des arômes suite aux carences nutritionnelles. Si deux zones de valeurs du rendement sont observées, il faudra déterminer

si le temps de la discontinuité doit être exprimé en fonction soit des conditions expérimentales (Sucre consommé, azote initial…) soit du temps de l'ajout d'azote.

- Intégration de la variation de la température en cours de fermentation.
  En effet, en cave, peu de fermentations sont faites à température constante ; la fermentation est un processus exothermique et actuellement peu de vignerons sont équipés de cuves régulées en température du fait des grandes dimensions des cuves industrielles de fermentation et du coût engendré pour refroidir ces cuves. La validation du modèle de la cinétique principale prenant en compte la température a montré que le modèle simule bien des fermentations anisothermes pour la vitesse de dégagement de CO_2 et l'estimation du CO_2 dégagé. Par contre, pour la production des arômes, le modèle simule correctement des fermentations isothermes entre 18 et 28°C mais suit moins bien la dynamique pour des fermentations anisothermes. Une modification de la structure du modèle pour intégrer l'effet de la vitesse de variation de la température et la recalibration des paramètres des équations de la synthèse des arômes avec des fermentations anisothermes présentant des vitesses de variation de la température différentes permettrait d'améliorer les capacités de simulation du modèle construit.

- Développement d'un modèle sans discontinuité pour la synthèse des arômes
  L'approfondissement du travail de modélisation de la synthèse des arômes passe par la recherche d'un modèle sans discontinuité de la synthèse de l'isobutanol, de l'alcool isoamylique, de l'hexanoate d'éthyle et de l'octanoate d'éthyle. Le travail effectué pour l'acétate d'isoamyle peut servir de base pour la construction du modèle sans discontinuité de ces autres arômes. Des données supplémentaires de calibration seront nécessaires pour améliorer le modèle de l'acétate d'isoamyle et ses capacités de prédictions et pour calibrer les paramètres des équations pour les autres arômes. Il s'agirait alors à notre connaissance du premier modèle continu de la synthèse d'arômes en fermentation œnologique. Ce modèle serait intéressant car il comporte moins de paramètres que le modèle avec discontinuité. En effet, dans la suite du projet StarWine, le développement de ce modèle doit permettre d'établir une stratégie de contrôle de la fermentation pour la gestion des profils aromatiques du vin par contrôle de la température en boucle fermée. La mesure en ligne des arômes par une chromatographie gazeuse sera utilisée pour réajuster le modèle (réidentification des paramètres) et la conduite en temps réel.

A partir des modèles développés, un outil de gestion de la fermentation sera construit pour aider les vignerons à déterminer le profil de température et l'ajout d'azote optimaux pour atteindre le profil aromatique souhaité malgré la variabilité de composition des jus de raisins suivant les parcelles et les années. Cela permettra de stabiliser et d'améliorer les qualités organoleptiques des vins produits et donc leur compétitivité sur un marché mondial du vin qui est de plus en plus concurrentiel. De plus, en couplant ce modèle à un modèle décrivant la dépense de frigories nécessaire au refroidissement des cuves, une dimension d'économies énergétiques pourrait être ajouter dans le calcul du profil de température optimal.

VIII. Références bibliographiques

Agenbach, W. A. (1977). A study of must nitrogen content in relation to incomplete fermentations, yeast production and fermentation activity. *Proceedings of South African Society for Enology and Viticulture*, 66-87. https://ci.nii.ac.jp/naid/10012478318/en/

Agreste. (2020). *La superficie agricole utilisiée*. Retrieved 06/09/2022 from https://vizagreste.agriculture.gouv.fr/la-superficie-agricole-utilisee.html

Aiba, S., & Shoda, M., & Nagatani, M. (1968). Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation-temperature effect in the "sake" brewing. *Biotechnology and Bioengineering*, *11*(6), 1285-1287. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bit.260110621

Albertin, W., & Miot-Sertier, C., & Bely, M., & Marullo, P., & Coulon, J., & Moine, V., & Colonna-Ceccaldi, B., & Masneuf-Pomarede, I. (2014). Oenological prefermentation practices strongly impact yeast population dynamics and alcoholic fermentation kinetics in Chardonnay grape must. *International Journal of Food Microbiology*, *178*, 87 - 97. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.03.009

Aldiguier, A. S., & Alfenore, S., & Cameleyre, X., & Goma, G., & Uribelarrea, J.-L., & Guillouet, S., & Molina-Jouve, C. (2004). Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behavior in ethanol bio-fuel production. *Bioprocess and biosystems engineering*, *26*, 217-222. https://doi.org/10.1007/s00449-004-0352-6

Alexandre, H. a. C., H. (1998). Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *20*(1), 20-27. https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900442

Andorrà, I., & Berradre, M., & Mas, A., & Esteve-Zarzoso, B., & Guillamón, J. M. (2012). Effect of mixed culture fermentations on yeast populations and aroma profile. *Lwt*, *49*(1), 8 - 13. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.04.008

Andrews, J. F. (1968). A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. *Biotechnology and Bioengineering*, *10*(6), 707-723. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bit.260100602

Anfang, N., & Brajkovich, M., & Goddard, M. R. (2009). Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in Sauvignon Blanc. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *15*(1}), 1-8}. https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2008.00031.x

Anocibar Beloqui, Á. (1998). *Contribution à l'étude des composés soufrés volatiles des vins rouges* http://www.theses.fr/1998BOR20611

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. https://doi.org/10.1023/A:1010396232420

Armstrong, J. S., & Collopy, F. (1992). Error measures for generalizing about forecasting methods: Empirical comparisons. *International Journal of Forecasting*, *8*(1), 69-80. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0169-2070(92)90008-W

Bajpai, R. K., & Reuß, M. (1981). Evaluation of feeding strategies in carbon-regulated secondary metabolite production through mathematical modeling. *Biotechnology and Bioengineering*, *23*(4}), 717-738. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bit.260230406

Bales, V., & Timár, P., & Baláž, J., & Timár, P. (2016). Wine fermentation kinetic model verification and simulation of refrigeration malfunction during wine fermentation. *Acta Chimica Slovaca*, *9*, 58 - 61. https://doi.org/DOI:10.1515/acs-2016-0010

Barre, P. (1982). Essai de mise en évidence de groupes d'activite killer parmi 55 souches de *Saccharomyces* isolées des vins. *Sciences des aliments*, *2*(2), 125-130.

