



**HAL**  
open science

# Vinification continue avec levures immobilisées : analyse du système et conception du réacteur industriel

Caroline Kassim Houssenyaly

## ► To cite this version:

Caroline Kassim Houssenyaly. Vinification continue avec levures immobilisées : analyse du système et conception du réacteur industriel. Génie des procédés. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 2012. Français. NNT : 2012INPT0013 . tel-04228188

**HAL Id: tel-04228188**

**<https://theses.hal.science/tel-04228188>**

Submitted on 4 Oct 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.



Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du  
**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

**Délivré par :**

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

**Discipline ou spécialité :**

Génie des Procédés et de l'Environnement

---

**Présentée et soutenue par :**

Caroline KASSIM : AGEE7@3>K

le : lundi 27 février 2012

**Titre :**

Vinification continue avec levures immobilisées:  
Analyse du système et conception du réacteur industriel.

---

**Ecole doctorale :**

Mécanique, Energétique, Génie civil et Procédés (MEGeP)

**Unité de recherche :**

Laboratoire de Génie Chimique de Toulouse UMR 5503

**Directeur(s) de Thèse :**

Patricia TAILLANDIER, Professeur

Marion ALLIET, Maître de conférence

**Rapporteurs :**

Jean-Marie SABLAYROLLES, Directeur de recherche

Martine MIETTON PEUCHOT, Professeur

**Autre(s) membre(s) du jury**

Jean-Luc FAVAREL, Responsable R&D

Maria de Fatima TEIXEIRA, Directeur d'entreprise

Pierre STREHAIANO, Professeur



**Vinification continue avec levures  
immobilisées : Analyse du système et  
conception du réacteur industriel.**

**Continuous wine-making with  
immobilized yeast cells: System analysis  
and industrial reactor design.**



# **Table des matières**



<b>Table des matières</b> .....	I
<b>Liste des figures</b> .....	VII
<b>Liste des tableaux</b> .....	XV
<b>Lexique et abréviations</b> .....	XXIII
<b>Introduction</b> .....	1
<b>Partie I :</b> .....	5
<b>Contexte de l'étude VINNEO</b> .....	5
<b>I. Les enjeux d'une 'nouvelle révolution vitivinicole'</b> .....	7
<b>I.1 Les conclusions du rapport Pomel (2006)</b> .....	7
<b>I.2 La réalité du marché en France et à l'étranger</b> .....	7
<b>II. La stratégie de 'conquête des marchés' de VINOVALIE</b> .....	8
<b>III. Le projet VINNEO</b> .....	9
<b>III.1 Présentation générale du projet</b> .....	9
<b>III.2 Présentation technique du projet</b> .....	13
<b>IV. La phase 2 T2</b> .....	15
<b>Partie II :</b> .....	17
<b>Introduction bibliographique</b> .....	17
<b>I. Les vinifications en rouge</b> .....	19
<b>I.1. La vinification en rouge 'classique'</b> .....	19
<b>I.2. L'élaboration des vins thermovinifiés</b> .....	23
<b>II. Focus sur les étapes de fermentations</b> .....	26
<b>II.1. Fermentation alcoolique</b> .....	26
<b>II.2. Dégradation de l'acide malique</b> .....	34
<b>III. Les microorganismes immobilisés en œnologie</b> .....	37
<b>III.1. Les différentes méthodes d'immobilisation</b> .....	37
<b>III.2. Levures libres versus levures immobilisées</b> .....	40
<b>III.3. Mise en œuvre de microorganismes immobilisés</b> .....	42
<b>III.4. Avantages des levures immobilisées</b> .....	45
<b>III.5. Les applications existantes en œnologie</b> .....	45

IV. La fermentation continue, passé ou futur ?.....	49
IV.1. Le pourquoi des abandons des fermenteurs continus .....	49
IV.2. Microorganismes immobilisés, le futur de la fermentation continue ? .....	51
<b>Partie III :</b> .....	63
<b>Détermination des cinétiques des levures immobilisées</b> .....	63
<b>I. Matériel et méthodes</b> .....	65
<b>I.1 Milieux de fermentation</b> .....	65
<b>I.2. Levures</b> .....	65
<b>I.3. Préparation de l'inoculum</b> .....	66
<b>I.4. Fermentation en batch</b> .....	66
<b>I.5. Suivi des fermentations</b> .....	67
<b>II. Etude de la fermentation alcoolique</b> .....	70
<b>II.1. Impact de la concentration en billes</b> .....	71
<b>II.2. Levures libres versus levures immobilisées</b> .....	77
<b>II.3 Détachement cellulaire, croissance et viabilité</b> .....	87
<b>II.4 Conclusion et choix de la concentration en billes</b> .....	89
<b>III. Etude de la fermentation maloalcoolique et faisabilité d'une double fermentation</b> .....	90
<b>III.1 Désacidification du jus par <i>Sch.pombe</i></b> .....	90
<b>III.2 Désacidification du jus en culture mixte</b> .....	93
<b>III.3 Désacidification du vin</b> .....	93
<b>IV. Conclusion</b> .....	94
<b>Partie IV :</b> .....	97
<b>Conception d'un réacteur de vinification en continu sur levures immobilisées à l'échelle laboratoire</b> .....	97
<b>I. Colonne verticale à lit fluidisé recirculé</b> .....	99
<b>I.1 Calcul des conditions opératoires pour la mise en œuvre de la fermentation en continu en lit fluidisé</b> .....	99
<b>I.2 Description du montage expérimental</b> .....	102
<b>I.3. Analyse des cinétiques</b> .....	103
<b>I.4. Conclusion</b> .....	107
<b>II. Colonne à lit fixe verticale</b> .....	107
<b>II.1 Description du montage expérimental</b> .....	107
<b>II.2. Analyse des cinétiques</b> .....	109
<b>II.3. Evolution des populations et des billes</b> .....	111
<b>II.4 Rétention de CO<sub>2</sub> et fluidisation spontanée</b> .....	112
<b>II.5 Conclusion</b> .....	114

<b>III. Colonne à lit fixe horizontale</b> .....	114
<b>III.1 Description du montage expérimental</b> .....	114
<b>III.2. Analyse des cinétiques</b> .....	115
<b>IV. Comparaison des 3 montages étudiés</b> .....	119
<b>Partie V :</b> .....	121
<b>Validation du procédé à l'échelle pilote en conditions industrielles</b> .....	121
<b>I. Matériel et méthodes</b> .....	123
<b>I.1. Jus de raisin</b> .....	123
<b>I.2. Levures</b> .....	123
<b>I.3. Montage expérimental</b> .....	123
<b>I.4. Préparation des levures <i>S.cerevisiae</i> et <i>Sch.pombe</i> et démarrage du procédé continu</b> .....	125
<b>I.5. Suivi de la double fermentation continue</b> .....	125
<b>I.6. Analyse du profil aromatique</b> .....	126
<b>II. Déroulement des essais</b> .....	126
<b>III. Résultats cinétiques</b> .....	127
<b>III.1 Analyse de la mise en route du réacteur</b> .....	127
<b>III.2 Analyse du fonctionnement en continu</b> .....	129
<b>III.3 Evolution du lit au cours du fonctionnement continu</b> .....	133
<b>III.4 Rétention de CO<sub>2</sub> et fluidisation spontanée</b> .....	133
<b>III.5 Analyse du profil aromatique</b> .....	135
<b>III.6 Bilan de l'essai pilote</b> .....	136
<b>IV. Perspectives d'industrialisation</b> .....	136
<b>Partie VI :</b> .....	139
<b>Analyse procédé du fonctionnement de la configuration retenue</b> .....	139
<b>I. Simulation dans le cas d'un fonctionnement idéal</b> .....	141
<b>I.1 Modélisation de la vitesse en fonction de la concentration en sucres résiduels</b> .....	141
<b>I.2 Rapprochement avec un fonctionnement idéal</b> .....	143
<b>I.3 Conclusion</b> .....	145
<b>II. Etude de la distribution des temps de séjour</b> .....	145
<b>II.1 Montage expérimental</b> .....	146
<b>II.2 Suivi cinétique</b> .....	147
<b>II.3 Etude de la distribution des temps de séjour</b> .....	147
<b>III. Conclusion</b> .....	155

<b>Partie VII :</b> .....	157
<b>Optimisation du procédé</b> .....	157
<b>I. Simulation dans le cas d'un fonctionnement idéal RAC ou piston</b> .....	159
<b>I.1 Optimisation en réacteur mono-étagé</b> .....	159
<b>I.2 Optimisation en réacteur bi-étagé</b> .....	161
<b>II. Résultats expérimentaux</b> .....	165
<b>II.1 Optimisation en réacteur mono-étagé</b> .....	165
<b>II.2 Optimisation en réacteur bi-étagé</b> .....	166
<b>III. Conclusion</b> .....	170
<b>Partie VIII :</b> .....	171
<b>Transfert industriel du procédé</b> .....	171
<b>I. Matériel et méthodes</b> .....	173
<b>I.1. Jus de raisin</b> .....	173
<b>I.2. Levures</b> .....	174
<b>I.3. Montage expérimental</b> .....	174
<b>I.4. Préparation des levures et démarrage du procédé</b> .....	176
<b>I.5. Suivi de la fermentation continue industrielle</b> .....	177
<b>II. Résultats cinétiques</b> .....	177
<b>II.1 Analyse de l'étape de réhydratation</b> .....	177
<b>II.2 Analyse de la phase batch</b> .....	177
<b>II.3 Analyse du fonctionnement en continu</b> .....	179
<b>II.4 Analyse du profil aromatique</b> .....	182
<b>II.5 Bilan de l'essai industriel</b> .....	184
<b>III. Faisabilité d'industrialisation</b> .....	186
<b>Conclusion</b> .....	187
<b>Références</b> .....	193

## **Liste des figures**



Figure 1 : Logo du projet VINNEO .....	9
Figure 2 : Financeurs du projet VINNEO .....	9
Figure 3 : Pôles de compétitivité ayant labélisés le projet VINNEO.....	10
Figure 4 : Partenaires du projet VINNEO .....	13
Figure 5 : Schéma organisationnel du projet VINNEO .....	13
Figure 6 : Schéma de vinification en rouge ‘classique’ .....	20
Figure 7 : Illustration d’un érafloir.....	20
Figure 8 : Exemple d’une chambre de chauffe utilisée pour le thermotraitement des raisins .	24
Figure 9 : Schéma de vinification des vins thermotraités .....	26
Figure 10: Photo de la levure <i>S.cerevisiae</i> .....	27
Figure 11 : Voie métabolique de la glycolyse.....	28
Figure 12 : Voie de production d’éthanol .....	28
Figure 13 : Voie de formation du glycérol.....	29
Figure 14 : Cycle de Krebs.....	30
Figure 15 : Devenirs possibles de l’acide pyruvique (d’après Ribéreau-Gayon et al. 1975)...	32
Figure 16 : Photo de la bactérie <i>O.Oeni</i> .....	35
Figure 17 : Dégradation de l’acide malique par <i>O.Oeni</i> .....	35
Figure 18 : Photo de la levure <i>Sch.pombe</i> .....	36
Figure 19 : Voie métabolique de la dégradation de l’acide malique par <i>Sch.pombe</i> .....	36
Figure 20 : Classification des systèmes d’immobilisation, d’après Willaert et Baron (1996).	38
Figure 21 : Les quatre classes de cellules immobilisées (Karel et al. 1985).....	38
Figure 22 : Cinq réacteurs à cellules immobilisées communs (Verbelen et al. 2006) .....	43
Figure 23 : Structure de l’alginate, polymère d’acides mannuronique et guluronique .....	46
Figure 24 : Schéma de fabrication des levures immobilisées dans de l’alginate de calcium... 46	46
Figure 25 : Illustration de l’utilisation des levures immobilisées pour la prise de mousse..... 47	47
Figure 26 : Mise en œuvre des levures immobilisées pour la désacidification..... 48	48
Figure 27 : Schéma du vinificateur continu (Ribéreau-Gayon et al. 1976) .....	49
Figure 28 : Schéma du procédé de fabrication de la bière .....	53
Figure 29 : Illustration d’un ébulliomètre .....	68
Figure 30 : Représentation du quadrillage d’une cellule de Thoma.....	69

Figure 31 : Cinétiques de fermentation alcoolique obtenues pour différentes concentrations en billes de <i>S.cerevisiae</i> lors des essais réalisés en batch sans recyclage du milieu.....	71
Figure 32 : Evolution des cinétiques de fermentation alcoolique (gauche) et de la population en phase liquide (droite) au cours des recyclages pour des concentrations en billes de <i>S.cerevisiae</i> de 152,5 (a-); 89,0 g.L <sup>-1</sup> (b-) .....	74
Figure 33 : Evolution des cinétiques de fermentation alcoolique (gauche) et de la population en phase liquide (droite) au cours des recyclages pour des concentrations en billes de <i>S.cerevisiae</i> de 39,5 (a-); 9,1 g.L <sup>-1</sup> (b-) .....	75
Figure 34 : Evolution du diamètre des billes au cours des recyclages lors des essais batch pour différentes concentrations en billes de <i>S.cerevisiae</i> .....	76
Figure 35 : Consommation en sucres et production de CO <sub>2</sub> au cours des essais de fermentation en batch en levures libres et levures immobilisées à 152,5 et 39,5 g.L <sup>-1</sup> de billes .....	78
Figure 36 : Vitesse de production de CO <sub>2</sub> au cours des essais de fermentation en batch en levures libres et levures immobilisées à 152,5 et 39,5 g.L <sup>-1</sup> de billes .....	79
Figure 37 : Profil de l'activité spécifique des levures libres au cours de la fermentation en batch .....	83
Figure 38 : Profils des activités spécifiques des 3 systèmes (levures libres et levures immobilisées à 152,5 et 39,5 g.L <sup>-1</sup> de billes) au cours de la fermentation en batch .....	84
Figure 39 : Observation de la couche externe des billes en fin de fermentation par microscopie à épifluorescence sur une coupe transversale de bille (à gauche pour l'essai à 39,5 g.L <sup>-1</sup> ; à droite pour l'essai à 152,5 g.L <sup>-1</sup> ) .....	86
Figure 40 : Photos des billes en fin de fermentation (à gauche pour l'essai à 39,5 g.L <sup>-1</sup> ; à droite pour l'essai à 152,5 g.L <sup>-1</sup> ) .....	86
Figure 41 : Evolution de la population levurienne libre et de sa viabilité au cours des recyclages pour les quatre concentrations en billes de <i>S.cerevisiae</i> : a- 152,5 g.L <sup>-1</sup> ; b- 89,0 g.L <sup>-1</sup> ; c- 39,5 g.L <sup>-1</sup> ; d- 9,1 g.L <sup>-1</sup> .....	88
Figure 42 : Observation de la couche externe des billes de <i>S.cerevisiae</i> en début et fin de fermentation batch à 9,1 g.L <sup>-1</sup> de billes à l'échelle laboratoire par microscopie électronique à balayage.....	89
Figure 43 : Cinétiques de désacidification du jus pour trois concentrations en <i>Sch.pombe</i> en cultures pures en batch .....	91
Figure 44 : Effet de la concentration en billes sur la vitesse de fermentation maloalcoolique en culture pure en batch .....	91
Figure 45 : Cinétiques de fermentation maloalcoolique au cours du recyclage en cultures pures en batch pour 10 g.L <sup>-1</sup> de billes de <i>Sch.pombe</i> .....	92
Figure 46 : Photo et schéma du montage expérimental du réacteur fluidisé recirculé continu .....	103

Figure 47 : Comparaison des cinétiques de fermentation alcoolique de la phase de démarrage du réacteur à lit fluidisé recirculé avec les essais batch pour 39,5 g.L <sup>-1</sup> de billes de <i>S.cerevisiae</i> .....	104
Figure 48 : Suivi cinétique du réacteur à lit fluidisé recirculé fonctionnant en continu avec 39,5 g.L <sup>-1</sup> de billes de <i>S.cerevisiae</i> .....	105
Figure 49 : Vitesses de consommation des sucres associées au fonctionnement continu du réacteur à lit fluidisé recirculé à 39,5 g.L <sup>-1</sup> de billes de <i>S.cerevisiae</i> .....	106
Figure 50 : Photo et schéma du montage expérimental du réacteur de type lit fixe vertical continu .....	108
Figure 51 : Evolution des substrats et produits pendant la phase de démarrage en batch du réacteur lit fixe vertical à 45,6 g.L <sup>-1</sup> de billes de <i>S.cerevisiae</i> et 50,6 g.L <sup>-1</sup> de billes de <i>Sch.pombe</i> .....	109
Figure 52 : Suivi cinétique du lit fixe vertical à 45,6 g.L <sup>-1</sup> de billes de <i>S.cerevisiae</i> et 50,6 g.L <sup>-1</sup> de billes de <i>Sch.pombe</i> fonctionnant en continu .....	110
Figure 53 : Vitesses de consommation des sucres associées au réacteur lit fixe vertical à 45,6 g.L <sup>-1</sup> de billes de <i>S.cerevisiae</i> et 50,6 g.L <sup>-1</sup> de billes de <i>Sch.pombe</i> fonctionnant en continu .....	111
Figure 54 : Evolution de la hauteur du lit au cours du fonctionnement en continu du réacteur lit fixe vertical à 45,6 g.L <sup>-1</sup> de billes de <i>S.cerevisiae</i> et 50,6 g.L <sup>-1</sup> de billes de <i>Sch.pombe</i> ...	112
Figure 55 : Photo illustrant la formation des poches de gaz au sein du lit de billes dans le réacteur lit fixe vertical continu .....	112
Figure 56 : Photos descriptives de la fluidisation intermittente dans le réacteur continu de type lit fixe à l'échelle laboratoire .....	113
Figure 57 : Photo du montage expérimental du réacteur lit fixe horizontal continu .....	115
Figure 58 : Evolution des substrats et produits pendant la phase de démarrage du continu en réacteur lit fixe horizontal à 50,4 g.L <sup>-1</sup> de billes de <i>S.cerevisiae</i> et 56,7 g.L <sup>-1</sup> de billes de <i>Sch.pombe</i> .....	116
Figure 59 : Suivi cinétique du lit fixe horizontal fonctionnant en continu à 50,4 g.L <sup>-1</sup> de billes de <i>S.cerevisiae</i> et 56,7 g.L <sup>-1</sup> de billes de <i>Sch.pombe</i> .....	118
Figure 60 : Photos illustrant le traçage au bleu de méthylène de l'alimentation du réacteur lit fixe horizontal continu .....	119
Figure 61 : Photo du montage expérimental pilote (170 L) .....	124
Figure 62 : Photo de la grille supérieure du pilote après la phase d'acclimatation des <i>Sch.pombe</i> .....	127
Figure 63 : Suivi du fonctionnement en continu du réacteur pilote (170 L) à 34 g.L <sup>-1</sup> de billes de <i>S.cerevisiae</i> et 42 g.L <sup>-1</sup> de billes de <i>Sch.pombe</i> .....	130
Figure 64 : Vitesses de fermentations alcoolique et maloalcoolique au cours du fonctionnement continu en réacteur pilote (170 L) à 34 g.L <sup>-1</sup> de billes de <i>S.cerevisiae</i> et 42 g.L <sup>-1</sup> de billes de <i>Sch.pombe</i> .....	131