Belda, I., & Ruiz, J., & Esteban-Fernández, A., & Navascues, E., & Marquina, D., & Santos, A., & Moreno-Arribas, M. (2017). Microbial Contribution to Wine Aroma and Its Intended Use for Wine Quality Improvement. *Molecules*, *22*, 189. https://doi.org/10.3390/molecules22020189

Bely, M. (1990). *Détection automatique et correction des carences en azote assimilable des fermentations alcooliques en conditions oenologiques: étude cinétique et approche physiologique* Montpellier 2].

Bely, M., & Sablayrolles, J. M., & Barre, P. (1990a). Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, *70*(4), 246 - 252. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0922-338X(90)90057-4

Bely, M., & Sablayrolles, J. M., & Barre, P. (1990b). Description of Alcoholic Fermentation Kinetics: Its Variability and Significance. *American Journal of Enology and Viticulture*, *41*, 319-324. https://www.ajevonline.org/content/41/4/319

Bely, M., & Stoeckle, P., & Masneuf-Pomarède, I., & Dubourdieu, D. (2008). Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii–Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, *122*(3), 312 - 320. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.023

Beney, L., & I., M. n. d. M., & Marechal, P. A., & Gervais, P. (2000). Influence of thermal and osmotic stresses on the viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, *55*(1), 275 - 279. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00203-8

Bernard, O., & Hadj-Sadok, Z., & Dochain, D., & Genovesi, A., & Steyer, J. P. (2001). Dynamical model development and parameter identification for an anaerobic wastewater treatment process. *biotechnology and bioengineering*, *75(4)*, 424-438. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bit.10036

Berthels, N. J., & Cordero Otero, R. R., & Bauer, F. F., & Thevelein, J. M., & Pretorius, I. S. (2004). Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *FEMS Yeast Research*, *4*, 683-689. https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.02.005

Bertolini, M. C., & Ernandes, J. R., & Laluce, C. (1991). New yeast strains for alcoholic fermentation at higher sugar concentration. *Biotechnol Lett*, *13*. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF01025817

Bisson, L. F. (1991). Influence of nitrogen on yeast and fermentation of grapes. Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine: Seattle, Washington, Usa 18-19 june 1991,

Bisson, L. F. (1999). Stuck and sluggish fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, *50*, 107-119. https://www.ajevonline.org/content/50/1/107

Bisson, L. F. (2000). Glucose transport in Saccharomyces cerevisiae and the role of potassium in stuck fermentation. *Proceedings of the 2000 Entretiens Scientifiques Lallemand, Krems, Austria*, 27-33.

Bisson, L. F., & Coons, D. M., & Kruckeberg, A. L., & Lewis, D. A. (1993). Yeast Sugar Transporters. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *28*(4), 259-308. https://doi.org/10.3109/10409239309078437

Bisson, L. F., & Fraenkel, D. G. (1983). Involvement of kinases in glucose and fructose uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *80*, 1730-1734. https://doi.org/10.1073/pnas.80.6.1730

Blateyron, L., & Sablayrolles, J. M. (2001). Stuck and slow fermentations in enology: statistical study of causes and effectiveness of combined additions of oxygen and diammonium phosphate. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *91*(2), 184 - 189. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80063-3

Bona, R., & Moser, A. (1997). Modelling L-glutamic acid production with *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation. *Acta Biotechnologica*, *17*(4), 327-337. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/abio.370170408

Brou, P. R. J., & Taillandier, P., & Beaufort, S., & Brandam, C. (2020). Modelling of *S. cerevisiae* and *T. delbrueckii* pure culture fermentation in synthetic media using a compartmental nitrogen model. *OENO One*, *54*, 299–311. https://doi.org/10.20870/oeno-one.2020.54.2.2574

Cabanis, J. C., & Cabanis, M. T., & Cheynier, V., & Teissedre, P. L. (1993). Oenologie: Fondements Scientifiques et Technologiques. *Oenologie-Fondements Scientifiques et Technologiques. TEC and DOC Lavoisier, Paris, F*, 315-336.

Cagniard-Latour, C. (1838). Mémoire sur la fermentation vineuse, présenté à l'Académie des sciences le 12 juin 1837. *Annales de chimie et de physique*, *68*, 206-222.

Calderbank, J., & Hammond, J. R. M. (1994). Influence of Higher Alcohol Availability on Ester Formation by Yeast. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, *52*(2), 84-90. https://doi.org/10.1094/ASBCJ-52-0084

Carcano, S. (2009). *A model for cell growth in batch biorector*.

Caro, I., & Pérez, L., & Cantero, D. (1991). Development of a kinetic model for the alcoholic fermentation of must. *biotechnology and bioengineering*, *38*(7), 742-748. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bit.260380708

Carrau, F. M., & Medina, K., & Farina, L., & Boido, E., & Henschke, P. A., & Dellacassa, E. (2008). Production of fermentation aroma compounds by Saccharomyces cerevisiae wine yeasts: effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains. *FEMS Yeast Res*, *8*(7), 1196-1207. https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00412.x

Carroll, J. J., & Slupsky, J. D., & Mather, A. E. (1991). The Solubility of Carbon Dioxide in Water at Low Pressure. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, *20*, 1201-1209.

Cheraiti, N., & Guezenec, S., & Salmon, J.-M. (2005). Redox Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* in Mixed Culture under Enological Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*, 255-260. https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.255-260.2005

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. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.012

Ciani, M., & Comitini, F., & Mannazzu, I., & Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Research*, *10*(2), 123-133. https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00579.x

Coleman, M. C., & Fish, R., & Block, D. E. (2002). Temperature-Dependent Kinetic Model for Nitrogen-Limited Wine Fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, *77*(1), 49-60}. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bit.10133

Colombié, S., & Latrille, E., & Sablayrolles, J. M. (2007). Online estimation of assimilable nitrogen by electrical conductivity measurement during alcoholic fermentation in enological conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *103*(3), 229 - 235. https://doi.org/https://doi.org/10.1263/jbb.103.229

Colombié, S., & Malherbe, S., & Sablayrolles, J.-M. (2005). Modeling Alcoholic Fermentation in Enological Conditions: Feasibility and Interest. *American Journal of Enology and Viticulture*, *56*(3), 238-245. https://www.ajevonline.org/content/ajev/56/3/238.full.pdf

Commission Delegated Regulation (EU) 2019/934 of 12 March 2019 supplementing Regulation (EU) No 1308/2013 of the European Parliament and of the Council as regards wine-growing areas where the alcoholic strength may be increased, authorized oenological practices and restrictions applicable to the production and conservation of grapevine products, the minimum percentage of alcohol for by-products and their disposal, and publication of OIV files, (2019).

Convention, E. B. (1975). *Analytica-EBC*. Schweiger Brauerei-Rundschau.

Cordente, A. G., & Curtin, C. D., & C., V., & Pretorius, I. (2012). Flavor-Active wine yeasts. *Applied microbiology and biotechnology*, *96*, 301-618. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00253-012-4370-z

Cottrell, T. H. E., & Mc Lellan, M. R. (1986). The effect of fermentation temperature on chemical and sensory characteristics of wines from seven white grape cultivars grown in new york state. *American Journal of Enology and Viticulture*, *37*, 190-194. https://www.ajevonline.org/content/37/3/190

Cramer, A. C., & Vlassides, S., & Block, D. E. (2002). Kinetic model for nitrogen-limited wine fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, *77*, 49-60. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bit.10133

Crépin, L., & Nidelet, T., & Sanchez, I., & Dequin, S., & Camarasa, C. (2012). Sequential use of nitrogen compounds by Saccharomyces cerevisiae during wine fermentation : a model based on kinetic and regulation characteristics of nitrogen permeases. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*, 8102-8111. https://doi.org/10.1128/AEM.02294-12

Crépin, L., & Truong, N. M., & Bloem, A., & Sanchez, I., & Dequin, S., & Camarasa, C. (2017). Management of multiple nitrogen sources during wine fermentation by *S. cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, *85*. https://doi.org/10.1128/AEM.02617-16

Cueto-Rojas, H. F., & Maleki Seifar, R., & ten Pierick, A., & van Helmond, W., & Pieterse, M. M., & Heijnen, J. J., & Wahl, S. A. (2016). In vivo analysis of NH4+ transport and central nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* during aerobic nitrogen-limited growth. *Applied and Environmental Microbiology*, *82*, 6831-6845. https://doi.org/10.1128/AEM.01547-16

David, R., & Dochain, D., & Mouret, J. R., & Vande Wouwer, A., & Sablayrolles, J. M. (2014). Nitrogen-backboned modeling of wine-making in standard and nitrogen-added fermentations. *Bioprocess Biosyst Eng*, *37*(1), 5-16. https://doi.org/10.1007/s00449-013-0914-6

de Ullivarri, M. F., & Mendoza, L. M., & Raya, R. R. (2014). Killer activity of *Saccharomyces cerevisiae* strains: partial characterization and strategies to improve the biocontrol efficacy in winemaking. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *106*, 865-878. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10482-014-0256-7

Deluzarche, C. (2021). *Fermentation alcoolique : qu'est-ce que c'est ?* Futura. Retrieved 06/09/2022 from https://www.futura-sciences.com/sciences/definitions/chimie-fermentation-alcoolique-19261/

Droop, M. R. (1970). Vitamin B12 and marine ecology. *Helgolander Wiss. Meeresunters*, *20}*, 629–636. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF01609935

Du Plessis, G. J., & S., L. C. (1974). The bouquet of "late harvest" wine. *Agrochemophysica*, *6*(3), 49-51. https://doi.org/10.10520/AJA03027112_262,

Dubois, C., & Manginot, C., & Roustan, J.-L., & Sablayrolles, J.-M., & Barre, P. (1996). Effect of variety, year, and grape maturity on the kinetics of alcoholic fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, *47*, 363-368. https://www.ajevonline.org/content/47/4/363

Edwards, C., & Reynolds, A., & Rodriguez, A. V., & Semon, M. J., & Mills, J. M. (1999). Implication of acetic acid in the induction of slow/stuck grape juice fermentations and inhibition of yeast by *Lacobacillus* sp. *American Journal of Enology and Viticulture*, *50*, 204-210.

Ehrlich, F. (1907). Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweissaufbauder Hefe. *Berichte der deutschen chemischen Gessellschaft*, *40*, 1027-1047.

El Haloui, N., & Picque, D., & Corrieu, G. (1987). Mesures physiques permettant le suivi biologique de la fermentation alcoolique en oenologie. *Sciences des aliments*.