Figure 65 : Evolution des substrats et produits de fermentation au cours du fonctionnement continu en réacteur pilote (170 L) à 34 g.L <sup>-1</sup> de billes de <i>S.cerevisiae</i> et 42 g.L <sup>-1</sup> de billes de <i>Sch.pombe</i> .....	132
Figure 66 : Evolution de la hauteur du lit de billes au repos au cours de l'essai pilote .....	133
Figure 67 : Solubilité du CO <sub>2</sub> dans un vin de table sec en fonction de la température (Boulton et al. 1996).....	134
Figure 68 : Solubilité du CO <sub>2</sub> selon la température et la pression .....	134
Figure 69 : Vitesses moyennes expérimentales de la consommation des sucres en fonction de la concentration en sucres résiduels pour les différentes concentrations en billes de <i>S.cerevisiae</i> , d'après les cinétiques batch stabilisées .....	142
Figure 70 : Comparaison du modèle cinétique et des cinétiques expérimentales obtenues en batch correspondantes pour une concentration en billes de 39,5 g.L <sup>-1</sup> de <i>S.cerevisiae</i> .....	143
Figure 71 : Suivi cinétique en fonctionnement continu du réacteur laboratoire (10 L) utilisé pour l'analyse de la distribution de temps de séjour .....	147
Figure 72 : Suivi de la conductivité après injection d'un pulse de NaCl pour l'analyse de distribution de temps de séjour dans le réacteur laboratoire (10 L).....	148
Figure 73 : Distribution E(Téta) en fonction de Téta obtenue à partir du suivi de conductivité après injection d'un pulse dans le réacteur laboratoire (10 L) .....	149
Figure 74 : Comparaison de la distribution de temps séjour réelle avec celle du modèle piston dispersé à $Pe^{-1} = 0,2$ .....	150
Figure 75 : Comparaison de la distribution de temps de séjour réelle avec celle des modèles RAC en série à N = 2 et N = 3 .....	151
Figure 76 : Evolution de la distribution de temps de séjour E(t) suivant les différents rapports de volumes dans un modèle deux RAC en série de volumes différents.....	153
Figure 77 : Profils théoriques de la concentration en sucres suivant la hauteur de colonne en fonction de la répartition des volumes de deux RAC en série .....	153
Figure 78 : Evolution de la concentration expérimentale en sucres suivant la hauteur du réacteur laboratoire (10 L).....	154
Figure 79 : Evolution des temps de séjour calculés suivant les modèles RAC et piston en fonction des concentrations en billes de <i>S.cerevisiae</i> et <i>Sch.pombe</i> .....	160
Figure 80 : Evolution théorique du volume utile du réacteur en fonction du coût en billes en considérant les modèles RAC et piston.....	161
Figure 81 : Photo du montage expérimental du procédé bi-étagé à l'échelle laboratoire .....	167
Figure 82 : Suivi cinétique du réacteur bi-étagé à 39,5-39,5 et 9,1-9,1 g.L <sup>-1</sup> de <i>S.cerevisiae</i> et <i>Sch.pombe</i> dans les 1 <sup>e</sup> et 2 <sup>e</sup> étages respectivement, en fonctionnement continu en laboratoire .....	168
Figure 83 : Suivi cinétique du réacteur bi-étagé à 9,1-18,2 et 9,1-0 g.L <sup>-1</sup> de <i>S.cerevisiae</i> et <i>Sch.pombe</i> dans les 1 <sup>e</sup> et 2 <sup>e</sup> étages respectivement, en fonctionnement continu en laboratoire .....	169

Figure 84 : Photo du réacteur industriel (120 hL) de vinification continue.....	175
Figure 85 : Photos illustrant le chargement des billes de <i>S.cerevisiae</i> et <i>Sch.pombe</i> dans la cuve industrielle (120 hL) pour la phase de réhydratation.....	176
Figure 86 : Photos illustrant les débordements visibles en cours de fermentation à l'échelle industrielle (120 hL).....	178
Figure 87 : Suivi de la phase batch des essais industriels (120 hL) réalisés sur 39,5 g.L <sup>-1</sup> de billes de <i>S.cerevisiae</i> et 39,5 g.L <sup>-1</sup> de billes de <i>Sch.pombe</i> .....	178
Figure 88 : Suivi du fonctionnement continu du réacteur industriel (120 hL) pendant la campagne 2011 (39,5 g.L <sup>-1</sup> de billes de <i>S.cerevisiae</i> et 39,5 g.L <sup>-1</sup> de billes de <i>Sch.pombe</i> )..	180
Figure 89 : Vitesses de fermentation alcoolique et maloalcoolique obtenues au cours du fonctionnement continu du réacteur industriel (120 hL, 39,5 g.L <sup>-1</sup> de billes de <i>S.cerevisiae</i> et 39,5 g.L <sup>-1</sup> de billes de <i>Sch.pombe</i> ) .....	181
Figure 90 : Evolution des substrats et produits de fermentation au cours du fonctionnement en continu du réacteur industriel (120 hL, 39,5 g.L <sup>-1</sup> de billes de <i>S.cerevisiae</i> et 39,5 g.L <sup>-1</sup> de billes de <i>Sch.pombe</i> ).....	182
Figure 91 : Présentation du profil sensoriel des vins produits en continu à l'échelle industrielle (120 hL) et traités par centrifugation laboratoire .....	183
Figure 92 : Présentation du profil sensoriel du vin produit en continu et traité à l'échelle industrielle (120 hL) et comparaison avec un assemblage produit en cave .....	184



# **Liste des tableaux**



Tableau 1 : Analyse comparative des caractères distinctifs entre les vins ‘champions’ et les produits Vinovalie .....	8
Tableau 2 : Planning prévisionnel de la tâche 2, phase 2 du projet VINNEO .....	15
Tableau 3 : Effets conjugués du sucre et de l’oxygène sur la régulation métabolique de la levure <i>S.cerevisiae</i> (Strehaiano, 1984) .....	31
Tableau 4 : Principaux composés aromatiques du vin (d’après Swiegers et al. 2005) .....	34
Tableau 5 : Synthèse des études de fermentation alcoolique continue sur levures immobilisées pour la production d’éthanol publiées .....	58
Tableau 6 : Synthèse des études de fermentation alcoolique continue sur levures immobilisées pour la production d’éthanol publiées (suite) .....	59
Tableau 7 : Synthèse des études de fermentation alcoolique continue sur levures immobilisées pour la production de bière publiées .....	60
Tableau 8 : Synthèse des études de fermentation alcoolique continue sur levures immobilisées pour la production de vin publiées .....	61
Tableau 9 : Synthèse des études de fermentation maloalcoolique continue sur levures immobilisées publiées .....	61
Tableau 10 : Composition du milieu de pré-culture YEPD .....	66
Tableau 11 : Composition du réactif DNS .....	67
Tableau 12 : Niveaux d’inoculation utilisés pour les essais de fermentation alcoolique en batch .....	71
Tableau 13 : Population dans la phase liquide en fin de fermentation alcoolique batch sans recyclage du milieu, pour différentes concentrations en billes de <i>S.cerevisiae</i> .....	72
Tableau 14 : Durée moyenne d’un cycle batch après stabilisation des cinétiques de fermentation pour les différentes concentrations en billes de <i>S.cerevisiae</i> .....	73
Tableau 15 : Présentation des essais réalisés en levures libres en batch pour le calcul d’activité spécifique .....	77
Tableau 16 : Présentation des essais réalisés en levures immobilisées en batch pour le calcul d’activité spécifique .....	78
Tableau 17 : Evolution des populations au cours de la fermentation en batch pour les essais en levures libres et levures immobilisées à 152,5 et 39,5 g.L <sup>-1</sup> de billes .....	80
Tableau 18 : Présentation du bilan matière pour les essais batch en levures libres et en levures immobilisées à 152,5 et 39,5 g.L <sup>-1</sup> de billes .....	81
Tableau 19 : Présentation des rendements produits Y <sub>PS</sub> pour les essais batch en levures libres et en levures immobilisées à 152,5 et 39,5 g.L <sup>-1</sup> de billes .....	82

Tableau 20 : % de CO <sub>2</sub> en provenance des différentes voies métaboliques pour les essais batch en levures libres et en levures immobilisées à 152,5 et 39,5 g.L <sup>-1</sup> .....	82
Tableau 21 : Présentation des essais de désacidification réalisés en levures <i>Sch.pombe</i> immobilisées.....	90
Tableau 22 : Evolution des vitesses de désacidification et des populations en phase liquide au cours des cycles pour les différentes concentrations en billes de <i>Sch.pombe</i> en cultures pures en batch .....	92
Tableau 23 : Evolution des vitesses de désacidification au cours des cycles pour les différentes concentrations en billes de <i>Sch.pombe</i> dans le cas de cultures mixtes en batch....	93
Tableau 24 : Vitesse de désacidification en cultures mixtes sur vin et temps de séjour théorique pour une double fermentation continue pour les différentes concentrations en billes de <i>Sch.pombe</i> .....	94
Tableau 25 : Paramètres descriptifs de la colonne utilisée en lit fluidisé recirculé continu...	100
Tableau 26 : Calculs des débits d'alimentation nécessaires dans le cas d'un fonctionnement type RAC pour les différentes concentrations en billes de <i>S.cerevisiae</i> .....	100
Tableau 27 : Calculs des vitesses minimales de fluidisation pour les différentes concentrations en billes de <i>S.cerevisiae</i> .....	101
Tableau 28 : Calculs des débits de recirculation opératoires pour les différentes concentrations en billes de <i>S.cerevisiae</i> .....	102
Tableau 29 : Données initiales du montage expérimental lit fluidisé recirculé continu .....	102
Tableau 30 : Comparaison des vitesses de fermentation obtenues en batch avec celles obtenues en réacteur à lit fluidisé recirculé après correction en température .....	105
Tableau 31 : Données initiales du montage expérimental lit fixe vertical .....	108
Tableau 32 : Paramètres descriptifs de la colonne à lit fixe horizontal continu.....	114
Tableau 33 : Données initiales du montage expérimental lit fixe vertical .....	114
Tableau 34 : Comparaison des vitesses de consommation des sucres en essai batch et au démarrage du continu en réacteur lit fixe horizontal à 50,4 g.L <sup>-1</sup> de billes de <i>S.cerevisiae</i> et 56,7 g.L <sup>-1</sup> de billes de <i>Sch.pombe</i> .....	116
Tableau 35 : Comparaison des vitesses de dégradation de l'acide malique en essai batch et au démarrage du continu en réacteur lit fixe horizontal à 50,4 g.L <sup>-1</sup> de billes de <i>S.cerevisiae</i> et 56,7 g.L <sup>-1</sup> de billes de <i>Sch.pombe</i> .....	117
Tableau 36 : Synthèse des résultats obtenus dans les 3 configurations continues testées à l'échelle laboratoire.....	119
Tableau 37 : Caractéristiques moyennes du jus de fermentation produit à Rabastens sur la campagne 2010.....	123
Tableau 38 : Paramètres prévisionnels du fonctionnement continu du pilote (170 L) .....	125
Tableau 39 : Planning de l'essai pilote sur les vendanges 2010 .....	126

Tableau 40 : Suivi de la phase d'acclimatation des <i>Sch.pombe</i> lors du démarrage de l'essai pilote (150 L).....	127
Tableau 41 : Suivi de la phase d'acclimatation des <i>S.cerevisiae</i> lors du démarrage de l'essai pilote (170 L).....	128
Tableau 42 : Suivi de la phase batch de l'essai pilote (170 L) réalisés sur 34 g.L <sup>-1</sup> de billes de <i>S.cerevisiae</i> et 42 g.L <sup>-1</sup> de billes de <i>Sch.pombe</i> .....	129
Tableau 43 : Rendements et bilan matière calculés sur l'ensemble de la production pilote (170 L).....	132
Tableau 44 : Profil aromatique des vins produits en continu lors de l'essai pilote (170 L) en 2010.....	135
Tableau 45 : Profil aromatique d'exemples de vins produits à la cave de Rabastens en 2010.....	135
Tableau 46 : Récapitulatif des paramètres moyens de fonctionnement continu obtenus sur la campagne 2010 à l'échelle pilote (170 L).....	136
Tableau 47 : Récapitulatif des caractéristiques moyennes du produit obtenues sur la campagne 2010 à l'échelle pilote (170 L).....	136
Tableau 48 : Expression des vitesses de consommation de sucres en fonction de la concentration en sucres réducteurs pour différentes concentrations en billes de <i>S.cerevisiae</i> obtenues à partir des essais batch.....	142
Tableau 49 : Vitesse de consommation des sucres à 10 g.L <sup>-1</sup> de sucres résiduels pour les différentes concentrations en billes de <i>S.cerevisiae</i> obtenues en batch.....	143
Tableau 50 : Temps de séjour calculés en considérant un fonctionnement en réacteur continu, de type RAC pour les différentes concentrations en billes de <i>S.cerevisiae</i> .....	144
Tableau 51 : Temps de séjour calculés en considérant un fonctionnement en réacteur continu, de type piston pour les différentes concentrations en billes de <i>S.cerevisiae</i> .....	144
Tableau 52 : Synthèse des temps de séjour expérimentaux (batch et continu) et théoriques (réacteur continu fonctionnant suivant les modèles RAC et piston) obtenus pour différentes concentrations en billes de <i>S.cerevisiae</i> .....	145
Tableau 53 : Paramètres caractéristiques du réacteur utilisé pour l'évaluation de la distribution de temps de séjour en laboratoire (10 L).....	146
Tableau 54 : Données initiales du montage expérimental lit fixe vertical.....	146
Tableau 55 : Comparaison du temps de séjour moyen calculé avec la distribution des temps de séjour et du temps de séjour réel obtenu en réacteur laboratoire (10 L).....	149
Tableau 56 : Coefficient de dispersion et nombre de Peclet calculés en considérant un modèle hydrodynamique du réacteur laboratoire (10 L) de type piston dispersé.....	150
Tableau 57 : Nombre N de RAC en série calculé d'après la distribution de temps de séjour obtenue en réacteur laboratoire (10 L).....	151
Tableau 58 : Valeurs des concentrations en sucres calculées en sortie de réacteur en fonction de la répartition des volumes de deux RAC en série.....	154

Tableau 59 : Coûts en billes et volumes utiles calculés suivant les modèles RAC et piston en fonction des concentrations en billes de <i>S.cerevisiae</i> et <i>Sch.pombe</i> .....	160
Tableau 60 : Coûts en billes et volumes utiles calculés en fonction des concentrations en billes de <i>S.cerevisiae</i> et <i>Sch.pombe</i> en configuration bi-étagée suivant le modèle RAC .....	162
Tableau 61 : Coûts en billes en €/hL calculés en fonction des concentrations en billes de <i>S.cerevisiae</i> et <i>Sch.pombe</i> en configuration bi-étagée suivant le modèle RAC .....	163
Tableau 62 : Volumes utiles en hL calculés en fonction des concentrations en billes de <i>S.cerevisiae</i> et <i>Sch.pombe</i> en configuration bi-étagée suivant le modèle RAC .....	163
Tableau 63 : Coûts en billes en €/hL calculés en fonction des concentrations en billes de <i>S.cerevisiae</i> et <i>Sch.pombe</i> en configuration bi-étagée suivant le modèle piston .....	164
Tableau 64 : Volumes utiles en hL calculés en fonction des concentrations en billes de <i>S.cerevisiae</i> et <i>Sch.pombe</i> en configuration bi-étagée suivant le modèle piston .....	164
Tableau 65 : Temps de séjour attendus en fonctionnement type RAC et type piston, en fonction des concentrations en billes de <i>S.cerevisiae</i> et <i>Sch.pombe</i> .....	165
Tableau 66 : Résultats des expériences à l'échelle laboratoire pour un fonctionnement en continu en réacteur mono-étagé à différentes concentrations en billes de <i>S.cerevisiae</i> et <i>Sch.pombe</i> .....	165
Tableau 67 : Suite des résultats des expériences à l'échelle laboratoire pour un fonctionnement en continu en réacteur mono-étagé à différentes concentrations en billes de <i>S.cerevisiae</i> et <i>Sch.pombe</i> .....	165
Tableau 68 : Paramètres descriptifs des deux colonnes utilisées dans le montage laboratoire bi-étagé .....	166
Tableau 69 : Volumes et débits d'alimentation calculés suivant les modèles RAC et piston, pour un fonctionnement bi-étagé à 39,5-39,5 et 9,1-9,1 g.L <sup>-1</sup> de <i>S.cerevisiae</i> / <i>Sch.pombe</i> dans les 1 <sup>e</sup> et 2 <sup>e</sup> étages respectivement .....	167
Tableau 70 : Volumes et débits d'alimentation calculés suivant les modèles RAC et piston, pour un fonctionnement bi-étagé à 9,1-18,2 et 9,1-0 g.L <sup>-1</sup> de <i>S.cerevisiae</i> / <i>Sch.pombe</i> dans les 1 <sup>e</sup> et 2 <sup>e</sup> étages respectivement .....	169
Tableau 71 : Caractéristiques moyennes du jus de fermentation produit à Rabastens en 2011 .....	173
Tableau 72 : Paramètres prévisionnels du fonctionnement continu du réacteur industriel (120 hL) .....	176
Tableau 73 : Caractéristiques du vin obtenu en fin de phase batch à l'échelle industrielle (120 hL) réalisés sur 39,5 g.L <sup>-1</sup> de billes de <i>S.cerevisiae</i> et 39,5 g.L <sup>-1</sup> de billes de <i>Sch.pombe</i> .....	179
Tableau 74 : Paramètres moyens obtenus lors du fonctionnement continu pour l'essai industriel (120 hL, 2011) et l'essai pilote (170 L, 2010) .....	180
Tableau 75 : Rendements et bilan matière calculés sur l'ensemble de la production à l'échelle industrielle (120 hL) .....	182

Tableau 76 : Récapitulatif des paramètres moyens de fonctionnement obtenus sur les campagnes 2011 (120 hL) et 2010 (170 L) .....	185
Tableau 77 : Récapitulatif des caractéristiques moyennes du produit obtenues sur les campagnes 2011 (120 hL) et 2010 (170 L) .....	186



# **Lexique et abréviations**



AOC : Appellation d'Origine Contrôlée  
CJRR : Concentré de Jus de Raisin Rectifié  
CNRS : Centre National de Recherche Scientifique  
CRAO : Centre de Ressources Analytiques en Œnologie  
CRITT : Centre Régional pour l'Innovation et la Transfert de Technologies  
Da : Dalton  
Acide DNS: Acide DiNitroSalicylique  
ENSIACET : Ecole Nationale Supérieure des Ingénieurs en Arts Chimiques et Technologiques  
FA : Fermentation Alcoolique  
FID : Détecteur à Ionisation de Flamme  
FMA : Fermentation MaloAlcoolique  
FML : Fermentation MaloLactique  
FUI : Fonds Unique Interministériel  
GAP : GlycérAldéhyde-3-Phosphate  
HDMS: HexaMethylDiSilazane  
HPLC : High Performance Liquid Chromatography  
IFV : Institut Français de la Vigne et du Vin  
INPT : Institut National Polytechnique de Toulouse  
INRA : Institut National de Recherche Agronomique  
IRIT : Institut de Recherche en Informatique de Toulouse  
LGC : Laboratoire de Génie Chimique  
MIF : Macération Initiale à Froid  
RAC : Réacteur Agité Continu  
TAV: Titre Alcoométrique Volumique  
UMR : Unité Mixte de Recherche  
UPS : Université Paul Sabatier  
UT1 : Université des Sciences Sociales de Toulouse 1  
VDP : Vin De Pays  
YEPD : Yeast Extract Peptone Dextrose ou dextrose de peptone d'extrait de levure

assemblage : mélange de plusieurs vins provenant de cépages ou de parcelles différents. L'assemblage peut également être constitué de vin de presse et de vin de goutte.

chaptalisation : consiste à rajouter du sucre lors de la fermentation du raisin dans l'objectif de remonter le degré en alcool.

clarification : ensemble d'opérations qui vont permettre d'obtenir un vin plus limpide et plus brillant en éliminant les particules en suspension. Ces opérations comprennent le collage, la filtration ou la centrifugation.

cliquage (ou macro-oxygénation) : procédé œnologique permettant un apport ponctuel et contrôlé d'oxygène à un vin élevé en cuve ou en barrique.

marc : matière solide résiduelle de l'extraction du jus du raisin (pressurage).

remontage : pendant la fermentation, opération qui consiste à ramener le liquide du fond sur le dessus.



# **Introduction**



Depuis plusieurs années maintenant, la viticulture française est en crise. Plusieurs facteurs en sont à l'origine. En premier lieu se trouve l'émergence des marchés des pays dits du nouveau monde. Ces pays commercialisent désormais leurs propres produits, les consomment et gagnent du terrain sur l'exportation. Face à cette concurrence, la dénomination 'vin français' n'a plus autant la cote ; les produits français restent très souvent chers et peu adaptés comparés aux produits concurrents. D'autre part, la consommation du vin dans le monde n'augmente que faiblement voire diminue dans certains pays comme par exemple la France. La répression sur les routes, les campagnes publicitaires contre l'alcool ont eu raison des consommateurs réguliers de vin d'hier pour les transformer aujourd'hui en consommateurs occasionnels. Les consommateurs boivent désormais moins, mais en contre partie, ils boivent mieux. Et par mieux, il faut entendre par plaisir. Les nouvelles générations ne cherchent désormais plus à afficher leur statut social derrière une étiquette mais à découvrir de nouveaux produits qui leurs plairont. Il ne faut donc plus, aujourd'hui, un vin qui plaira à son producteur mais travailler ce produit pour qu'il satisfasse au mieux les attentes des consommateurs. Les profils produits ont donc changé ; les vins doivent désormais être plus typés fruits mûrs, avec une certaine sucrosité et une complexité relativement faible. Un autre point important à prendre en compte est la notion de qualité, qualité du produit à un instant t mais également qualité du produit malgré les millésimes.

C'est pour satisfaire ces nouveaux objectifs que depuis ces dernières années, nous assistons à un important développement des nouvelles technologies pour l'œnologie. L'apparition notamment de nouveaux outils de traitement thermique permettant l'extraction optimale de la couleur et des polyphénols par des procédés continus, contribue fortement à l'obtention de vin standardisé malgré l'effet millésime. La mise en œuvre de fermentations continues permettrait également une meilleure maîtrise et une homogénéisation de la qualité organoleptique des produits. De plus, cette étape serait en cohérence avec les étapes d'extraction amonts.

Au niveau industriel, la difficulté de maîtrise et les risques d'un passage en fonctionnement continu n'encourage pas sa mise en œuvre. Cependant, avec l'apparition sur le marché des levures immobilisées, la fermentation continue peut être un réel progrès technique et économique. En plus d'une réduction attendue des temps de fermentation, le fonctionnement continu permettrait de supprimer tous les temps morts de production (temps de cuvage, décuvage, nettoyage), ce qui contribuerait également à l'augmentation de la productivité.

L'utilisation des levures immobilisées, qui ont fait leur apparition il y a plus d'une vingtaine d'années, conduit à de nombreux avantages en comparaison avec l'utilisation des levures dites 'libres'. Parmi ceux-ci, nous retrouvons notamment, l'augmentation de la productivité, la facilité de séparation des microorganismes du produit d'intérêt, la limitation des contaminations ainsi que la facilitation d'une mise en œuvre continue de la production.

De nombreuses études ont été publiées que cela soit sur les techniques d'immobilisation ou sur les supports utilisés. Cependant, à l'heure actuelle, une seule industrie produit des levures

immobilisées: la société portugaise Proenol Lda. Cette société commercialise des levures immobilisées dans une matrice d'alginate de calcium, en réponse à certains problèmes œnologiques spécifiques. Par exemple, le ProRestart est une levure *Saccharomyces cerevisiae* immobilisée dans de l'alginate de calcium utilisée pour le redémarrage des fermentations alcooliques arrêtées. Ou encore, le ProMalic, levure *Schizosaccharomyces pombe* immobilisée dans de l'alginate de calcium, est utilisé pour la dégradation de l'acide malique dans certains moûts avant fermentation. Ces produits œnologiques font, bien évidemment, l'objet d'une autorisation réglementée dans le domaine. Et il est important de noter qu'il ne présente également aucun risque de dénaturation du produit sur lequel il est utilisé (vin ou moût).

L'objectif de notre travail a donc été de concevoir et dimensionner un réacteur industriel permettant la vinification continue du jus (vinification phase liquide) en utilisant des levures immobilisées disponibles sur le marché.

Dans un premier temps, nous nous sommes donc attachés à l'étude du comportement des levures immobilisées afin d'évaluer au mieux leurs performances par rapport aux levures libres. Nous avons notamment cherché à définir les concentrations optimales pour une mise en œuvre continue. Puis dans un second temps, nous avons testé plusieurs configurations de réacteur afin de déterminer la plus appropriée pour la production continue de vin. Enfin, une fois cette configuration optimale définie, des essais sur site industriel ont été réalisés afin de valider à l'échelle pilote puis industrielle, le procédé développé en laboratoire.

En parallèle, un travail de modélisation du réacteur a été réalisé ce qui nous aura permis d'améliorer encore le procédé.

Finalement, une rapide comparaison des schémas de vinification 'classique' et 'continu' a été faite et a permis de conclure sur les perspectives d'industrialisation de la vinification continue.

**Partie I :**  
**Contexte de l'étude VINNEO**



## **I. Les enjeux d'une 'nouvelle révolution vitivinicole'**

### **I.1 Les conclusions du rapport Pomel (2006)**

La viticulture française connaît depuis 2001 une crise profonde. 'Cette crise sonne la fin d'une période, une autre doit s'ouvrir, qui fasse délibérément entrer la viticulture française dans l'ère de la mondialisation des productions et des marchés, des modes de transformation et de commercialisation, des goûts et des attentes des consommateurs de la planète. Sans qu'elle y perde son âme, sans qu'elle renonce à l'excellence de ses produits et sans qu'elle renie ses terroirs, la France doit s'engager dans une nouvelle ère. La viticulture française doit jouer toutes ses cartes et combler ses handicaps'. (Propos issus du rapport Pomel, 2006)

Les principaux points remis en cause dans ce rapport sont :

- une production atomisée,
- des pratiques œnologiques traditionnelles et une avancée technologique inégale,
- une offre excédentaire, incohérente et peu lisible, résultat d'un manque flagrant de culture marketing au sein de la filière.

Tout ceci contribue fortement à la perte de compétitivité de la filière française sur le marché mondial. Il est donc nécessaire pour la viticulture française de se remettre en question, tant vis à vis des nouvelles attentes du marché que vis à vis de ses pratiques œnologiques.

### **I.2 La réalité du marché en France et à l'étranger**

Depuis vingt ans, la consommation de vin en France ne cesse de diminuer. Au contraire, au niveau mondial, la consommation de vin continue de croître de près de 1 % par an, avec des hausses à deux chiffres sur l'Asie principalement.

Sur le plan international, en 2008, la France leader à l'export en termes de valeur, s'est vue reléguée au 3<sup>e</sup> rang en volume exporté, derrière l'Espagne et l'Italie (Le Nouvel Observateur, 2009). La concurrence des pays de l'Europe du Sud et celle des pays dits du Nouveau Monde (Californie, Australie, Afrique du Sud, Chili, Chine) progresse à l'aune de leurs consommations mais aussi de leurs capacités à pénétrer les marchés avec des vins plus adaptés. La viticulture française perd donc des parts de marché au niveau mondial en présentant une offre inadaptée, trop complexe et peu lisible pour le consommateur. Par conséquent, l'accent doit être mis sur l'adaptation de l'offre à la demande : le meilleur produit n'étant pas celui qui plaît au producteur mais celui qui satisfait le plus les consommateurs.

## II. La stratégie de 'conquête des marchés' de VINOVALIE

C'est dans ce contexte qu'en 2001, la cave 'Les Vignerons de Rabastens' et trois autres coopératives du Sud-Ouest (Côte d'Olt, Técou et Fronton), ont initié une démarche 'marketing'. L'objectif était de mieux cerner les caractères distinctifs de leurs produits en comparaison des vins dits 'champions' de l'offre mondiale. Les résultats de cette analyse comparative sont présentés dans le Tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1 : Analyse comparative des caractères distinctifs entre les vins 'champions' et les produits Vinovallie

Composantes profils sensoriels	Vins 'à succès'	Vins coopérative Sud-Ouest
Couleur	Interne soutenue	Assez légère
Intensité olfactive	Importante	Moyenne
Type olfactif	Fruit mûr	Fruit frais végétal
Volume en bouche	Important, vin gras	Assez faible
Complexité	Moyenne à faible	Moyenne
Type dominant	Fruit mûr, sucrosité importante	Végétal et fruit frais, sucrosité faible

Grâce à cette analyse, les quatre coopératives ont pris conscience des écarts existants, des actions à mettre en place et surtout de la nécessité de coordonner leurs efforts. C'est donc ainsi que le regroupement à l'origine de Vinovallie a eu lieu et qu'une stratégie de développement a été mise en place:

- se regrouper pour atteindre une taille critique plus crédible et mutualiser l'organisation ;
- mettre en application les règles du marketing et de la communication dans les méthodes de commercialisation et de distribution ;
- moderniser les méthodes de production.

Dans sa démarche de positionnement, Vinovallie a lancé en France et dans plusieurs pays cibles des marchés tests en proposant des vins de cépage préfigurant les futurs 'Néovins'. Face aux succès de ces produits tests, Vinovallie espère accéder à ces nouveaux marchés et s'y positionner de façon attractive et durable.

En conséquence, il apparaît nécessaire de construire une offre qualitativement et quantitativement adaptée aux besoins du marché. Un travail du profil sensoriel des vins doit être réalisé afin de mettre en valeur les qualités différenciatrices des cépages tout en restant en adéquation avec les attentes du consommateur. Et ces produits doivent pouvoir être renouvelés de manière fiable sur de gros volumes : la fidélisation de la clientèle au niveau mondial implique une maîtrise des caractéristiques organoleptiques des vins dans le temps à travers les millésimes successifs.

La stratégie d'industrialisation déjà amorcée par Vinovale en matière de logistique et de distribution, doit donc se poursuivre dans l'itinéraire technique d'élaboration des vins. C'est autour de ce défi d'industrialisation que le projet VINNEO prend tout son sens, avec la prise de conscience que les itinéraires techniques traditionnels et les outils actuels ne suffiront pas à concevoir des vins compatibles avec les goûts et exigences de la nouvelle consommation mondiale.

### III. Le projet VINNEO

#### III.1 Présentation générale du projet



Le projet 'VINNEO : Du consommateur à la vigne' (Figure 1) a pour objectif la mise au point de technologies favorisant l'automatisation de la sélection de la matière première et l'industrialisation des procédés d'élaboration des vins de cépages du Sud-Ouest. Il s'inscrit dans la stratégie des agro chaînes par une démarche initiale innovante dans la filière vitivinicole : analyser les évolutions des goûts et habitudes de consommation à l'échelle mondiale pour mieux adapter les profils sensoriels des vins en faisant appel à des techniques d'élaboration innovantes.

Figure 1 : Logo du projet VINNEO

##### III.1.1 Les financeurs du projet

Le financement de ce projet vient principalement de fonds interministériels FUI complétés par l'Union Européenne, OSEO, les Régions Midi-Pyrénées et Languedoc-Roussillon, et le Conseil Général du Tarn (Figure 2).

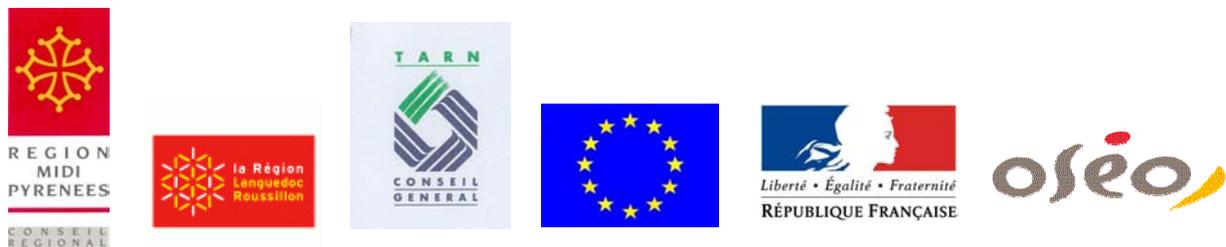


Figure 2 : Financeurs du projet VINNEO

### III.1.2 Labellisation

Le projet VINNEO est doublement labellisé par les pôles de compétitivité de la région Midi-Pyrénées (Agrimip) et région Languedoc-Roussillon (Quali-Mediterranée) (Figure 3).



Figure 3 : Pôles de compétitivité ayant labélisés le projet VINNEO

### III.1.3 Les partenaires

De nombreux partenaires, entreprises et centres de recherches, sont mobilisés autour du projet VINNEO (Figure 4).

- Vinalie, chef de file :

Créée en 2006, Vinalie est l'union de quatre coopératives :

- la Cave Côtes d'Olt pour le Cahors,
- les Caves de Técou et Rabastens pour le Gaillac,
- la Cave de Fronton pour le Fronton.

Ce regroupement a été initié sous l'impulsion de Jacques Tranier (ancien directeur général de la cave de Rabastens et de la structure interprofessionnelle régionale, le Comité Interprofessionnel des Vins du Sud-Ouest) afin de pouvoir s'ouvrir des accès au marché mondial et rester compétitif face aux nouveaux producteurs.

Dans la filière Sud-Ouest 'rouge', Vinalie est devenu le plus gros metteur en marché, avec 30 M€ de chiffre d'affaires avec la commercialisation de trois AOC des Vins du Sud-Ouest (Cahors, Fronton, Gaillac) et trois Vins de Pays (Comté Tolosan, Côtes du Tarn, Lot). Côté chiffres, Vinalie c'est 240 000 hL produit, 546 viticulteurs exploitant 4 127 ha et 127 salariés.

- L'Institut Français de la Vigne et du vin (IFV)

L'IFV Midi-Pyrénées, localisé à Lisle sur Tarn, est l'outil de recherche et de transfert d'innovations de la filière vitivinicole du Sud-Ouest. Il s'agit d'un des sites les plus modernes pour réaliser des expérimentations à petite échelle en viticulture et œnologie. Il comprend un chai de mini-vinifications (dimensionné pour 500 essais de 30 à 70 kg de raisin), un chai de vinifications de capacité plus importante (cuvier de 30 à 50 hL), un laboratoire de 130 m<sup>2</sup>.

- Société Le Matériel Pera

La société Le Matériel Pera, basée à Florensac, conçoit, fabrique et installe des équipements de caves viticoles. La gamme proposée recouvre les principales étapes de la vinification avec des outils pour la réception et le transport de la vendange, le pressurage et la vinification (outils de traitement thermique et de flash détente). D'autre part, grâce à l'étroite collaboration entre son service conception ingénierie et son service R&D, Pera propose

également une expertise technique forte pour la conception et l'ingénierie de caves, l'objectif étant l'amélioration des techniques de vinification.

- Société Noveltis

Dès sa création en novembre 1998, la société Noveltis s'est positionnée avec comme objectif principal de créer et de fédérer de fortes expertises scientifiques dans le domaine des sciences spatiales de l'environnement et de l'Univers. Le projet proposé permet tout à la fois de conforter son double savoir faire dans le domaine de l'imagerie aérienne et spatiale d'une part et dans l'exploitation des données GPS d'autre part, tout en s'ouvrant plus avant aux applications d'ingénierie avales propres aux mondes viticole et agricole.

- Société Ondalys

La société Ondalys est une société de services spécialisée dans l'analyse de données instrumentales et sensorielles, en particulier de données issues de capteurs optiques (spectromètres et imagerie). Ondalys propose son appui R&D aux industriels soucieux de contrôler leurs produits et leurs procédés par la mise en place de solutions de mesure et d'analyse de données. D'autre part, Ondalys collabore avec de nombreux équipementiers en vue de concevoir des capteurs optiques innovants. Ses domaines d'application sont essentiellement les secteurs agricole et agro-alimentaire, pétrochimique et pharmaceutique.

- Société Nyseos

La société Nyseos, créée en 2001, est une start-up soutenue par l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA) et l'IFV. Spécialiste des arômes des vins et de leurs précurseurs, Nyseos propose aux acteurs de la filière des analyses précises de ces composants qualitatifs qui servent de base à un conseil viticole et œnologique pertinent. Nyseos a développé une gamme de diagnostics qualitatifs précoces de la qualité des vins, applicables dès la vendange, ainsi qu'un panel d'analyses de contrôle sur les principaux composés marqueurs de l'arôme des vins, qu'ils soient qualitatifs ou négatifs (défauts).

- La Société Force A

Spécialiste de la fluorescence des végétaux, l'activité de Force-A consiste à développer, produire et commercialiser des capteurs optiques pour la végétation. Ces capteurs peuvent prendre la forme de pinces à feuille (DUALEX) ou de capteurs à distance (MULTIPLEX), c'est-à-dire sans contact, embarqués ou portables mesurant, entre autres, la teneur en polyphénols des plantes. Ces nouveaux outils de diagnostic et de gestion ont pour intérêt de donner une meilleure connaissance du fonctionnement des plantes en mettant en œuvre leurs propriétés de fluorescence intrinsèque.

- Le laboratoire IRIT

L'IRIT, Institut de Recherche en Informatique de Toulouse, est une Unité Mixte de Recherche, UMR 5505, commune au Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), à l'Institut National Polytechnique de Toulouse (INPT), à l'Université Paul Sabatier (UPS) et à

l'Université des Sciences Sociales Toulouse 1 (UT1). L'IRIT est organisé autour de 7 thèmes, auxquels sont rattachées 19 équipes. L'équipe VORTEX impliquée dans le projet VINNEO est une équipe pluridisciplinaire du thème imagerie & signal. Elle regroupe 'autour de la thématique des objets visuels' des chercheurs en imagerie qui s'intéressent à leur analyse, à leur composition et à leur usage avec notamment un intérêt pour la reconstruction 3D d'objets naturels rigides ou non-rigides.

- Le CRAO – CRITT Génie des Procédés et Technologies Environnementales

Le Centre de Ressources Analytiques en Œnologie (CRAO), est un centre de proximité au service de la profession viticole. Sa principale mission est de mettre au point des méthodes d'analyses physico-chimiques capables de repérer, identifier et quantifier le potentiel aromatique des cépages du Midi-Pyrénées. Cette cellule analytique relève des activités du CRITT (Centre Régional pour l'Innovation et la Transfert de Technologies) Génie des Procédés et Technologies Environnementales.

- Le Laboratoire de Génie Chimique (LGC)

Le laboratoire de Génie Chimique est une unité mixte de recherche (UMR 5503) commune au CNRS, à l'INPT et à l'UPS. Ses activités sont découpées suivant 5 thématiques, selon 5 départements. Le département BioSyM (Bioprocédés et Systèmes Microbiens) est composé d'une quinzaine de chercheurs et d'enseignants-chercheurs, spécialistes du Génie Chimique ou de la Microbiologie, alliant leurs compétences pour s'intéresser à la mise en œuvre des microorganismes dans des procédés industriels.

Le laboratoire possède une longue expérience des fermentations œnologiques. Le savoir-faire repose sur l'optimisation des conduites de fermentation et sur la conception de bioréacteurs spécifiques. De plus, le laboratoire a développé, en partenariat industriel, une technologie d'immobilisation de microorganismes compatible avec leur utilisation dans les bioprocédés.

- Le Laboratoire d'Agrophysiologie (LAP) de l'Ecole d'Ingénieurs (EI) Purpan

Le LAP fédère trois équipes de recherche autour d'une thématique commune qui concerne l'évaluation de la qualité des matières premières et produits alimentaires. Il dispose notamment de compétences spécifiques d'analyse des macromolécules (polymères protéiques, polymères glucidiques). L'apport de cette technique aux tanins du vin permettrait sans doute une meilleure compréhension de la formation des divers complexes formés à partir de ces composés et qui déterminent bon nombre de paramètres qualitatifs.



Figure 4 : Partenaires du projet VINNEO

### III.2 Présentation technique du projet

Le projet VINNEO est divisé en 4 phases de travail (Figure 5).