Escudero, A., & Campo, E., & Fariña, L., & Cacho, J., & Ferreira, V. (2007). Analytical Characterization of the Aroma of Five Premium Red Wines. Insights into the Role of Odor Families and the Concept of Fruitiness of Wines. *J. Agric. Food Chem.*, *55*(11), 4501-4510. https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jf0636418

Fleet, G. H. (2008). Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Research*, *8*, 979-995. https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00427.x

Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database (FAOSTAT). (2020). *Cultures et produits animaux*. https://www.fao.org/faostat/fr/#data/QCL

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 - 182. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1389-1723(02)80011-1

Fugelsang, K. C., & Edwards, C. G. (2007). *Wine Microbiology*.

Fujii, T., & Kobayashi, O., & Yoshimoto, H., & Furukawa, S., & Tamai, Y. (1997). Effect of aeration and unsaturated fatty acids on expression of the *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferase gene. *Applied and Environmental Microbiology*, *63*, 910-915. https://aem.asm.org/content/63/3/910

Fujiwara, D., & Kobayashi, O., & Yoshimoto, H., & Harashima, S., & Tamai, Y. (1999). Molecular mechanism of the multiple regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* ATF1 gene encoding alcohol acetyltransferase. *Yeast*, *15*(12}), 1183-1197}. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19990915)15:12<1183::AID-YEA444>3.0.CO;2-J

Furukawa, K., & Ohsuye, K. (1998). Effect of culture temperature on a recombinant CHO cell line producing a C-terminal α-amidating enzyme. *Cytotechnology*, *26*, 153-164.

Gelmi, C., & Pérez-Correa, R., & Agosin, E. (2002). Modelling *Gibberella fujikuroi* growth and GA3 production in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, *37*(9), 1033-1040. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00314-4

Gervais, P., & Martinez, I. (1995). Effect of the kinetics of temperature variation on *Saccharomyces cerevisiae* viability and permeability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1235*(1), 52 - 56. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0005-2736(94)00299-5

Godillot, J., & Sanchez, I., & Perez, M., & Picou, C., & Galeote, C., & Sablayrolles, J. M., & Farines, V., & Mouret, J. R. (2022). The Timing of Nitrogen Addition Impacts Yeats Genes Expression and the Production of Aroma Compounds During Wine Fermentation. *Frontiers in Microbiology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.829786

Goelzer, A., & Charnomordic, B., & Colombié, S., & Fromion, V., & Sablayrolles, J. M. (2009). Simulation and optimization software for alcoholic fermentation in winemaking conditions. *Food Control*, *20*(7), 635-642. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.09.016

Gómez, N. A., & Sanchéz, C. P., & Quintero, J. C. (2013). Phenomenological Model of the Clavulanic Acid production, inhibitor of the enzymes β-lactamases using a method of multiple regression analysis nonlinear. In *2013 Pan American Health Care Exchanges (PAHCE)* (pp. 1-4). https://doi.org/10.1109/PAHCE.2013.6568280

Gompertz, B. (1825). XXIV. On the nature of the function expressive of the law of human mortality, and on a new mode of determining the value of life contingencies. In a letter to Francis Baily. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, *115*, 513-583. https://doi.org/10.1098/rstl.1825.0026

Gonçalves, P., & Rodrigues de Sousa, H., & Spencer-Martins, I. (2000). FSY1, a Novel Gene Encoding a Specific Fructose/H+ Symporter in the Type Strain of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Journal of Bacteriology*, *182*. https://jb.asm.org/content/182/19/5628

Guerrini, S., & Barbato, D., & Guerrini, L., & Mari, E., & Buscioni, G., & Mangani, S., & Romboli, Y., & Galli, V., & Parenti, A., & Granchi, L. (2021). Selection of Indigenous *Saccharomyces cerevisiae* Strains and Exploitation of a Pilot-Plant to Produce Fresh Yeast Starter Cultures in a Winery. *Fermentation*, *7*. https://doi.org/10.3390/fermentation7030099

Gutiérrez, A., & Chiva, R., & Sancho, M., & Gemma Beltran, G., & Arroyo-López, F. N., & Guillamon, J. M. (2012). Nitrogen requirements of commercial wine yeast strains during fermentation of a synthetic grape must. *Food Microbiology*, *31*(1), 25 - 32. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.02.012

Guyot, S., & Ferret, E., & Gervais, P. (2005). Responses of *Saccharomyces cerevisiae* to thermal stress. *Biotechnology and Bioengineering*, *92*(4), 403-409. https://doi.org/10.1002/bit.20600

Guyot, S., & Gervais, P., & Young, M., & Winckler, P., & Dumont, J., & Davey, H. M. (2015). Surviving the heat: heterogeneity of response in *Saccharomyces cerevisiae* provides insight into thermal damage to the membrane. *Environmental Microbiology*, *17*(8), 2982-2992. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12866}

Hanson, T. P., & Tsao, G. T. (1972). Kinetic studies of the lactic acid fermentation in batch and continuous cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, *14*(2), 233-252. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bit.260140207

Hazelwood, L. A., & Daran, J.-M., & van Maris, A. J. A., & Pronk, J. T., & Dickinson, J. R. (2008). The Ehrlich Pathway for Fusel Alcohol Production: a Century of Research on *Saccharomyces cerevisiae* Metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*, 2259-2266. https://doi.org/10.1128/AEM.02625-07

Henschke, P. A., & Vladimir, J. (1993). Yeasts-metabolism of nitrogen compounds in Wine Microbiology and Biotechnology. *Harwood Academic Publishers*, 77-164.

Hinkle, P. C. (2005). P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation *Biochim Biophys Acta*, *1706*, 1-11. https://doi.org/ 10.1016/j.bbabio.2004.09.004

Hirst, M. B., & Richter, C. L. (2016). Review of Aroma Formation through Metabolic Pathways of *Saccharomyces cerevisiae* in Beverage Fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, *67*, 361-370. https://doi.org/10.5344/ajev.2016.15098

Hohmann, S. (1997). Shaping up: the response of yeast to osmotic stress. *Yeast stress responses*, 101-146.