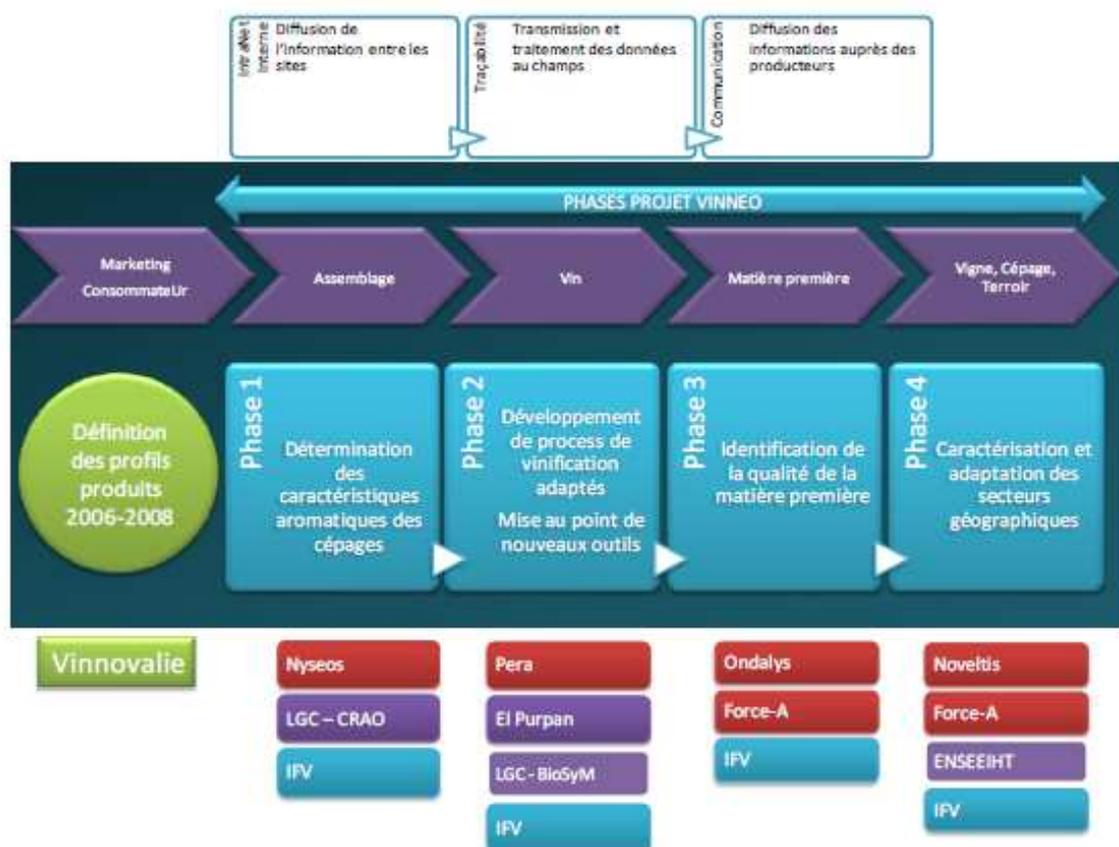


Figure 5 : Schéma organisationnel du projet VINNEO

- Phase 1 : Détermination des caractéristiques aromatiques des cépages

L'objectif premier de la phase 1 est de rechercher la typicité aromatique des NEOVINS par l'identification et la quantification des molécules influant clairement sur le bouquet aromatique. Il s'agit de comprendre et de maîtriser les marqueurs principaux des arômes, les phénomènes de variabilité observés et la nature de leurs précurseurs.

En parallèle, la mise au point de dosages rapides permettant d'assurer le suivi de ces différents composés aromatiques, en complément d'indicateurs analytiques classiques (degré, acidité, couleur) sera réalisée.

Cette première phase comporte donc logiquement deux axes de travail :

1. Recherche de la palette aromatique des cépages de NEOVINS ;
2. Mise au point de méthodes de dosages rapides à faible coût.

- Phase 2 : Développement de process de vinification adaptés et mise au point de nouveaux outils

L'objectif de cette phase est double :

- aboutir à la définition de procédés de vinification optimum en fonction des caractéristiques de la matière et des profils de produits souhaités.
- adapter les quatre sites de production aux outils et procédés industriels définis pour assurer de façon homogène et régulière la production des NEOVINS

Deux axes de travail ont donc été définis :

1. Optimisation des macérations et du chauffage de la vendange
2. Optimisation de la fermentation

- Phase 3 : Identification de la qualité de la matière première

La phase 3 a pour but de fournir aux quatre sites de VINOVALIE un outil permettant de définir le potentiel qualitatif d'un moût à son arrivée au quai de réception.

Cette phase se décline en quatre axes de travail :

1. Caractérisation du potentiel aromatique de la matière première
2. Modélisation mathématique des spécificités qualitatives aromatiques des NEOVINS
3. Conception d'un outil opérationnel d'aide à la décision pour le vinificateur
4. Test sur sites industriels

- Phase 4 : Caractérisation et adaptation des secteurs géographiques

La phase 4 a pour but de développer et adapter des capteurs de mesures piétons et aériens afin de permettre d'évaluer les potentialités viticoles du parcellaire. Il s'agit de transférer en temps réel les avancées technologiques acquises dans le domaine du traitement de l'image notamment en les adaptant aux besoins de Vinovalie.

Deux axes de travail sont développés:

1. Caractérisation du parcellaire de Vinovalie
2. Caractérisation du raisin

#### IV. La phase 2 T2

Dans le cadre du projet VINNEO, l'enjeu de la tâche 2 de la phase 2 est de mettre au point un déroulement continu de la fermentation alcoolique dans un réacteur parfaitement maîtrisé. Il en découlerait également un gain important en termes de cuverie et d'énergie. Le déroulement en continu de cette étape est en cohérence avec l'étape d'extraction de la couleur et des polyphénols du vin, rendue continue par les outils de chauffage et de traitements thermiques des raisins. De plus, le procédé continu assurerait une qualité plus homogène des vins tout au long de la campagne de vinification. En effet, plutôt que d'avoir une multitude de cuves pouvant dévier au niveau aromatique, toute l'attention serait portée sur un réacteur unique. Pour cela, le projet s'attache à la mise en œuvre de levures de fermentation alcoolique incluses sur les bases d'un procédé mis au point par le LGC : l'immobilisation en billes d'alginate de calcium.

Pour ce faire, le travail a été découpé en plusieurs étapes et réparti entre les différents partenaires, comme présenté dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Planning prévisionnel de la tâche 2, phase 2 du projet VINNEO

Description (objectifs, résultats attendus...)	Partenaires	2009			2010			2011				
		T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	
Acquisition de données cinétiques	LGC		■	■								
Conception et dimensionnement du pilote	PERA, LGC				■	■						
Construction du pilote	PERA				■	■	■					
Essais sur moût stabilisé et sur moût réel	LGC							■	■	■		
Evaluation technico économique - Extrapolation finale	PERA, VINOVALIE										■	■

Ce travail constitue le fil conducteur de la thèse présentée ici.



**Partie II :**  
**Introduction bibliographique**



L'œnologie est l'une des plus anciennes biotechnologies, c'est-à-dire l'utilisation de cellules vivantes pour la transformation d'une production agricole en produit fini, intervenant dans l'alimentation des hommes. Par définition, le vin est le produit obtenu exclusivement par la fermentation alcoolique, totale ou partielle de raisins frais, foulés ou non ou de moûts de raisin (Ribéreau-Gayon, 1991). Mais en fonction de la nature et de l'origine du raisin et des procédés de vinification, les produits sont très différents.

## **I. Les vinifications en rouge**

Le vin rouge est un vin de macération ; la fermentation alcoolique du jus est accompagnée de l'extraction des constituants des parties solides de la grappe (pellicules, pépins, éventuellement rafles). Dans la vinification en rouge la plus classique, cette extraction est réalisée par la macération des parties solides qui intervient pendant la fermentation du jus. Mais d'autres procédures dissociant fermentation et macération sont envisageables ; un exemple en est la vinification avec chauffage de la vendange.

### **I.1. La vinification en rouge 'classique'**

Le schéma classique de la vinification en rouge (Figure 6) comporte les étapes suivantes :

- foulage, égrappage, mise en cuve – cuvaison – fermentation alcoolique principale et macération – écoulage – séparation du vin et du marc par égouttage et pressurage – fermentation d'achèvement, épuisement des derniers grammes de sucres par la fermentation alcoolique et fermentation malolactique.

- L'égrappage-foulage

L'égrappage et le foulage sont les deux premières étapes de la vinification.

L'égrappage (ou éraflage) permettant la séparation des baies de la rafle constitue la première phase. Même si cette étape n'est pas considérée comme indispensable, elle présente des intérêts certains. Le premier avantage consiste en la réduction de près de 30 % du volume de cuverie nécessaire pour la suite des opérations. De plus, les rafles modifient la composition des vins : l'éraflage augmente l'acidité et la teneur en alcool du vin. D'un point de vue organoleptique, les rafles sont également susceptibles d'apporter des goûts végétaux et herbacés désagréables.

Le foulage du raisin, quant à lui, a pour conséquence le dégagement de la pulpe et du jus par rupture de la pellicule de la baie.

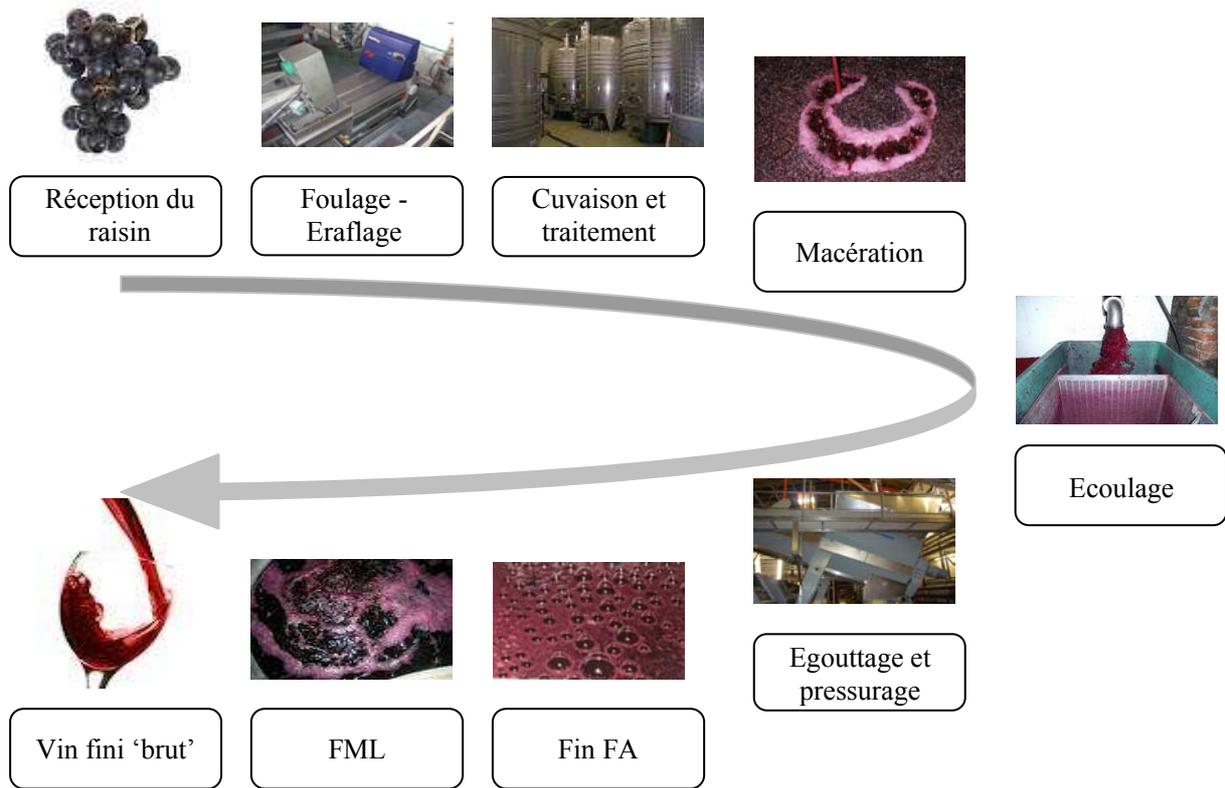


Figure 6 : Schéma de vinification en rouge 'classique'

Ces deux étapes sont de plus en plus souvent assurées par un même matériel : l'éraffloir (Figure 7). Celui-ci est constitué d'un large cylindre perforé (grille). A l'intérieur, un arbre portant des batteurs disposés en spirale, tourne dans le sens identique ou opposé à celui de la grille et les rafles sont projetées contre la paroi perforée. Le jus, les pépins et les pellicules passent à travers la grille tandis que les rafles sont entraînées par les batteurs jusqu'à l'extrémité du cylindre, où elles sont expulsées.

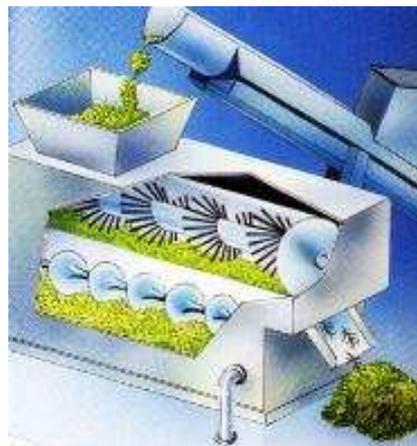


Figure 7 : Illustration d'un éraffloir  
(Source : [www.ac-nancy-metz.fr](http://www.ac-nancy-metz.fr))

- La mise en cuve et les traitements éventuels

La vendange ainsi égrappée et foulée est ensuite reprise par pompage et transférée dans les cuves de fermentation.

A cet instant est souvent réalisé un premier sulfitage équivalent à  $5 \text{ g.hL}^{-1}$  de moût. L'intérêt du sulfitage de la vendange repose sur les actions anti-oxydantes (diminue l'oxydation des composés hydroxylés et carbonylés du moût), anti-oxydasiques (inhibe l'activité d'enzymes oxydatives comme la tyrosinase et la laccase) et dissolvantes (favorise la lyse des cellules du raisin et la libération de leur contenu) du  $\text{SO}_2$ . Il possède également une activité antimicrobienne.

Différentes opérations peuvent également être réalisées au moment de ce transfert et dans les quelques heures qui suivent :

- inoculation soit avec un moût en fermentation soit avec de la levure sèche active commerciale ;
- correction d'acidité et / ou chaptalisation ;
- supplémentation en azote dans le moût carencé ;
- apport de tanins permettant non seulement d'augmenter le corps et la structure tannique du vin mais également de stabiliser la couleur ;
- utilisation d'enzymes pectolytiques favorisant l'extraction des composés phénoliques.

- La conduite de la fermentation alcoolique

La fermentation alcoolique se traduit par une transformation des sucres présents dans le moût (glucose et fructose) en éthanol et en dioxyde de carbone. Plusieurs facteurs vont influencer son bon déroulement, notamment la composition du moût en azote, la température et l'aération du moût.

#### Composition du moût en azote

Les composés azotés sont essentiels pour la croissance et le métabolisme de la levure. Dans le moût, la fraction azotée se décline en plusieurs constituants: ion ammonium, acides aminés, peptides et protéines. Les niveaux de concentration de ces divers constituants sont largement influencés par le cépage, les conditions culturales et climatiques.

La teneur en azote assimilable (somme de l'azote ammoniacal et de l'azote aminé) donne une indication sur la fermentescibilité des moûts et sur les ajouts éventuels nécessaires pour un bon déroulement de la fermentation. En dessous de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ , la teneur en azote assimilable est considérée comme limite et une complémentation sera réalisée afin d'atteindre  $140\text{-}150 \text{ mg.L}^{-1}$ .

#### Température

Pour un bon déroulement de la fermentation alcoolique, un contrôle de la température et la réfrigération sont essentiels. Si une température initiale moyenne (autour de  $20^\circ\text{C}$ ) est nécessaire pour avoir un bon départ en fermentation, il ne faut pas non plus qu'elle soit trop

élevée, les levures en phase de croissance et en présence d'éthanol étant particulièrement sensibles à la chaleur.

Bien évidemment, la température de fermentation aura également un impact sur le vin produit. Dans le cas de vin de garde destiné à un long vieillissement, une extraction poussée est attendue ; la température de fermentation sera plutôt élevée. Au contraire, dans le cas des vins primeurs destinés à une consommation rapide, la recherche du caractère fruité du raisin orientera vers une fermentation à plus basse température (20-25°C) pour un métabolisme des levures différent.

#### Aération du moût

Les levures en phase de croissance ont besoin d'oxygène. Afin de prévenir une limitation en oxygène et donc des difficultés de fermentation, il est nécessaire de procéder au bon moment à une introduction d'oxygène dans le moût. Celle-ci est généralement réalisée assez tôt, au début de l'activité fermentaire, par remontage ou par cliquage d'oxygène. L'opération de remontage, en plus de permettre l'introduction d'oxygène dans le moût, a également d'autres effets :

- homogénéisation de la cuve (température, sucres, population levurienne) ;
- extraction des constituants du marc (anthocyanes et tanins).

#### Suivi et fin de fermentation

Au cours de la fermentation, les deux paramètres principaux suivis sont la température et la densité du moût. La densité permet de suivre l'évolution de la consommation des sucres.

En plus de ces deux paramètres, il peut également être intéressant de suivre l'acidité volatile, témoin d'une activité bactérienne non désirée.

Pour l'appréciation exacte de la fin de fermentation, la mesure de densité ne suffit pas. En effet, même si celle-ci est stable, les concentrations en sucres résiduels peuvent rester élevées. Il est donc nécessaire de procéder à un dosage chimique des sucres. De nombreuses méthodes sont disponibles ; certaines permettent le dosage de l'ensemble des sucres réducteurs alors que d'autres ne doseront que le glucose et le fructose résiduels. Habituellement, une fermentation sera considérée comme étant finie lorsque la concentration en sucres réducteurs sera inférieure à 2 g.L<sup>-1</sup>.

- La macération

La macération, c'est-à-dire le contact prolongé du jus et du marc, n'est pas une étape délimitée dans le schéma de vinification. En effet, elle débute dès l'étape de foulage et se poursuit tout au long de la fermentation. C'est une étape de la vinification importante puisqu'elle permet l'extraction de la couleur et des tanins contenus dans le marc ; les vins obtenus seront ainsi plus ou moins colorés et puissants.

Une macération initiale à froid (MIF) peut précéder la fermentation alcoolique. Dans ce cas, le violent choc thermique engendré par le refroidissement rapide de la vendange par injection de CO<sub>2</sub> liquide (de 20-25°C à 12°C et même jusqu'à 5°C) favorise l'éclatement des cellules de la pellicule du raisin et l'extraction des composés colorants et aromatiques.

- L'écoulage

Une fois la fermentation - macération terminée, le décuvage, aussi appelé écoulage, a lieu. Cette étape consiste à transférer le vin, appelé vin de goutte, dans une nouvelle cuve en le séparant du marc. Ce dernier est pressé pour donner les vins de presse, plus riches en extraits divers, notamment en matière colorante. Vins de goutte et vins de presse pourront éventuellement être assemblés en fonction des besoins.

Au cours de cette étape, il est courant d'effectuer un sulfitage pour limiter les contaminations microbiennes.

- La conduite de la fermentation malolactique

La fermentation malolactique est dans l'état actuel des connaissances, une étape indispensable et systématique de la vinification de tous les vins rouges. Sous l'action de certaines bactéries, elle va conduire à la transformation de l'acide malique en acide lactique ce qui conférera au produit fini une stabilité biologique et un profil organoleptique intéressants. Le plus souvent, elle intervient de façon spontanée dans un délai raisonnable. Si ce n'est pas le cas, un ensemencement par ajout de vin en cours de fermentation malolactique ou un ensemencement par utilisation de biomasse industrielle sont deux solutions envisageables.

De même que pour la fermentation alcoolique, plusieurs facteurs influenceront son déroulement : acidité, température et sulfitage (Wibowo et al. 1985). Les métabolites levuriens peuvent également être des facteurs inhibiteurs.

Acidité :

La fermentation malolactique est d'autant plus rapide que le pH du milieu est élevé ; à partir d'un pH de 3,3 et au-delà, la fermentation devient plus facile.

Température :

La température optimale se trouve entre 20 et 25°C. A 15°C, la fermentation est lente alors qu'elle se déroule en quelques jours à 20°C.

Sulfitage :

Les bactéries sont bien plus sensibles au dioxyde de soufre que les levures. Par conséquent, l'éventuel sulfitage à l'écoulage devra être évité ou tout du moins contrôlé pour permettre cette 2<sup>e</sup> fermentation.

## **I.2. L'élaboration des vins thermovinifiés**

Les constituants du raisin qui jouent un rôle majeur dans l'expression qualitative des vins sont essentiellement contenus dans la pellicule de la baie de raisin. Une forte proportion des composés d'arômes et des précurseurs aromatiques se trouvent dans les tissus pelliculaires. Dès le début de son développement, l'apport du chauffage de la vendange a été de séparer la phase d'extraction pelliculaire de la phase de fermentation finalement réalisée en phase liquide.

### I.2.1. Les apports du chauffage de la vendange

Le chauffage de la vendange favorise la diffusion des composés phénoliques des pellicules permettant ainsi d'obtenir des moûts plus colorés. Ce phénomène, bien que connu depuis longtemps, s'est vu remis au goût du jour avec notamment le développement des techniques industrielles de chauffage. Les possibilités techniques sont multiples :

- chauffage direct des raisins entiers par aspersion de vapeur d'eau ;
- chauffage direct dans un échangeur tubulaire alimenté par de la vapeur d'eau ou mieux de l'eau chaude,
- chauffage par immersion des parties solides dans du moût chauffé après sa séparation (Figure 8).

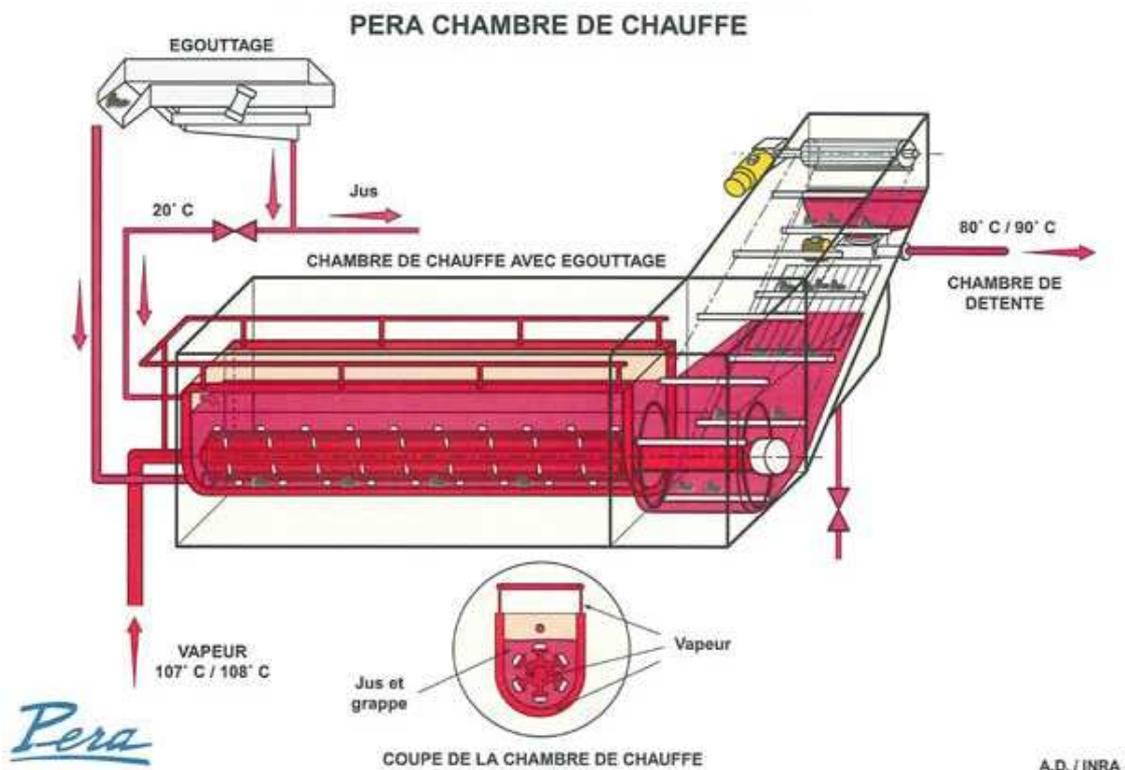


Figure 8 : Exemple d'une chambre de chauffe utilisée pour le thermotraitement des raisins (Source : [www.vignevin-sudouest.com](http://www.vignevin-sudouest.com))

Ainsi, les résultats obtenus avec chauffage (Benard et al. 1980) ont montré une extraction équivalente au niveau des tanins, une amélioration des intensités colorantes et des teneurs en anthocyanes en comparaison à une vinification classique sur marc. Néanmoins, en cours de la conservation des vins, une perte sensible de ces dernières a également été notée. Les vins obtenus après chauffage de la vendange doivent donc correspondre à un cycle court de commercialisation.

Parallèlement au gain observé pour les polyphénols et anthocyanes, une évolution des caractéristiques organoleptiques des vins thermovinifiés a été mise en évidence. En effet, la clarification avant vinification des moûts de vendanges thermotraitées, permet d'obtenir des vins plus fruités et marqués en arômes fermentaires les premiers mois suivant leur production.

Bien évidemment, le chauffage du raisin n'est pas sans conséquence. L'une d'elles, indésirable, est la destruction plus ou moins totale des enzymes pectolytiques naturellement présentes ce qui augmente les difficultés de clarification. Cependant, des préparations commerciales ont permis de pallier ce phénomène.

Au contraire, un effet positif est la destruction des oxydases présentes offrant ainsi une protection du moût contre les oxydations.

D'autre part, la mise en place de ces procédés de chauffage a permis une réduction importante des besoins en cuverie de fermentation par l'élimination immédiate de toute la masse solide (Desseigne et al. 1998 ; Boulet et al. 1998). Avec cela, nous retrouvons également une diminution des besoins en main d'œuvre et surtout la possibilité d'automatiser la chaîne de vinification.

### I.2.2 Schéma de vinification des vins thermovinifiés

Comme dans le cas d'une vinification en phase solide, le schéma de vinification des vins thermovinifiés (Figure 9) commence par une étape d'éraflage et de foulage de la vendange. Celle-ci est ensuite portée à 70-75°C. S'ensuit une phase de macération à chaud d'une durée de 20 à 40 minutes (Benard et al. 1980). Le raisin est ensuite pressé. Jus de goutte et de presse sont rassemblés avant d'être clarifiés. Le moût chaud ainsi obtenu est ensuite refroidi dans un échangeur tubulaire. Le refroidissement du moût avant fermentation à une température de 20°C est important afin d'éviter les risques de formation excessive d'acidité volatile et d'arômes fermentaires de type esters par la levure. Ont ainsi lieu la fermentation alcoolique suivie ensuite de la fermentation malolactique tout comme dans le schéma classique.

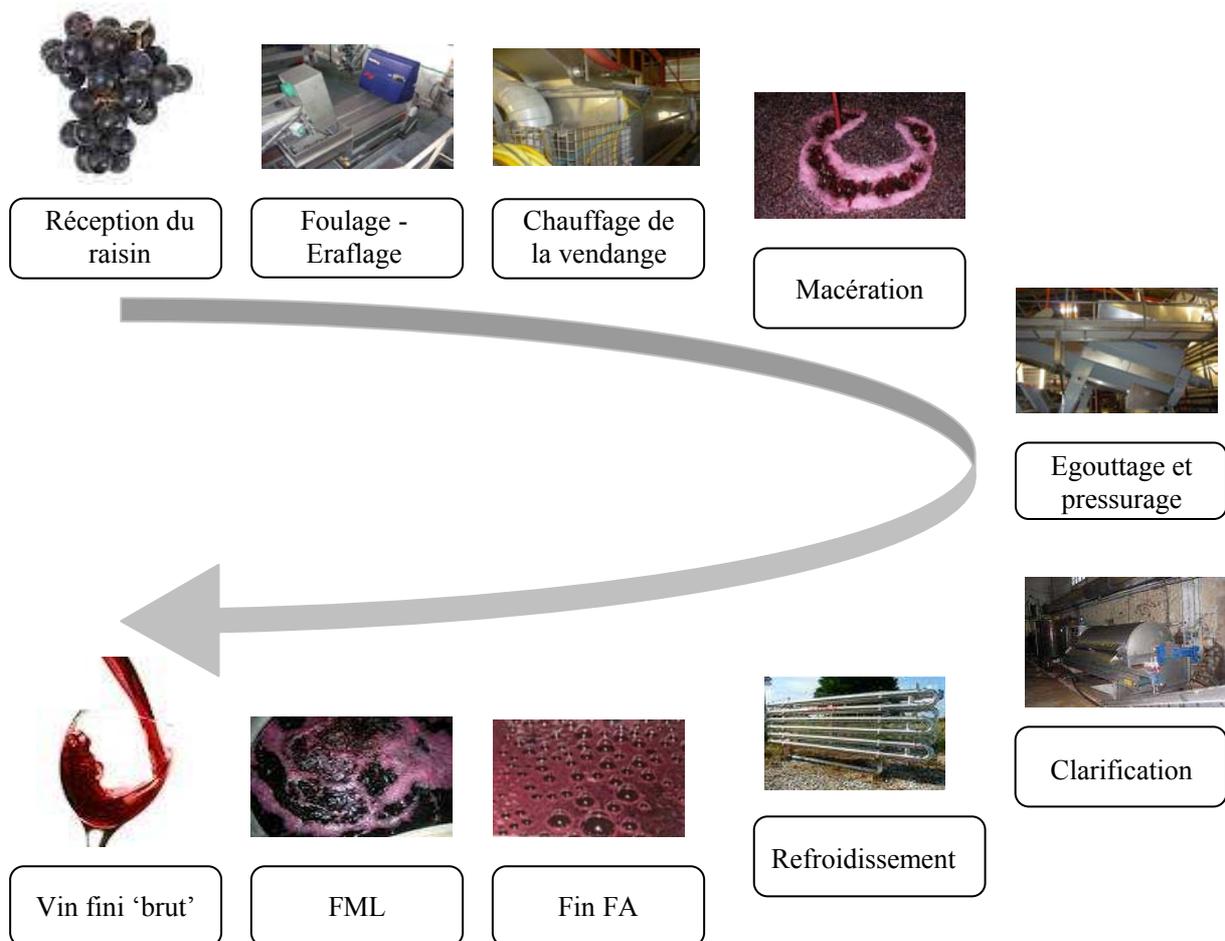


Figure 9 : Schéma de vinification des vins thermotraités

## II. Focus sur les étapes de fermentations

### II.1. Fermentation alcoolique

La fermentation alcoolique est la transformation biologique des sucres du raisin (principalement glucose et fructose) en éthanol et dioxyde de carbone. Cette production d'alcool s'accompagne de la formation de produits secondaires tels que le glycérol, l'acide acétique, l'acide lactique, les alcools supérieurs, les esters etc... (Swiegers et al. 2005).

La fermentation alcoolique est généralement conduite par des levures du genre *Saccharomyces cerevisiae* (Figure 10). Bien que celles-ci soient faiblement présentes sur les raisins (2 à 3 %), elles deviennent majoritaires dès le début de la fermentation et constituent dès lors l'agent principal de la fermentation alcoolique (Poulard et al.1985).



Figure 10: Photo de la levure *S.cerevisiae*  
(Source : [www.lallemand.com](http://www.lallemand.com))

### II.1.1 Le métabolisme de *S.cerevisiae*

Au cours de la fermentation alcoolique, les 200 g.L<sup>-1</sup> (en moyenne) de sucres contenus dans le moût sont transformés en alcool par une série de réactions complexes. La glycolyse en est le point de départ. Cette voie, commune à la fermentation et la respiration permet la conversion du glucose en acide pyruvique.

En condition de fermentation, l'acide pyruvique est décarboxylé en acétaldéhyde qui est lui-même réduit en éthanol :  $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CO_2 + 2CH_3CH_2OH$ .

Dans le cas de la respiration, l'acide pyruvique entre dans le cycle de Krebs pour être oxydé en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O:  $C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O$ .

#### A. La fermentation alcoolique

Cette voie métabolique est composée de la glycolyse, de la décarboxylation puis de la réduction de l'acide pyruvique (Figure 11 et Figure 12).

Lors de la glycolyse, la molécule de glucose commence par être scindée en deux molécules de trioses phosphate (Glycéraldéhyde-3-phosphate, GAP). Cette première étape, consommatrice d'énergie, fait intervenir deux réactions de phosphorylation et une réaction d'isomérisation. Par la suite, la molécule de triose phosphate est transformée en pyruvate permettant la récupération d'énergie sous forme d'ATP par la formation de molécules de NADH,H<sup>+</sup>.

Le pyruvate subit ensuite une décarboxylation conduisant à l'acétaldéhyde qui sera lui-même réduit en éthanol. Dans le même temps, nous observons la régénération du transporteur ; le NADH,H<sup>+</sup> reprend sa forme oxydée NAD<sup>+</sup>.

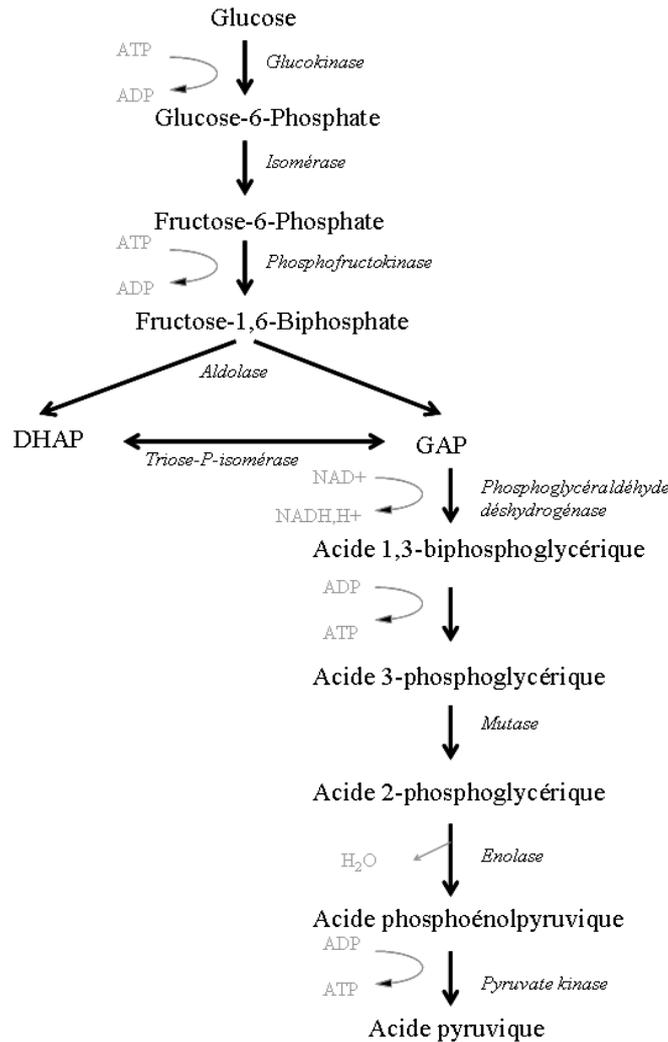


Figure 11 : Voie métabolique de la glycolyse



Figure 12 : Voie de production d'éthanol

Cependant, en début de réaction, l'acétylaldéhyde n'existant pas, un autre accepteur d'électrons intervient : la dihydroxyacétone phosphate, isomère du GAP. La réduction de cette cétone conduit au glycérol (Figure 13). Le GAP peut alors être oxydé et conduire à l'acide pyruvique puis à l'acétylaldéhyde et enfin à l'éthanol. Nous avons donc ici, deux accepteurs d'électrons possibles. Mais l'acétylaldéhyde ayant une meilleure affinité pour le transporteur commun, le flux vers la production d'éthanol sera plus important. De plus à une certaine concentration en éthanol, une rétro-inhibition se met en place au niveau de l'enzyme de réduction de la dihydroxyacétone, ralentissant puis bloquant la synthèse du glycérol. La synthèse d'éthanol, quant à elle, se poursuit jusqu'à ce que le niveau atteint, élevé, induise un effet de rétro-inhibition sur les transporteurs du glucose et du fructose ainsi que sur l'hexokinase assurant la

phosphorylation du glucose. Ainsi s'arrête la fermentation pouvant laisser des sucres non assimilés dans le milieu. Les niveaux d'alcool auxquels se produit cette rétro-inhibition sont variables en fonction de la souche et des conditions du milieu. De façon générale, un ralentissement de la synthèse de glycérol est noté autour de 4 à 5 % (v/v) d'éthanol et une inhibition totale de la consommation des sucres a généralement lieu autour de 13 à 14 % (v/v).

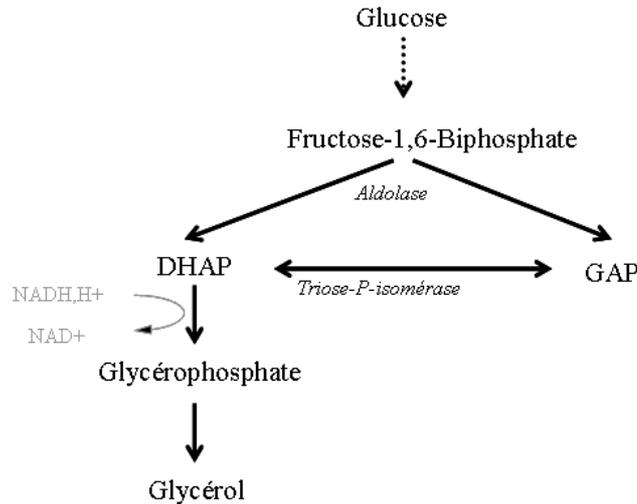


Figure 13 : Voie de formation du glycérol

### B. La respiration

Dans la voie respiratoire, le glucose suit la même voie de la glycolyse décrite ci-avant. Mais l'acide pyruvique est décarboxylé donnant un reste acétyl qui se combine avec le coenzyme A et suit ensuite les réactions du cycle de Krebs aussi appelé cycle de l'acide citrique (Figure 14). Alors que la glycolyse a lieu dans le cytoplasme, cette deuxième phase de la respiration est quant à elle située dans les mitochondries.

Le cycle de Krebs consiste en une succession de réactions d'oxydation et de décarboxylation. L'énergie produite au cours du cycle est libérée lors de la réoxydation des coenzymes réduits au niveau de la chaîne respiratoire. En plus d'une fonction énergétique, le cycle de Krebs fournit également les molécules nécessaires aux réactions de biosynthèse des acides aminés et lipides.

Il est à noter qu'en condition d'anaérobiose, le cycle de Krebs s'interrompt au niveau du succinate, les réactions de biosynthèse ne sont donc a priori pas interrompues.

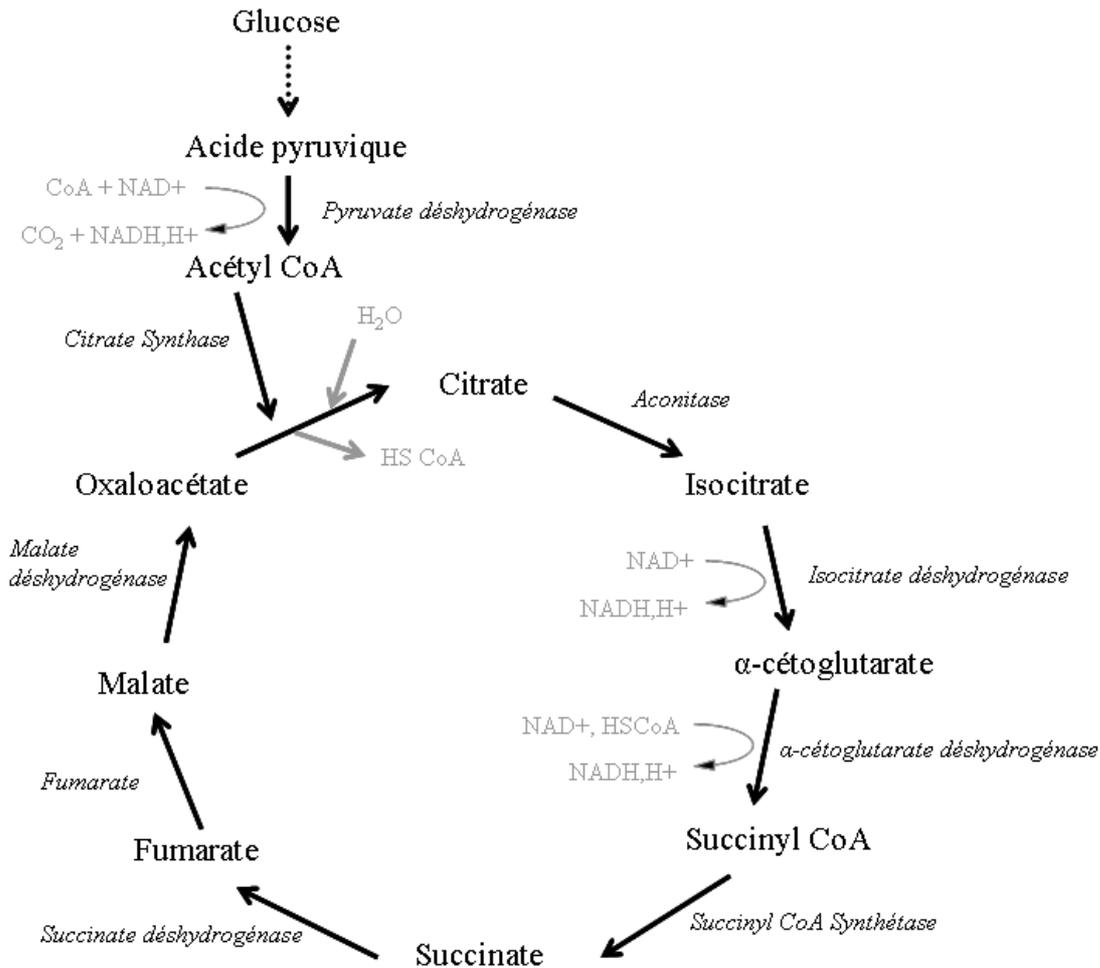


Figure 14 : Cycle de Krebs

### C. Les mécanismes de régulation

L'activation des voies métaboliques de la levure dépend des mécanismes génétiques de la cellule et de certains facteurs externes tels que le pH, la température, la présence de composés inhibiteurs et la concentration en substrat.