Holzberg, I., & Finn, R. K., & Steinkraus, K. H. (1967). A kinetic study of the alcoholic fermentation of grape juice. *Biotechnology and Bioengineering*, *9*(3), 413-427. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bit.260090312

Hooke, R., & Jeeves, T. A. (1961). `` Direct Search'' Solution of Numerical and Statistical Problems. *Journal of the ACM*, *8*(2), 212-229. https://doi.org/https://doi.org/10.1145/321062.321069

Institut National des Statistiques et des études économiques (INSEE). (2020). *Les dépenses des ménages en boissons depuis 1960*. Retrieved 21/09/2022 from https://www.insee.fr/fr/statistiques/4319377

Jardiner Autrement. (2021). *Evolution des surfaces cultivées en France et dans le monde : évaluation et enjeux*. https://www.jardiner-autrement.fr/evolution-des-surfaces-cultivees-en-france-et-dans-le-monde-evaluations-et-enjeux/

Jiménez-Marti, E., & Agustin, A., & Mendes-Ferreira, A., & Mendes-Faia, A., & li del Olmo, M. (2007). The nature of the nitrogen source added to nitrogen depleted vinifications conducted by a *Saccharomyces cerevisiae* strain in synthetic must affects gene expression and the levels of several volatile compounds. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *92*, 61-75.

Jiranek, V., & Langridge, P., & Henschke, P. A. (1990). Nitrogen requirement of yeast during wine fermentation. In *Proceedings of the seventh Australian wine industry technical conference* (pp. 166-171).

Julien, A., & Roustan, J.-L., & Dulau, L., & Sablayrolles, J.-M. (2000). Comparison of nitrogen and oxygen demands of enological yeasts : Technological consequences. *American Journal of Enology and Viticulture*, *51*, 215-222.

Kiviharju, K., & Salonen, K., & Leisola, M. S. A., & Eerikäinen, T. (2006). Modeling and simulation of *Streptomyces peucetius var. caesius* N47 cultivation and ε-rhodomycinone production with kinetic equations and neural networks. *Journal of Biotechnology*, *126*, 365-373.

Kumor, A. (2021). *Production mondiale de vin: 2021, une année chaotique*. https://www.rfi.fr/fr/%C3%A9conomie/20211104-production-mondiale-de-vin-2021-une-ann%C3%A9e-chaotique

Kunkee, R. E., & Guymon, J. F., & Crowell, E. A. (1972). Studies on the control of higher alcohol formation by yeasts through metabolic inhibition. In *1st Specialized International Symposium on yeasts*. Publishing House of the Academy Sciences Bratislava.

Lafon-Lafourcade, S. (1980). Les facteurs de survie des levures. *BULLETIN DE L'OIV*.

Larue, F., & Lafon-Lafourcade, S., & Ribéreau-Gayon, P. (1984). Relation entre les difficultés de fermentation et certaines activités enzymatiques de la levure. *OENO One*, *18*, 219-224. https://doi.org/10.20870/oeno-one.1984.18.4.1745

Leão, C., & Van Uden, N. (1983). Effects of ethanol and other alkanols on the ammonium transport system of Saccharomyces cerevisiae. *biotechnology and bioengineering*, *25*(8), 2085-2089. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bit.260250817

Léglise, M. (2003). *Les méthodes biologiques appliquées à la vinification et à l'oenologie*. Le Courrier du livre.

Levenspiel, O. (1980). The monod equation: A revisit and a generalization to product inhibition situations. *Biotechnology and Bioengineering*, *22*(8), 1671-1687. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bit.260220810

Lilly, M., & Bauer, F. F., & Styger, G., & Lambrechts, M. G., & Pretorius, I. S. (2006). The effect of increased branched-chain amino acid transaminase activity in yeast on the production of higher alcohols and on the flavour profiles of wine and distillates. *FEMS Yeast Research*, *6*(5), 726-743. https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00057.x

Liu, L., & Wang, J., & Rosenberg, D., & Zhao, H., & Lengyel, G., & Nadel, D. (2018). Fermented beverage and food storage in 13,000 y-old stone mortars at Raqefet Cave, Israel: Investigating Natufian ritual feasting. *Journal of Archaeological Science: Reports*, *21*, 783 - 793. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2018.08.008

Liu, P. T., & Lu, L., & Duan, C. D., & Yan, G. L. (2016). The contribution of indigenous non-*Saccharomyces* wine yeast to improved aromatic quality of Cabernet Sauvignon wines by spontaneous fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, *71*, 356 - 363. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.031

Ljungdahl, P., & Daignan-Fornier, B. (2012). Regulation of Amino Acid, Nucleotide, and Phosphate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *190*, 885-929. https://doi.org/10.1534/genetics.111.133306

Lleixà, J., & Manzano, M., & Mas, A., & Portillo, M. C. (2016). *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* Competition during Microvinification under Different Sugar and Nitrogen Conditions. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 1959. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01959

Luedeking, R. T., & Piret, E. L. (1959). A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering*, *1*(4), 393-412. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jbmte.390010406

Luong, J. H. T. (1985). Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, *27*(3), 280-285. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bit.260270311

Luyten, K., & Riou, C., & Blondin, B. (2002). The hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* play different roles during enological fermentation. *Yeast*, *19*(8), 713-726. https://doi.org/10.1002/yea.869

Malherbe, S. (2003). *Modelisation de la fermentation alccolique en conditions oenologiques. Elaboration du modèle à partir des principaux mécanismes limitants de la cinétique fermentaire. Validation et application au contrôle des fermentations en cave (cuverie et besoins énergétiques)* Montpellier II].

Malherbe, S., & Fromion, V., & Hilgert, N., & Sablayrolles, J.-M. (2004). Modeling the effects of assimilable nitrogen and temperature on fermentation kinetics in enological conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, *86*(3), 261-272. https://doi.org/10.1002/bit.20075

Manginot, C., & Roustan, J. L., & Sablayrolles, J. M. (1998). Nitrogen demand of different yeast strains during alcoholic fermentation. Importance of the stationary phase. *Enzyme and Microbial Technology*, *23*(7), 511 - 517. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00080-5

Maqueda, M., & Zamora, E., & Alvarez, M., L., & Ramirez, M. (2012). Characterization, Ecological Distribution, and Population Dynamics of *Saccharomyces* Sensu Stricto Killer Yeasts in the Spontaneous Grape Must Fermentations of Southwestern Spain. *Appl Environ Microbiol*, *78*(3), 735-743. https://doi.org/10.1128/AEM.06518-11

Marechal, P. A., & I., & Poirier, I., & Gervais, P. (1999). The importance of the kinetics of application of physical stresses on the viability of microorganisms: significance for minimal food processing. *Trends in Food Science & Technology*, *10*(1), 15 - 20. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0924-2244(99)00012-6

Marín, M. R. (1999). Alcoholic Fermentation Modelling: Current State and Perspectives. *American Journal of Enology and Viticulture*, *50*(2), 166-178. https://www.ajevonline.org/content/ajev/50/2/166.full.pdf

Mendes-Ferreira, A., & Barbosa, C., & Lage, P., & Mendes-Faia, A. (2011). The impact of nitrogen on yeast fermentation and wine quality. *Ciencia e Tecnica Vitivinicola*, *26}*, 17-32.

Mendes-Ferreira, A., & Mendes-Faia, A., & Leão, C. (2004). Growth and fermentation patterns of Saccharomyces cerevisiae under different ammonium concentrations and its implications in winemaking industry. *J Appl Microbiol*, *97*(3), 540-545. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02331.x

Ministère de l'agriculture et de la souveraineté alimentaire. (2022). *Infographie - La viticulture française*. Retrieved 06/09/2022 from https://agriculture.gouv.fr/infographie-la-viticulture-francaise

Monod, J. (1949). The growth of bacterial cultures. *Annual Review of Microbiology*, *3*(1), 371-394. https://doi.org/10.1146/annurev.mi.03.100149.002103

Monteiro, F. F., & Bisson, L. F. (1991). Amino Acid Utilization and Urea Formation During Vinification Fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, *42*(3), 199-208. https://www.ajevonline.org/content/ajev/42/3/199.full.pdf

Morakul, S., & Mouret, J.-R., & Nicolle, P., & Trelea, I. C., & Sablayrolles, J.-M., & Athes, V. (2011). Modelling of the gas–liquid partitioning of aroma compounds during wine alcoholic fermentation and prediction of aroma losses. *Process Biochemistry*, *46*(5), 1125-1131. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.034

Mortimer, R., & Polsinelli, M. (1999). On the origins of wine yeast. *Research in Microbiology*, *150*(3), 199 - 204. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0923-2508(99)80036-9

Moser, H. (1958). *The dynamics of bacterial populations maintained in the chemostat*.

Mouret, J. R., & Camarasa, C., & Angenieux, M., & Aguera, E., & Perez, M., & Farines, V., & Sablayrolles, J.-M. (2014). Kinetic analysis and gas–liquid balances of the production of fermentative aromas during winemaking fermentations: Effect of assimilable nitrogen and temperature. *Food Research International*, *62*, 1-10. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.02.044

Mouret, J. R., & Farines, V., & Sablayrolles, J. M., & Trelea, I. C. (2015). Prediction of the production kinetics of the main fermentative aromas in winemaking fermentations. *Biochemical Engineering Journal*, *103*, 211 - 218. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.07.017

Mouret, J. R., & Nicolle, P., & Morakul, S., & Aguera, E., & Perez, M., & Athes, V., & Sablayrolles, J. M. (2013). Interest in Online Higher Alcohol and Ester Determinations during Winemaking Fermentations. In *Flavour Science*.

Neubauer, O., & Fromherz, K. (1911). Über den Abbau der Aminosäurenbei der Hefegärung. *hoppe-seyler's zeitschrift für physiologische chemie*, *70*, 326-350.

Nielsen, J., & Villadesen J., & G., L. (2011). *Bioreaction Engineering Principles*. Springer. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9688-6

Nieuwoudt, H., & Prior, B. A., & Pretorius, I., & Bauer, F. (2002). Glycerol in South African Table Wines: An Assessment of its Relationship to Wine Quality. *South African Journal of Enology and Viticulture*, *23*, 22-30. https://doi.org/10.21548/23-1-2151

Ohara, H., & Hiyama, K., & Yoshida, T. (2004). Non-competitive product inhibition in lactic acid fermentation from glucose. *Applied microbiology and biotechnology*, *36*, 773-776.

Ozcan, S., & Johnston, M. (1995). Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (HXT) genes to be induced by different levels of glucose. *Molecular and Cellular Biology*, *15*, 1564-1572. https://doi.org/10.1128/mcb.15.3.1564

Pangborn, R. M. (1980). A critical analysis of sensory responses to sweetness. *Carbohydrate Sweeteners in Foods and Nutrition, Academic Press, London*, 87-110.

RÈGLEMENT (UE) N o 1308/2013 DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 17 décembre 2013 portant organisation commune des marchés des produits agricoles et abrogeant les règlements (CEE) n o 922/72, (CEE) no 234/79, (CE) n o 1037/2001 et (CE) n o 1234/2007 du Conseil, (2013).