Notamment, la modulation de la transition respiro-fermentaire s'explique par la réponse de la cellule aux concentrations en sucres et en oxygène : c'est l'effet Crabtree et l'effet Pasteur.

L'effet Crabtree traduit le mécanisme de répression catabolique de la chaîne respiratoire par le glucose. *Saccharomyces cerevisiae* est Crabtree positive, c'est-à-dire qu'à forte concentration en sucres et malgré la présence d'oxygène, elle synthétise de l'éthanol.

L'effet Pasteur, quant à lui, traduit le basculement de la fermentation à la respiration sous l'action de l'oxygène.

Le Tableau 3 montre les effets conjugués du sucre et de l'oxygène sur la régulation métabolique:

Tableau 3 : Effets conjugués du sucre et de l'oxygène sur la régulation métabolique de la levure *S.cerevisiae* (Strehaiano, 1984)

Conditions	Glucose 0-0,1 g.L <sup>-1</sup>	Glucose 0,1-150 g.L <sup>-1</sup>	Glucose > 150 g.L <sup>-1</sup>
+ oxygène	Métabolisme respiratoire / effet Pasteur	Métabolisme fermentaire activé	Inhibition par le substrat des voies respiratoires et fermentaires
- oxygène	Métabolisme fermentaire	Métabolisme fermentaire ralenti	

#### D. Formation des produits secondaires

L'éthanol et le glycérol ne sont pas les seuls produits de la fermentation. Des molécules intermédiaires peuvent en partie être excrétées ou reprises dans le métabolisme.

L'acide pyruvique est l'un de ces intermédiaires à l'origine de divers composés (Figure 15). Ainsi la réduction de la fonction cétone peut conduire à la formation de l'acide lactique, isomère D pour les levures. De même, une synthèse de butanediol peut avoir lieu à partir de deux molécules de pyruvate.

Par les réactions du cycle de Krebs, de l'acide malique, fumarique, succinique et propionique sont formés. Enfin, une partie de l'acide pyruvique est décarboxylé en reste acyl, qui sera en partie repris dans le cycle de Krebs, en partie dirigé vers la synthèse d'acides gras et des lipides, et pourra également être en partie excrété, à l'origine de l'acidité volatile.

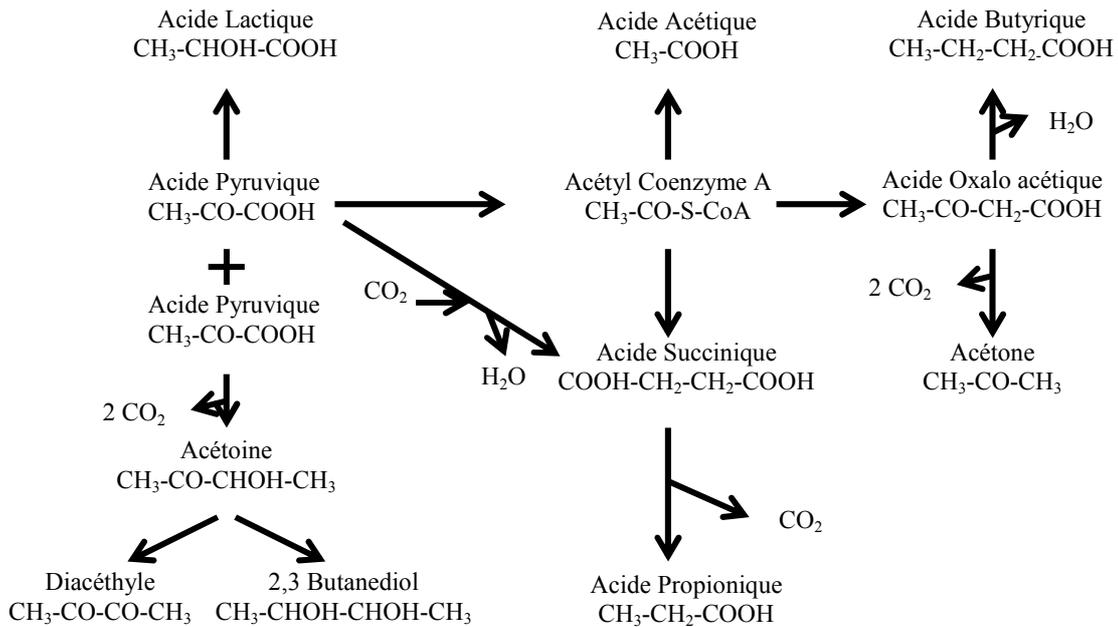


Figure 15 : Devenirs possibles de l'acide pyruvique (d'après Ribéreau-Gayon et al. 1975)

En conditions usuelles de fermentation alcoolique pour la vinification, les produits formés sont pour 200 g.L<sup>-1</sup> de sucres :

- l'éthanol à 93 g.L<sup>-1</sup> ;
- le dioxyde de carbone en quantités sensiblement identiques à l'éthanol ;
- le glycérol à environ 10 % de l'éthanol formé, c'est-à-dire 9 g.L<sup>-1</sup> ;
- les acides lactiques et acétiques, < 1 g.L<sup>-1</sup> ;
- l'acide succinique et autres produits mentionnés ci-avant pour moins de 0,1 g.L<sup>-1</sup>.

Une partie du carbone sert également à la synthèse de biomasse.

Le rendement théorique maximal en éthanol, de 0,51 g<sub>Ethanol</sub>.g<sub>Sucre</sub><sup>-1</sup> se voit donc en réalité réduit à environ 0,47- 0,48 g<sub>Ethanol</sub>.g<sub>Sucre</sub><sup>-1</sup> du fait de la synthèse de biomasse et de métabolites secondaires. Le rendement en biomasse quant à lui varie de 0,05 à 0,1 g<sub>Biomasse</sub>.g<sub>Sucre</sub><sup>-1</sup> (Lonvaud et al. 2010).

### II.1.2 Les arômes fermentaires du vin (Swiegers et al. 2005 ; Ugliano et Henschke 2009)

Au cours de la fermentation alcoolique du moût, les levures génèrent une grande variété de métabolites volatils qui contribuent au profil sensoriel du vin. Ces composés incluent des esters, des alcools supérieurs, des acides gras volatils, des carbonyles, et des composés soufrés volatils. L'accumulation de ces composés dans le vin dépendra bien évidemment de la souche de levure, de la composition du moût ainsi que des conditions de fermentation.

#### A. Les esters

La production d'esters par la levure peut avoir un effet significatif sur le caractère fruité du vin. Les esters les plus importants sont l'acétate d'éthyle (fruité, solvant), l'acétate d'isoamyle

(banane, poire), l'acétate d'isobutyle (banane), le caproate d'éthyle (pomme) et l'acétate de 2-phényléthyle (miel, fruité, fleur).

### *B. Les alcools supérieurs*

Les alcools supérieurs ou alcools de fusel forment le groupe de composés volatils produits par la levure le plus important d'un point de vue quantitatif. Leur impact sur la qualité aromatique du vin peut être soit positif soit négatif.

Ils sont classés en deux catégories ; les alcools aliphatiques et les alcools aromatiques. Le groupe des alcools aliphatiques inclut le propanol, l'alcool isoamylique, l'alcool amylique et l'isobutanol. Et les alcools aromatiques comprennent l'alcool de 2-phényléthyle et le tyrosol. Selon la littérature, une concentration en dessous de 300 mg.L<sup>-1</sup> ajouterait une complexité souhaitable alors qu'au-delà de 400 mg.L<sup>-1</sup>, leur effet serait négatif.

### *C. Les acides volatils*

L'acidité volatile regroupe des acides organiques volatils à courtes chaînes carbonées (< C6 linéaires). Elle est généralement comprise entre 0,5 et 1 g.L<sup>-1</sup>. L'acide acétique (vinaigre) représente près de 90 % de ces acides. Le reste, principalement les acides propionique et hexanoïque, résultent du métabolisme des acides gras de la levure.

### *D. Les carbonyles*

Les levures produisent plusieurs composés carbonylés : aldéhydes, cétones et céto-acides. Parmi eux, l'acétaldéhyde est le composé majoritairement produit (de 10 mg.L<sup>-1</sup> à 75 mg.L<sup>-1</sup>). Dans les vins rouges, il contribue à la complexité aromatique à condition de ne pas dépasser la limite des 100 mg.L<sup>-1</sup>.

D'un point de vue sensoriel, les aldéhydes apportent des notes de pomme pourrie et de noisette, mais peuvent également être le signe d'oxydation.

### *E. Les composés soufrés volatils*

Les composés soufrés volatils apparaissent dans le vin à très faibles concentrations (du ng.L<sup>-1</sup> au µg.L<sup>-1</sup>) et ont des seuils de détection très faibles. En fonction de leur structure chimique, ces composés peuvent se classer en 5 catégories : les sulfites, les polysulfites, les composés hétérocycliques, les thioesters et les thiols.

Le développement de ces composés par la levure inclut la dégradation d'acides aminés soufrés, la dégradation de pesticides à base de soufre et la libération et / ou le métabolisme de précurseurs soufrés du raisin.

Leur impact sur la qualité sensorielle du vin est généralement négatif (chou, œuf pourri, soufre, ail, oignon, caoutchouc), mais certains composés peuvent avoir un effet positif (framboise, fruit de la passion, raisin).

A titre informatif, le Tableau 4 donne une synthèse des principaux composés d'arômes retrouvés dans le vin, leur descripteur, leur concentration dans le vin et leur seuil de détection.

Tableau 4 : Principaux composés aromatiques du vin (d'après Swiegers et al. 2005)

Composé	Concentration dans le vin en mg.L <sup>-1</sup>	Limite de détection aromatique en mg.L <sup>-1</sup>	Descripteur aromatique
Acétate d'éthyle	22,5 – 63,5	7,5*	Vernis, Fruité
Acétate d'isoamyl	0,1 – 3,4	0,03*	Banane, Poire
Acétate de 2-phényléthyle	0 – 18,5	0,25*	Fleur, Rose, Fruité
Acétate d'isobutyle	0,01 – 1,6	1,6****	Banane, Fruité
Acétate d'hexyle	0 – 4,8	0,7**	Sucré, Parfum
Butyrate d'éthyle		0,5*****	Banane, Fraise
Butanoate d'éthyle	0,01 – 1,8	0,02*	Fleur, fruité
Hexanoate d'éthyle	0,03 – 3,4	0,05*	Pomme verte
Octanoate d'éthyle	0,05 – 3,8	0,02*	Savon doux
Decanoate d'éthyle	0 – 2,1	0,2*****	Fleur, savon
Propanol	9,0 – 68	500**	Acre, Râpeux
Butanol	0,5 – 8,5	150*	Fusel, Spiritueux
Isobutanol	9,0 – 174	40*	Fusel, Spiritueux
Alcool amylique	6,0 – 490	30*	Après, Vernis
Hexanol	0,3 – 12,0	4**	Herbe
Alcool de 2-phényléthyle	4,0 – 197	10*	Fleur, Rose
Acide acétique	100 – 1150	280*	Vinaigre
Acéthaldéhyde	10 – 75	100**	Cerise, Noisette, Pomme pourrie
Diacétyle	< 5	0,2** / 2,8***	Beurré

\* 10 % (v/v) éthanol ; \*\* vin ; \*\*\* vin rouge ; \*\*\*\* bière ; \*\*\*\*\* vin synthétique ; \*\*\*\*\* eau

## II.2. Dégradation de l'acide malique

Les vins obtenus en fin de fermentation présentent des concentrations en acide malique importantes. Cet acide est considéré comme microbiologiquement instable puisqu'il peut être utilisé par certains microorganismes. De plus, il est très souvent à l'origine d'une acidité importante du vin, qu'il est nécessaire de réduire. L'acide malique doit donc être éliminé. Cette dégradation peut se faire suivant deux voies distinctes : la fermentation malolactique et la fermentation maloalcoolique, même si cette dernière reste très peu utilisée.

### II.2.1. La fermentation malolactique

La fermentation malolactique (FML), transformation de l'acide-L-malique en acide L-lactique, est réalisée par les bactéries lactiques du vin, principalement du genre *Oenococcus Oeni* (Figure 16). Elle présente plusieurs avantages :

- apporter une certaine stabilité microbiologique ;
- diminuer l'acidité afin de produire un vin plus souple et moins agressif ;
- améliorer le caractère organoleptique par formation de certaines molécules aromatiques (lactate d'éthyle, diacétyl, acétoïne, 2,3-butanediol).

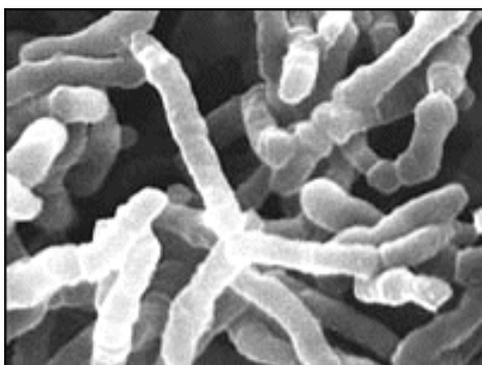


Figure 16 : Photo de la bactérie *O.Oeni*  
(Source : [www.lallemandwine.us](http://www.lallemandwine.us))

La fermentation malolactique consiste en la décarboxylation de l'acide L-malique en acide L-lactique et dioxyde de carbone, grâce à l'enzyme malolactique présente dans les bactéries lactiques. Cette enzyme se compose de deux sous-unités protéiques identiques et exige la présence du cofacteur  $\text{NAD}^+$  et d'ions manganèse  $\text{Mg}^{2+}$  pour être active (Figure 17) (Strasser de Saad, 1983). Elle est plus ou moins inhibée par les autres acides carboxyliques présents dans le vin (acide lactique, tartrique, citrique, succinique) et présente un pH optimum de fonctionnement de 5,75. Par conséquent, pour qu'ait bien lieu la fermentation malolactique, les bactéries lactiques doivent être intactes. En effet, le pH du vin étant bien inférieur au pH optimum de l'enzyme, la cellule doit être en mesure de garantir le maintien du pH compatible avec l'activité enzymatique. Et elle doit également être capable d'excréter toutes les substances inhibitrices.



Figure 17 : Dégradation de l'acide malique par *O.Oeni*



montré que le métabolisme de l'acide malique n'était ni lié à la croissance de la levure, ni à la présence de sucres dans le milieu (Taillandier et al.1988).

Malgré l'intérêt d'utiliser une levure plutôt qu'une bactérie pour dégrader l'acide malique, la fermentation maloalcoolique reste à ce jour très peu appliquée. En effet, nombre d'avis divergent quant aux caractères apportés par *Sch.pombe*. La dégradation de l'acide malique par transformation maloalcoolique n'a pas la même incidence sur le profil organoleptique qu'une fermentation malolactique. En effet, l'acide malique est dégradé sans remplacement par une autre molécule acide ; ceci provoque donc une désacidification. D'autre part, la levure *Sch.pombe* ne produit pas les mêmes molécules aromatiques que les bactéries lactiques ; les vins présentent des profils organoleptiques moins complexes (Lonvaud et al. 2010), ce qui la rend peut-être moins intéressante.

### **III. Les microorganismes immobilisés en œnologie**

Bien que dans le domaine de l'œnologie, la fermentation en cellules libres soit largement prédominante, nous assistons, depuis un peu plus d'une vingtaine d'années, au développement de microorganismes immobilisés pour des applications dans le domaine.

Le terme d'immobilisation a été défini par Karel et al. en 1985 comme 'le confinement ou localisation physique de cellules intactes dans une certaine région de l'espace tout en préservant certaines activités catalytiques souhaitées'. L'immobilisation permet donc de disposer d'une population microbienne dense, active et facilement utilisable.

Les intérêts de développer de tels systèmes sont multiples. Parmi eux, nous retrouvons notamment une réponse aux problématiques industrielles habituelles que sont entre autres les gains de productivité, la facilité d'opération, le recyclage de la biomasse. Un autre avantage recherché est aussi la possibilité de contrôler directement les réactions mises en jeu, comme nous le verrons par la suite.

#### **III.1. Les différentes méthodes d'immobilisation**

De nombreuses techniques d'immobilisation ont été développées. Suivant la plupart des auteurs (Karel et al. 1985 ; Willaert et Baron 1996 ; Kourkoutas et al. 2004 ; Verbelen et al. 2006), elles sont regroupées en 4 catégories : l'attachement à une surface, l'inclusion, la floculation, et le maintien derrière une barrière (Figure 20 ; Figure 21).

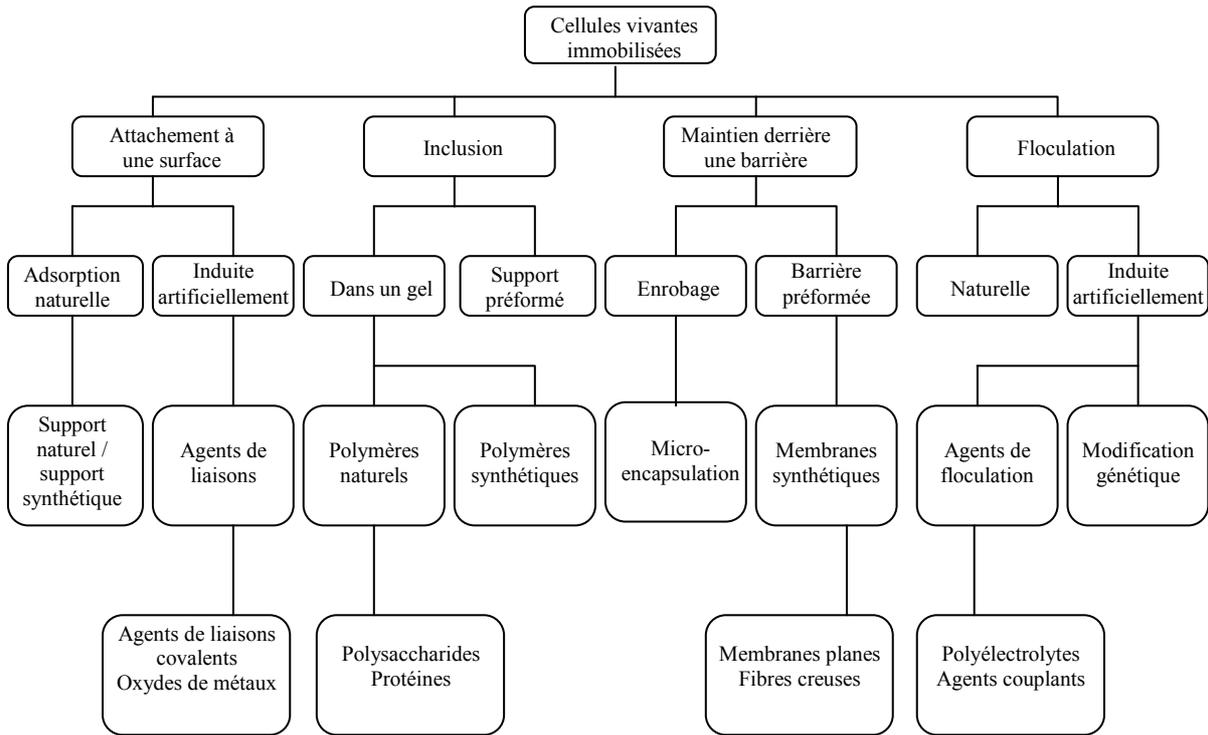


Figure 20 : Classification des systèmes d'immobilisation, d'après Willaert et Baron (1996).

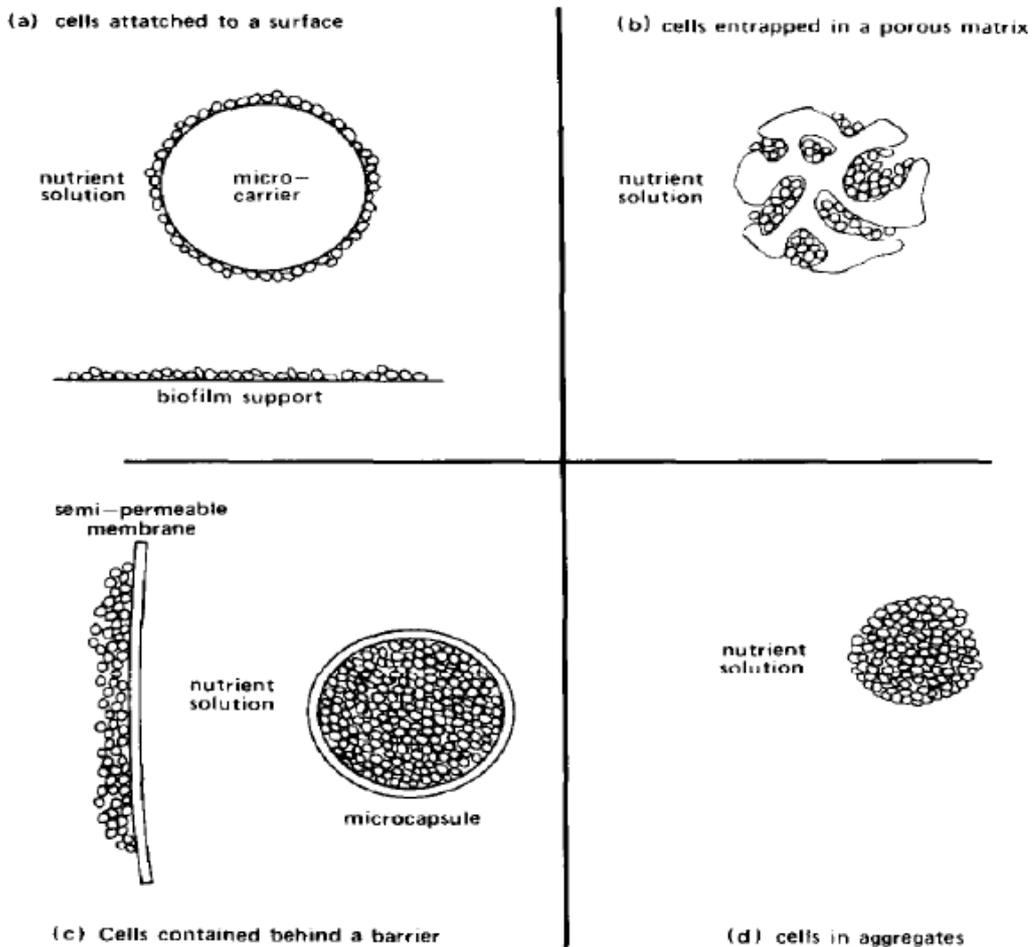


Figure 21 : Les quatre classes de cellules immobilisées (Karel et al. 1985).

### III.1.1 L'attachement à une surface

L'attachement à une surface peut se faire suivant deux phénomènes : l'adsorption ou l'utilisation de liaisons covalentes.

Les systèmes dans lesquels les cellules sont immobilisées par adsorption sont courants du fait de la simplicité de cette technique. Elle résulte d'une attraction électrostatique entre le support et la membrane cellulaire, chargée négativement (Kolot, 1980). La force d'attachement des cellules sur le support est variable et dépend non seulement du microorganisme mais également du support utilisé. Les supports peuvent être des matériaux de nature très diverse : bois, PVC, brique, silice, bentonite, fragments végétaux... (Strehaiano et al. 2006). L'adsorption est un phénomène réversible, fonction de l'âge des cellules, de la composition de la membrane cellulaire, du pH et de la composition ionique du milieu. Un processus de désorption peut donc avoir lieu lors de variations des conditions du milieu. Bien que ce phénomène puisse être compensé par une croissance des microorganismes immobilisés sur le support, ce risque de désorption existant constitue un inconvénient majeur de cette technique. La deuxième méthode d'attachement existante utilise les liaisons covalentes qui peuvent s'établir entre les cellules et le support par l'intermédiaire d'un agent de liaison. Cette technique a été développée pour supprimer le phénomène de désorption décrit ci-dessus. Ainsi, l'immobilisation est irréversible et le biocatalyseur présente une grande stabilité. Le glutaraldéhyde constitue l'agent de liaison le plus utilisé pour l'établissement de liaisons covalentes avec divers supports et convient particulièrement pour les supports de nature protéique. Cependant, les réactifs utilisés sont souvent toxiques pour les microorganismes et peuvent induire une perte de viabilité ou d'activité importante. C'est pourquoi, cette technique n'est plus utilisée pour l'immobilisation de microorganismes mais pour l'immobilisation d'enzymes (Strehaiano et al. 2006).

### III.1.2 L'inclusion

Suivant cette technique, qui est la plus commune, les cellules sont incorporées dans une matrice de polymère plus ou moins rigide. Ces polymères sont soit de nature synthétique comme le polyacrylamide ou le cellophane, soit de nature protéique comme la gélatine et le collagène, soit de nature polysaccharidique comme la cellulose, l'alginate, l'agar ou encore le  $\kappa$ -carraghénane. L'inclusion est une technique en deux étapes, dispersion (par extrusion) / durcissement (par refroidissement ou addition d'agent d'interactions comme les ions calcium ou potassium), facile à mettre en œuvre. Elle conduit le plus souvent à des produits de 1 à 5 mm de diamètre, d'une grande stabilité mais présentant une résistance mécanique relativement faible ce qui peut être considéré comme un inconvénient. D'autre part, la matrice polymérique peut être un facteur limitant la diffusion des solutés et / ou gaz nécessaires au microorganisme (Hannoun et Stephanopoulos 1986). Il est généralement admis que pour les produits de faible poids moléculaire inférieur à 5000 Da, la diffusion n'est pas limitée.

### III.1.3. La floculation

Il est aussi possible d'augmenter la concentration cellulaire en utilisant le phénomène naturel de floculation. Cette technique est basée sur la capacité naturelle des microorganismes à adhérer entre eux. Mais il est également possible d'ajouter des agents de floculation afin de favoriser l'agrégation des microorganismes qui ne floculeraient pas spontanément. Les phénomènes mis en jeu dans la floculation sont des liaisons hydrogènes, des forces de Van Der Waals ainsi que des forces de dispersion. Selon Phillips et Poon (1988), il s'agit d'un phénomène analogue à celui de l'adsorption, donc réversible et dépendant fortement des conditions physico-chimiques en présence.

### III.1.4. Le maintien derrière une barrière

L'immobilisation des cellules par maintien derrière une barrière peut se faire suivant trois procédés. Dans le premier cas, les cellules sont immobilisées au sein d'une barrière préformée telle que les fibres creuses. Dans le deuxième cas, l'immobilisation se fait par formation d'une barrière autour des microorganismes, comme par exemple la technique de microencapsulation. Enfin, la troisième et dernière méthode consiste à utiliser une membrane semi perméable compartimentant les microorganismes en croissance.

Ce type d'immobilisation s'est révélé idéal pour les systèmes où des produits de haute masse moléculaire devaient être séparés de l'effluent. Cependant, le transfert de masse et le possible encrassement de la barrière, causés par la croissance des cellules, sont autant de problèmes limitant cette technique (Lebeau et al. 1998).

Les méthodes existantes pour immobiliser les microorganismes sont donc nombreuses. Le choix de la méthode est largement gouverné par la nature du microorganisme et l'application auquel il est destiné. Bucke (1986) a ainsi établi une liste de critères à prendre en compte pour le développement d'une méthode acceptable à l'échelle industrielle : l'immobilisation doit être sans danger, simple, stable sur le temps de conservation, être porteuse d'un gain d'activité, et surtout peu coûteuse.

## III.2. Levures libres versus levures immobilisées

L'immobilisation des cellules peut conduire à une altération de la croissance cellulaire, de la physiologie des levures et de l'activité métabolique. Des études comparant levures libres et levures immobilisées ont montré entre autres des effets sur l'activation du métabolisme, une augmentation du stockage des polysaccharides, des modifications de vitesse de croissances cellulaires, une modification des rendements des produits, une augmentation de la tolérance aux différents stress... (Norton et D'Amore 1994).

Ci-dessous, nous nous intéressons aux principaux effets remarquables sur les levures incluses utilisées pour la fermentation alcoolique.

### III.2.1. Effets sur la croissance et la morphologie

La comparaison des taux de croissance obtenus en levures libres et en levures immobilisées donne des résultats très disparates ; un taux supérieur, constant ou encore inférieur peut être observé suivant les études (Norton et D'Amore 1994 ; Willaert et Baron 1993). Cette variabilité dans les résultats s'explique en partie par les conditions expérimentales qui diffèrent d'un essai à l'autre, notamment la concentration initiale en levure dans la bille. En effet, Ryder et Masschelein (1985) ont montré que le taux de croissance des levures immobilisées a tendance à diminuer lorsque la concentration en levures dans le support est augmentée. Il est donc impossible de conclure sur l'effet de l'immobilisation sur la croissance même s'il existe bien un effet.

Une autre observation, faite par de nombreux auteurs, est la colonisation différentielle des billes d'alginate avec une croissance plus marquée dans les couches externes qu'au centre des billes (Vives et al. 1993 ; Gòdia et al. 1985 and 1987 ; Nagashima et al. 1984 ; Bettmann et Rehm 1984). Par ailleurs, ces mêmes auteurs font également mention d'une production de cellules planctoniques accompagnant la croissance dans les billes.

Enfin, des changements dans la morphologie des levures incluses sont également rapportés. Melzoch et al. (1994) ont notamment observé des différences entre levures libres et levures incluses, dans la forme des cellules. Ces différences ont été attribuées au manque de place disponible dans le support pour une croissance des levures immobilisées.

### III.2.2. Effets sur l'activité métabolique

Une comparaison de l'activité métabolique des levures libres et des levures immobilisées montre chez les levures immobilisées une activation du métabolisme énergétique et une augmentation dans les polysaccharides de stockage (glycogène et tréhalose) et de structure (glucane et mannane) probablement liée à une répression du bourgeonnement des levures immobilisées (Doran et Bailey 1986 ; Galazzo et Bailey 1990 ; Jirků et al. 2000).

Des mesures du pH intracellulaire ont montré un pH intracellulaire légèrement plus faible pour les levures immobilisées résultant d'une plus grande activité enzymatique et donc d'une plus grande productivité (Galazzo et Bailey 1990).

Enfin, une augmentation du rendement en éthanol au détriment du rendement en CO<sub>2</sub> est également mentionnée (Hilge-Rotmann et Rehm 1990).

### III.2.3. Effets sur la tolérance à l'éthanol

Les levures immobilisées sont considérées comme plus tolérantes face à l'éthanol. Deux mécanismes pourraient être à l'origine de ce phénomène : le rôle protecteur de la matrice d'immobilisation ou le changement dans les concentrations en acides gras dans la membrane cellulaire dû à des limitations d'oxygène (Norton et D'Amore 1994).

Norton et al. (1995) observe un effet protecteur de la matrice face à la toxicité de l'éthanol. Il montre d'ailleurs qu'une fois libre dans le milieu (après dissolution des billes) les levures

auparavant immobilisées perdent leur propriété de tolérance face à l'éthanol. Puligundla et al. (2011) suggèrent également un rôle positif de l'immobilisation sur une matrice type gel face à l'effet de l'éthanol. De plus, il a été observé que les supports à base de calcium présentent un effet protecteur plus marqué, très probablement de par l'influence positive des ions calcium sur la tolérance à l'éthanol (Ciesarová et al. 1996; Ciesarová et al. 1998; Nabais et al. 1988). Selon Hilge-Rotmann et Rehm (1990), la plus grande tolérance à l'éthanol des levures immobilisées résulterait d'une modification dans la composition en acides gras dans la membrane cellulaire. En effet, cette étude montre que l'augmentation de la quantité d'acides gras saturés est corrélée à l'augmentation de la tolérance à l'éthanol. Norton et al. (1995), observent également que les levures immobilisées montrent une plus grande proportion d'acides gras saturés par rapport aux levures libres.

#### III.2.4. Effets sur la production d'arôme

Concernant la composition du produit, il est généralement considéré qu'aucune différence n'existe entre le produit obtenu avec des levures libres et celui obtenu en levures immobilisées (Busova et al. 1994). Selon Balli et al. (2003), la quantité de glycérol obtenu en utilisant les levures immobilisées est légèrement supérieure à celle obtenue avec des levures libres. Yajima et Yokotsuka (2001) ont établi que les concentrations en produits indésirables tels que le méthanol, l'acétate d'éthyle et l'acétaldéhyde étaient plus faibles dans le vin produit en levures immobilisées qu'en levures libres. Cette observation a été également faite par Bardi et Koutinas (1994), Mallouchos et al. (2003). Mais Bardi et al. (1997) et Bakoyianis et al. (1993), ont montré au contraire que la production en acétate d'éthyle était plus importante avec des levures immobilisées qu'avec des levures libres et ce pour différents supports.

Il est donc difficile d'établir une conclusion générale puisque les paramètres à l'origine des effets de l'immobilisation sur l'évaluation sensorielle ne sont pas isolés.

### III.3. Mise en œuvre de microorganismes immobilisés

D'une manière générale, pour les fermentations mettant en œuvre des cellules immobilisées, cinq types de bioréacteurs sont utilisés (Figure 22). Le bioréacteur contient alors trois phases : solide (le microorganisme immobilisé), liquide (le milieu de fermentation), gazeuse (gaz soit injecté soit produit). Le choix de la configuration est donc lié à la méthode d'immobilisation, au métabolisme cellulaire et aux transferts de masse et de chaleur nécessaires.

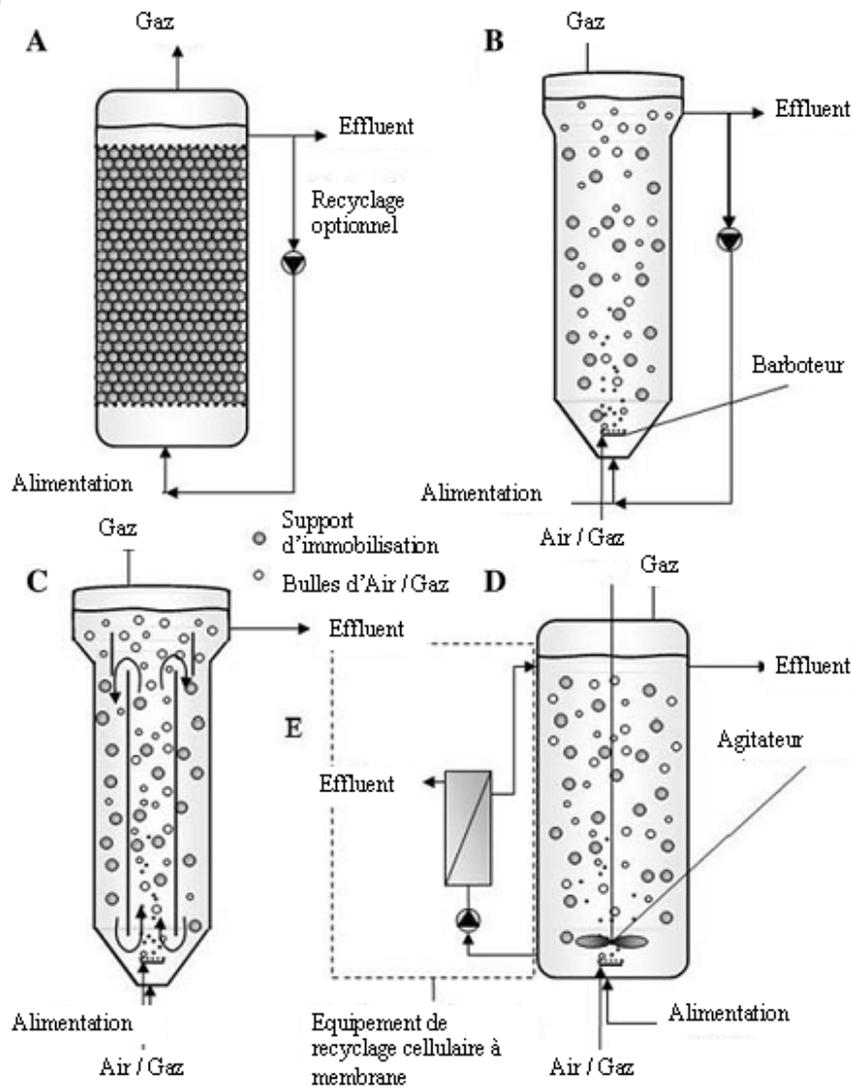


Figure 22 : Cinq réacteurs à cellules immobilisées communs (Verbelen et al. 2006)

- A- Réacteur à lit fixe ;
- B- Réacteur à lit fluidisé ;
- C- Réacteur à Air-lift ;
- D- Colonne à bulles ou réacteur agité ;
- E- Réacteur à recyclage membranaire.

### III.3.1. Lit fixe

Dans la configuration lit fixe, l'ensemble du réacteur est rempli par le biocatalyseur, et le milieu de fermentation passe au travers de ce lit. Ce type de réacteur a un fonctionnement semblable au réacteur de type piston, qui permet de mimer théoriquement les différentes phases de la fermentation en batch. Ses avantages sont sa facilité de mise en œuvre et son faible coût. Cependant, dans la pratique, ce type de fonctionnement n'est pas idéal, du fait de problème d'accumulation de biomasse, d'évacuation des gaz et de limitations de transferts de masse qui peuvent éventuellement être observés (Verbelen et al. 2006).

### III.3.2. Lit fluidisé

Ce réacteur consiste en une colonne dans laquelle les cellules immobilisées sont maintenues en suspension les unes par rapport aux autres grâce à un flux continu et important, de substrat liquide ou de gaz. Ce mode de fonctionnement permet un mélange important des phases liquide / solide et gaz. Avec un fonctionnement de type piston dispersé, la fluidisation permet un meilleur transfert de masse, l'évacuation de cellules en suspension (limitation de l'accumulation de biomasse), ainsi que la libération de grande quantité de CO<sub>2</sub>. Mais la limitation réside dans le fait que pour assurer la fluidisation un débit important de liquide ou gaz est nécessaire. Il s'agit donc d'un procédé intéressant pour des fermentations à vitesse de réaction élevée ou qui nécessitent une forte aération.

### III.3.3. Gaz-lift réacteur

Dans ce type de réacteur, le volume de fluide est divisé en deux compartiments interconnectés. Le liquide de la zone centrale est entraîné par l'injection de gaz qui se dégage en haut de colonne provoquant la descente du liquide dans les zones de côtés. Cela permet un mélange efficace, de bons transferts et un coût de fonctionnement réduit par rapport aux réacteurs agités.

### III.3.4. Réacteurs agités

L'objectif de ces réacteurs est d'augmenter les transferts de masse au moyen d'une agitation forcée. Leur utilisation est simple mais coûteuse. Et des précautions doivent être prises lors de leur utilisation avec des cellules immobilisées puisque l'agitation peut endommager le support.

### III.3.5. Bioréacteur à membrane

Dans ce type de procédé, le module membranaire constitue le mécanisme d'immobilisation du microorganisme. Celui-ci est généralement placé à l'extérieur du réacteur et permet un 'recyclage' de la biomasse. Le bioréacteur à membrane présente un fort intérêt notamment lorsque le produit de fermentation est inhibiteur et peut être séparé du milieu en continu. Néanmoins son coût reste souvent le facteur limitant son installation.