Peddie, H. A. B. (1990). Ester formation in brewery fermentations. *Journal of the Institute of Brewing*, *96*(5), 327-331. https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1990.tb01039.x

Penot, M. (2021). *Biologie du vin et de la bière*. https://planet-vie.ens.fr/thematiques/microbiologie/biologie-du-vin-et-de-la-biere

Peynaud, E., & Lafourcade, S. (1957). Sur les teneurs en thiamine b1 des vins et des jus de raisin. *Ind. Alim. Agrie*, *74*, 897-904.

Pretorius, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, *16*(8), 675-729. https://doi.org/10.1002/1097-0061(20000615)16:8<675::AID-YEA585>3.0.CO;2-B

Quain, D. E. (1985). A metabolic function for higher alcohol production in yeast. *Proceedings of the 20th European Brewery Convention Congress*, 307-314. https://ci.nii.ac.jp/naid/10011158800/en/

Rauhut, D. (1993). Yeasts—production of sulfur compounds. *Wine microbiology and biotechnology*, *6*, 183-223.

Reifenberger, E., & Boles, E., & Ciriacy, M. (1997). Kinetic Characterization of Individual Hexose Transporters of *Saccharomyces Cerevisiae* and their Relation to the Triggering Mechanisms of Glucose Repression. *European Journal of Biochemistry*, *245*(2), 324-333}. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00324.x

Remize, F., & Roustan, J. L., & Sablayrolles, J. M., & Barre, P., & Dequin, S. (1999). Glycerol overproduction by engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains leads to substantial changes in by-product formation and to a stimulation of fermentation rate in stationary phase. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*, 143-149.

Ribéreau-Gayon, P., & Glories, Y., & Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2017). Traitée d'oenologie.

Rodrigues de Sousa, H., & Spencer-Martins, I., & Gonçalves, P. (2004). Differential regulation by glucose and fructose of a gene encoding a specific fructose/h+ symporter in *Saccharomyces* sensu stricto yeasts. *Yeast*, *21*, 519—530. https://doi.org/10.1002/yea.1118

Rollero, S., & Bloem, A., & Camarasa, C., & Sanchez, I., & Ortiz-Julien, A., & Sablayrolles, J.-M., & Dequin, S., & Mouret, J.-R. (2014). Combined effects of nutrients and temperature on the production of fermentative aromas by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Applied microbiology and biotechnology*, *99*, 2291–2304. https://doi.org/10.1007/s00253-014-6210-9

Rollero, S., & Mouret, J.-R., & Bloem, A., & Sanchez, I., & Ortiz-Julien, A., & Sablayrolles, J.-M., & Dequin, S., & Camarasa, C. (2017). Quantitative 13C-isotope labelling-based analysis to elucidate the influence of environmental parameters on the production of fermentative aromas during wine fermentation. *Microbial Biotechnology*, *10}*(6), 1649-1662. https://doi.org/10.1111/1751-7915.12749

Rosenbrock, H. H. (1960). An Automatic Method for Finding the Greatest or Least Value of a Function. *The Computer Journal*, *3*(3), 175-184. https://doi.org/https://doi.org/10.1093/comjnl/3.3.175

Ruiz, J., & Kiene, F., & Belda, I., & Fracassetti, D., & Marquina, D., & Navascués, E., & Calderon, F., & Benito, A. R., D., & Santos, A., & Benito, S. (2019). Effects on varietal aromas during wine making: a reviewof the impact of varietal aromas on the flavor of wine. *Appled Microbiology and Biotechnology*, *103*(18), 7425-7450. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00253-019-10008-9

Sablayrolles, J.-M., & Barre, P. (1986). Evaluation des besoins en oxygène de fermentations alcooliques en conditions oenologiques simulées. *Sciences des aliments*.

Sablayrolles, 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*, 127-133.

Sablayrolles, J. M., & Barre, P., & Grenier, P. (1987). Design of a laboratory automatic system for studying alcoholic fermentations in anisotermal enological conditions. *Biotechnology Techniques*, *1*, 191-184. https://doi.org/doi: 10.1007/BF00227557

Sanchez, Y., & Taulien, J., & Borkovich, K. A., & Lindquist, S. (1992). Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. *The EMBO Journal*, *11*, 2357-2364. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05295.x

Seguinot, P., & Rollero, S., & Sanchez, I., & J.-M., S., & Ortiz-Julien, A., & Camarasa, C., & Mouret, J.-R. (2018). Impact of the timing and the nature of nitrogen additions on the production kinetics of fermentative aromas by *Saccharomyces cerevisiae* during winemaking fermentation in synthetic media. *Food Microbiology*, *76*, 29-39. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.04.005

Segurel, M. A., & Razungles, A. J., & Riou, C., & Salles, M., & Baumes, R. L. (2004). Contribution of Dimethyl Sulfide to the Aroma of Syrah and Grenache Noir Wine and Estimation of Its Potential in Grapes of These Varieties. *J. Agric. Food Chem.*, *52*(23), 7084-7093. https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jf049160a

Septime, M. (2011). *L'OGM qui donne mal à la tête*. Retrieved 20/07/2022 from https://www.mistelle.fr/L-OGM-qui-donne-mal-a-la-tete.html

Sevely, Y., & Pourciel, J. B., & Rauzy, G., & Bovee, J. P. (1981). Modelling, Identification and Control of the Alcohol Fermentation in a Cascade Reactor. *IFAC Proceedings Volumes*, *14*(2), 2821-2828. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1474-6670(17)63891-6

Shampine, L. F., & Reichelt, M. W. (1997). The Matlab ODE Suite. *SIAM Journal on Scientific Computing*, *18*(1), 1-22. https://doi.org/https://doi.org/10.1137/S1064827594276424

Strehaiano, P. (1984). *Phénomènes d'inhibition et fermentation alcoolique*

Styger, H., & Prior, B., & Bauer, B. B. (2011). Wine flavor and aroma. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *38*, 1145. https://doi.org/10.1007/s10295-011-1018-4

Swiegers, J. H., & Pretorius, I. S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavor. *57*, 131 - 175. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2164(05)57005-9

Taillandier, P., & Ramon Portugal, F., & Fuster, A., & Strehaiano, P. (2007). Effect of ammonium concentration on alcoholic fermentation kinetics by wine yeasts for high sugar content. *Food Microbiology*, *24*(1), 95 - 100. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.04.002

Taniguchi, M., & Kotani, N., & Kobayashi, T. (1987). High-concentration cultivation of lactic acid bacteria in fermentor with cross-flow filtration. *Journal of Fermentation Technology*, *65*(2), 179-184. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0385-6380(87)90162-2

Taoukis, P. S., & Koutsoumanis, K., & E., B. G. J. (1999). Use of time-temperature integrators and predictive modelling for shell life control of chilled fish under dynamic storage conditions. *International Journal of Food Microbiology*, *53*(1), 21-31. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00142-7

Tayeb, J., & Bouillanne, C., & Desmazeaud, J. M. (1984). Computerized control of growth with temperature in a mixed culture of lactic acid bacteria. *Journal of Fermentation Technology*, *62*, 461-470. https://ci.nii.ac.jp/naid/110002672872/en/

Taylor, G. T., & Thurston, P. A., & Kirsop, B. H. (1979). The influence of lipids derived from malt spent grains on yeast metabolism and fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, *85*(4), 219-227. https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1979.tb03911.x

Tessier, G. (1942). Croissance des populations bactériennes et quantité d'aliment disponiible. *Rev. Sci Paris*, *3208*, 209-214.

Thurston, P. A., & Taylor, R., & Ahvenainen, J. (1981). Effects of Linoleic Acid Supplements on the Synthesis by Yeast of Lipids and Acetate Esters. *Journal of the Institute of Brewing*, *87*(2}), 92-95}. https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1981.tb03995.x

Torija, M. J., & Rozès, N., & Poblet, M., & Guillamón, J. M., & Mas, A. (2003). Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, *80*(1), 47 - 53. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00144-7

Van Vuuren, H. J. J., & Jacobs, C. J. (1992). Killer yeasts in the wine industry : A review. *American Journal of Enology and Viticulture*, *43*, 119-128.

Verhulst, P.-F. (1838). Notice sur la loi que la population poursuit dans son accroissement. *Correspondance mathématique et physique*, *10*, 113-121.

Verstrepen, K. V., & Derdelinckx, G., & Dufour, J. P., & Winderickx, J., & Thevelein, J. M., & Pretorius, I. S., & Delvaux, F. R. (2003). Flavor-active esters: Adding fruitiness to beer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *96*(2), 110 - 118. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1389-1723(03)90112-5

Viana, F., & Gil, J. V., & Genovés, S., & Vallés, S., & Manzanares, P. (2008). Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. *Food Microbiology*, *25*(6), 778 - 785. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.04.015

Viti Veille. (2021). *La surface mondiale de vigne se stabilise*. https://www.mon-viti.com/filinfo/international/la-surface-mondiale-de-vigne-se-stabilise

Walker, G. M., & Birch, R. M., & Chandrasena, G., & Maynard, A. I. (1996). Magnesium, Calcium, and Fermentative Metabolism in Industrial Yeasts. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, *54*(1), 13-18. https://doi.org/10.1094/ASBCJ-54-0013

Wang, L., & Ridgway, D., & Gu, T., & Moo-Young, M. (2008). Kinetic Modeling of Cell Growth and Product Formation in Submerged Culture of Recombinant Aspergillus Niger. *Chemical Engineering Communications*, *196*(4), 481-490. https://doi.org/10.1080/00986440802483947

Wang, S. S., & Brandriss, M. C. (1986). Proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of the cloned PUT1 gene. *Molecular and Cellular Biology*, *7*, 2638-2645. https://europepmc.org/articles/PMC367820

Wess, J., & Brinek, M., & Boles, E. (2019). Improving isobutanol production with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by successively blocking competing metabolic pathways as well as ethanol and glycerol formation. *Biotechnol Biofuels*, *12*, 173-187. https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s13068-019-1486-8

Whitener, M. E. B., & Stanstrup, J., & Carlin, S., & Divol, B., & Du Toit, M., & Vrhovsek, U. (2017). Effect of non-*Saccharomyces* yeasts on the volatile chemical profile of Shiraz wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *23*(2), 179-192. https://doi.org/10.1111/ajgw.12269

Williams, D., & Yousefpour, P., & Wellington, E. M. H. (1986). On-line adaptive control of a fed-batch fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, *28*(5), 631-645. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bit.260280502

Williams, L. A. (1982). Heat Release in Alcoholic Fermentation: a Critical Reappraisal. *American Journal of Enology and Viticulture*, *33*(3), 149-153. https://www.ajevonline.org/content/33/3/149

Winter, J., & Loret, M.-O., & Uribelarrea, J.-L. (1989). Inhibition and growth factor deficiencies in alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Microbiology*, *18*, 247-252. https://doi.org/10.1007/BF01570300

Zhang, K., & Sawaya, M. R., & Eisenberg, D. S., & Liao, J. C. (2008). Expanding metabolism for biosynthesis of nonnatural alcohols. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*, 20653-20658. https://doi.org/10.1073/pnas.0807157106

Zoecklein, B. (1998). *A Review of Méthode Champenoise Production*.

Zott, K., & Thibon, C., & Bely, M., & Lonvaud-Funel, A., & Dubourdieu, D., & Masneuf-Pomarede, I. (2011). The grape must non-*Saccharomyces* microbial community: Impact on volatile thiol release. *International Journal of Food Microbiology*, *151*(2), 210 - 215. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.026