### **III.4. Avantages des levures immobilisées**

L'emploi de levures immobilisées présente théoriquement de nombreux avantages par rapport à l'emploi de levures libres. Dans une revue sur l'immobilisation pour la fabrication de boissons alcoolisées, Kourkoutas et al. (2004) nous fait une liste de tous ces avantages :

- une plus grande concentration cellulaire par unité de volume, qui conduit à une productivité volumétrique plus élevée, des temps de fermentation plus courts et l'élimination des phases de croissance cellulaire non productives ;
- une activité et une stabilité du biocatalyseur prolongées. Le support d'immobilisation pourrait agir comme un agent protecteur face aux effets du pH, de la température, des solvants voire même des métaux lourds ;
- une augmentation de la consommation en substrat et une augmentation des rendements de réaction ;
- une faisabilité d'un procédé continu ;
- une augmentation de la tolérance aux fortes teneurs en substrat et une réduction de l'inhibition par produit ;
- une faisabilité de fermentation à basse température conduisant à une amélioration qualitative du produit ;
- une récupération du produit facilitée et donc une réduction des coûts d'investissement et des coûts énergétiques ;
- une régénération et réutilisation du biocatalyseur pour plusieurs campagnes dans le cas de production en batch ;
- une réduction des risques de contamination microbienne grâce aux hautes densités cellulaires et à la forte activité fermentaire qui en résulte ;
- une possibilité de réduire les volumes de réacteurs, avec des schémas de procédés simplifiés et donc une réduction des coûts d'investissement en cuverie.

### **III.5. Les applications existantes en œnologie**

Dans les applications œnologiques, les microorganismes immobilisés sont utilisés pour répondre à des problématiques spécifiques. Les deux techniques les plus employées sont soit l'immobilisation par inclusion soit par floculation.

Dans notre étude, nous nous intéressons strictement aux microorganismes inclus, nous ne présentons donc pas les applications de la floculation.

En ce qui concerne les microorganismes inclus, trois thématiques principales sont traitées : la prise de mousse lors de l'élaboration de vins effervescents, la désacidification des moûts, et le traitement des arrêts de fermentation.

Pour chacune de ces applications, l'immobilisation, en plus de permettre de résoudre un problème technique, présente des avantages supplémentaires:

- réutilisation du biocatalyseur pour des cycles successifs;
- arrêt de la réaction biologique aisément contrôlé par le retrait du catalyseur;
- séparation des microorganismes du vin facile et rapide.

Pour les trois applications décrites ci-dessous, les microorganismes immobilisés mis en œuvre sont des levures incluses dans une matrice d'alginate. L'alginate de sodium est un polymère d'acides mannuronique et guluronique extrait d'algue marine (Figure 23) et utilisable pour un produit alimentaire. La formation du gel est facile par réticulation des chaînes de polymères par l'intermédiaire d'ions calcium. Il en résulte un réseau tridimensionnel poreux auquel une forme de petites billes est donnée en faisant tomber au goutte à goutte, une solution mélange d'alginate et de microorganismes dans un solution de chlorure de calcium (Figure 24). Les pores du gel ainsi obtenus sont suffisamment grands pour ne pas engendrer de problèmes de diffusion des substrats et produits. Afin d'obtenir une durée de conservation semblable à celle des levures sèches actives, les billes de levures sont également séchées.

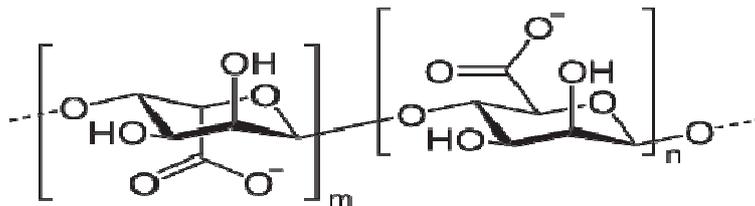


Figure 23 : Structure de l'alginate, polymère d'acides mannuronique et guluronique

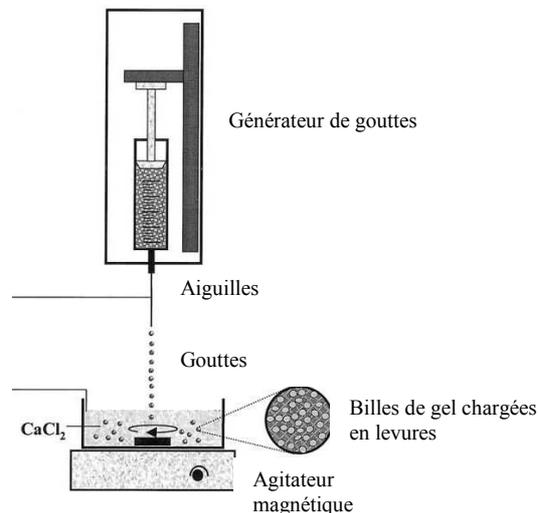


Figure 24 : Schéma de fabrication des levures immobilisées dans de l'alginate de calcium

### III.5.1. La prise de mousse pour l'élaboration des vins effervescents

Dans la méthode traditionnelle d'élaboration des vins effervescents, la deuxième fermentation du vin de base additionné de sucres a lieu en bouteille afin de piéger le gaz produit par les levures. Pour ce faire, les bouteilles remplies de vin de base sont enrichies en sucres et inoculées avec une quantité de levures donnée. Une fois la deuxième fermentation terminée, et un temps de contact de plusieurs mois, la phase de 'remuage' commence. Cette étape a pour objectif de ramener le dépôt de levures au niveau du goulot par rotations et inclinaisons progressives de la bouteille. Le dépôt est ensuite éliminé au cours du 'dégorgement', qui consiste à éliminer le dépôt préalablement congelé par immersion du col de la bouteille dans une saumure à basse température, sous pression du gaz dissous. La remise à niveau est ensuite effectuée avec la liqueur de dosage.

Dans ce schéma traditionnel, l'étape de remuage est une étape dite limitante : elle est longue, coûteuse et requiert un savoir faire spécifique. Parmi les différents systèmes proposés en remplacement de cette étape, se trouve l'utilisation de microorganismes immobilisés. En effet, l'immobilisation des levures permet de récupérer quasi instantanément l'ensemble des levures, par simple retournement de la bouteille (Figure 25). Les levures *S.cerevisiae* incluses dans des billes d'alginate de calcium double couche sont commercialisées sous forme sèche. La deuxième couche d'alginate a été mise en place ici afin de supprimer les risques de croissance cellulaire en dehors de la bille, risque existant dans les systèmes monocouche. Ces levures immobilisées sont ajoutées dans la bouteille lors du tirage à raison de  $1,3 \text{ g.bouteille}^{-1}$  soit  $2.10^6 \text{ cellules.mL}^{-1}$ . Leur emploi en remplacement des levures libres, a montré des cinétiques de prise de mousse semblables, sans différence analytique ou organoleptique sur les vins obtenus. Et la longue étape de remuage a ainsi pu être supprimée.



Figure 25 : Illustration de l'utilisation des levures immobilisées pour la prise de mousse

### III.5.2. La désacidification des moûts

Comme mentionné ci-avant, il est souvent nécessaire d'éliminer l'acide malique présent dans les vins. Même si la fermentation malolactique est la méthode la plus courante, il peut être

avantageux dans certaines conditions d'utiliser les levures *Sch.pombe* pour réaliser la fermentation maloalcoolique. Et afin de maintenir des vitesses de fermentation élevées, la désacidification des moûts avant fermentation alcoolique peut être préférée. Cependant, compte tenu de la concurrence entre les souches *S.cerevisiae* et *Sch.pombe* (Taillandier et al. 1995) et les vitesses de croissance plus élevées dans le cas de la première, il est nécessaire d'inoculer massivement le moût avec *Sch.pombe* pour garantir la désacidification du moût. Et dans un deuxième temps, pour éviter d'éventuels faux goûts, il est nécessaire de procéder rapidement à leur retrait du moût une fois celui-ci désacidifié.

Bien que ce schéma paraisse complexe et délicat en utilisant des levures classiques, il est bien facilité par l'utilisation des levures immobilisées. Silva et al. (2003) en ont d'ailleurs démontré la faisabilité industrielle avec des levures *Sch.pombe* incluses dans des billes d'alginate elles-mêmes placées dans des sacs de nylon suspendus dans les cuves à traiter (Figure 26).



Figure 26 : Mise en œuvre des levures immobilisées pour la désacidification

### III.5.3. Le traitement des arrêts de fermentation

En vinification, il arrive que la fermentation alcoolique subisse un net ralentissement voire un arrêt total avant l'épuisement total des sucres résiduels. Cet arrêt, qui se produit pour diverses raisons, peut être résolu par l'apport d'une grande quantité de levures dans un état physiologique approprié donc en ayant recours à des levures *S.cerevisiae* immobilisées. Dans ce cas, les levures subissent un traitement particulier avant immobilisation afin d'assurer par la suite une bonne activité fermentaire même en milieu très défavorable comme lors des arrêts de fermentation. De nombreux essais industriels, certains publiés par Silva et al. (2002), ont montré l'efficacité de ce nouveau protocole.

#### IV. La fermentation continue, passé ou futur ?

Initialement, le développement de la vinification continue était basé sur la prise en compte des avantages de la fermentation continue adoptée dans certaines industries de fermentation pour des raisons de rapidité, de régularité et d'économie. Dans cette configuration, le moût était envoyé en fermentation en bas de la cuve et le produit fermenté récupéré en haut de cuve ; la population levurienne, a priori maîtrisée, était plus élevée et l'activité fermentaire maximale. Cependant, dans la réalité les choses n'étant pas aussi faciles, la vinification continue pourtant pleine d'espoir a rapidement été abandonnée.

Néanmoins, avec l'apparition sur le marché des microorganismes immobilisés, la fermentation continue pourrait refaire son apparition dans les caves.

##### IV.1. Le pourquoi des abandons des fermenteurs continus

Le développement de nouveaux procédés permettant la vinification en continu a eu lieu dans les années 1960. L'avantage de ce type de fonctionnement résidait dans la capacité à produire sous un contrôle rigoureux de grands volumes de vins du même type et de la même qualité.

Le vinificateur continu, présenté en Figure 27, est constitué d'une tour en acier inoxydable de 400 à 4 000 hL permettant la production respectivement de 2 300 à 23 000 hL de vin pour trois semaines de vinification.

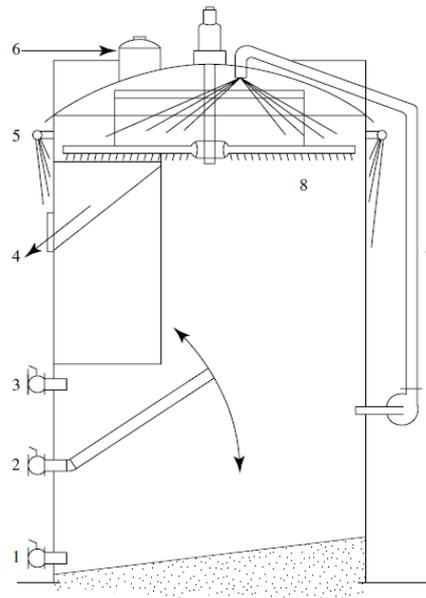


Figure 27 : Schéma du vinificateur continu (Ribéreau-Gayon et al. 1976)  
(1. Evacuation des pépins ; 2. Soutirage du vin ; 3. Alimentation en moût ; 4. Soutirage du marc ; 5. Refroidissement ; 6. Dôme d'expansion ; 7. Circuit de remontage ; 8. Râteau d'extraction du marc

En début de campagne, le vinificateur est rempli de vendange sulfitée et éraflée. Chaque jour, du marc (partie solide) ainsi que du vin partiellement fermenté sont évacués et une quantité équivalente de vendange fraîche est ajoutée. En partie supérieure de cuve, un râteau tournant

permet d'évacuer le marc vers un pressoir continu. Le volume renouvelé chaque jour correspond à un quart du volume global soit un équivalent moyen de 4 jours de macération. Régulièrement, les pépins s'accumulant dans la partie inférieure de la cuve, sont eux aussi éliminés.

L'ensemble du procédé est équipé de tous les équipements permettant le contrôle des opérations. La vendange servant à alimenter le vinificateur continu est sulfitée par une pompe doseuse ; une correction (modification de l'acidité, chaptalisation) est également réalisable. Le contrôle de la température, la réfrigération et le régime des remontages sont automatisés.

En comparaison avec la vinification dite 'classique', la vinification continue présente certains avantages mais également certains inconvénients.

Tout d'abord, les conditions du milieu étant favorable à la croissance des levures, la population levurienne est généralement deux fois plus importante qu'en fermentation classique. La fermentation est donc plus rapide en fonctionnement continu. Du fait de cette population importante, même si les vins soutirés contiennent encore quelques sucres, ceux-ci sont rapidement achevés par les levures en suspension.

De plus, dès l'introduction de la vendange, celle-ci se retrouve dans un milieu alcoolique qui favorise le travail des levures alcoogènes au détriment des levures sauvages. La conséquence est un rendement en alcool légèrement plus élevé de 0,1 à 0,2 % (v/v) et une diminution de la concentration en glycérol de 1 g.L<sup>-1</sup>.

Un autre avantage concerne la macération. En effet, l'extraction des anthocyanes et des tanins est à la fois favorisée par la température et le degré alcoolique du milieu. L'intensité colorante est également supérieure à celle obtenue en vinification 'classique'.

D'un point de vue organoleptique, aucune différence significative n'est notée à condition d'avoir un procédé conduit de façon optimale. En réalité, du fait d'un risque de contamination important, des déviations sont régulièrement observées ; les conditions de fonctionnement du vinificateur continu se prêtent bien au développement des bactéries lactiques et il est parfois possible de déceler un départ de fermentation malolactique. Sur un tel milieu, où de la vendange fraîche est apportée tous les jours, le risque de piqûre lactique est élevé. Et dans le cas d'une contamination excessive, l'arrêt immédiat et l'écoupage complet du vinificateur peut être nécessaire.

Malgré les avantages de la fermentation continue, la réalité des contaminations microbiennes a conduit à l'arrêt des vinificateurs continus ; pratiquement toutes les installations de ce type ont disparu des caves vinicoles (Ribéreau-Gayon et al. 1998).

## IV.2. Microorganismes immobilisés, le futur de la fermentation continue ?

Comme nous l'avons discuté précédemment, pour une fermentation en continu réussie, il est important de travailler à haute concentration cellulaire et de bien maîtriser la population microbienne présente dans le réacteur. Ceci étant particulièrement difficile dans le cas d'une fermentation en levures libres, l'utilisation de cellules immobilisées peut être une solution.

Dans le cas de la vinification, les travaux publiés sur la fermentation alcoolique en continu sont peu nombreux et généralement limités à l'échelle laboratoire. L'objectif ici est de faire une synthèse des procédés mis en œuvre et des résultats obtenus pour la réalisation de la fermentation alcoolique en continu que ce soit pour la production de bioéthanol ou de boissons fermentées. Dans le cas du vin, nous nous intéressons également à la fermentation maloalcoolique qui peut être associée soit avant soit après soit même pendant la fermentation alcoolique.

A défaut de données complètes, les rapports H/D, bien qu'ils soient importants pour le dimensionnement d'un réacteur, ne sont ici pas indiqués.

### IV.2.1. Production de bioéthanol

Comme en témoignent les Tableau 5 et Tableau 6, la fermentation alcoolique en mode continu sur levures immobilisées dans le domaine du bioéthanol a été largement étudiée. De nombreux résultats ont été publiés pour des configurations de réacteur très classiques, type lit fixe, mais de nombreuses évolutions ont également été proposées.

Shiotani et Yamané (1981), face au problème de rétention de CO<sub>2</sub> (volume mort, gradient de pression), ont proposé une version horizontale du lit fixe. Et comparant les performances des configurations verticale et horizontale dans les mêmes conditions opératoires, ils ont montré un gain de productivité de 30 %. Cette amélioration peut être attribuée au fonctionnement même du réacteur. En effet, d'après les profils de concentrations en sucres et en éthanol, le fonctionnement du réacteur horizontal est semblable à celui d'un réacteur de type piston. D'autre part, une très bonne évacuation du CO<sub>2</sub> est observée. Par contre, un des inconvénients énoncé est l'apparition d'un chemin préférentiel de l'alimentation lorsque son débit est augmenté. Cette observation a également été faite par Axelsson (1988) qui proposa des améliorations qui lui permirent de multiplier sa productivité en éthanol par dix.

Valach et al. (2006) présentent un montage comportant 3 réacteurs lit fixe à 7 compartiments, en série. L'objectif de cette répartition est bien évidemment de répartir de façon homogène les billes de levures et de limiter les divers inconvénients propres au lit fixe (rétention de gaz, limitation du transfert de matière...). En un peu plus d'une demi-journée de temps de séjour du liquide, 10,5-11 % (v/v) d'éthanol sont produits. Les auteurs ont étudié également en parallèle l'efficacité d'un air-lift. Celui-ci permet d'obtenir en sortie 1 % (v/v) d'éthanol en plus. A l'origine de cette différence se trouve le gaz produit. En effet, dans le 1<sup>e</sup> cas, des

bulles de gaz se formant autour des billes ont été observées. Celles-ci contribuent à l'augmentation du volume mort et donc à une diminution des performances du système. Dans le cas de l'air-lift, un meilleur mélange a lieu améliorant les transferts de matière et donc l'efficacité du procédé.

Dans le cas classique du lit fixe, les données publiées témoignent d'une volonté d'industrialisation. C'est le cas de l'article de Nagashima et al. (1984) qui nous présentent les résultats de production d'éthanol en lit fixe à l'échelle laboratoire et à l'échelle pilote avec un changement d'échelle significatif de 1 000. Bien qu'à première vue, ce transfert montre une moins bonne conversion de l'éthanol, il faut remarquer que les débits d'alimentation appliqués sont plus rapides dans le cas du pilote. Finalement, cela laisse à penser que le changement d'échelle, dans ce cas, n'a a priori pas d'impact majeur sur l'efficacité du procédé. D'autre part, les auteurs ne font mention d'aucun problème d'ordre hydrodynamique majeur mais parlent de turbulence au niveau du lit.

Enfin, une dernière étude d'intérêt est celle de Tyagi et al. (1992). En effet, bien que travaillant avec des levures adsorbées sur de la bagasse et non incluses dans des gels polysaccharidiques, les auteurs étudient l'impact du chargement d'une colonne lit fixe ainsi que l'effet du rapport H/D de cette colonne. Ils mettent ainsi en évidence qu'une augmentation du débit d'alimentation conduit à une plus grande augmentation de productivité pour les lits fixes peu chargés en billes (par exemple 20 % (w/v)). De plus, au delà d'une certaine concentration en billes limite, 50 g.L<sup>-1</sup> dans cette étude, les différences de productivités obtenues à deux concentrations ne sont plus significatives du fait des importantes rétentions de gaz réduisant le volume de travail. D'autre part, et contrairement aux idées reçues, une augmentation du rapport H/D ne réduira pas les phénomènes de rétention, au contraire. Ils en arrivent à la conclusion que pour un fonctionnement en lit fixe optimal, une colonne présentant un rapport H/D de 2,5 chargée à 50 g.L<sup>-1</sup> suffit.

#### IV.2.2. Production de bière

En termes de fermentation continue, le domaine de la bière est le domaine le plus avancé. En effet, de nombreux articles font déjà mention d'industrialisation des procédés (Mensour et al. 1997, Nedović et al. 2005, Verbelen et al. 2006). Bien évidemment, l'avancement de ce secteur s'explique par deux paramètres importants :

- la production de bière ne requiert pas un degré alcoolique important (seulement 5 % (v/v) contre 12 % (v/v) dans le vin voire plus pour le bioéthanol ;
- la disponibilité de la matière permet un fonctionnement continu sur l'ensemble de l'année.

De plus, et contrairement à la production du bioéthanol et du vin, l'objectif en production de bière n'est pas tout à fait le même. Préférentiellement, un couplage de la croissance de la biomasse avec la fermentation alcoolique est recherché, afin de produire des bières au profil

équilibré. C'est pourquoi bon nombre de montages continus comportent un premier étage de type Gaz-lift (Dömény et al. 1998, Silva et al. 2008).

Nous présentons, ici, les principaux montages existants à l'échelle industrielle, les montages laboratoires publiés dans la littérature sont également donnés dans le Tableau 7 à titre informatif.

Les premiers procédés industriels proposés dans la fabrication de la bière avaient pour objectif d'accélérer le procédé de maturation ou deuxième fermentation de la bière (Figure 28). Cette étape consiste en la transformation via l'action des levures du diacétyl en acétoïne et 2,3-butanediol. Deux systèmes de maturation en continu ont été implantés, chacun utilisant après la fermentation principale, un séparateur, un système de chauffe et enfin un réacteur à lit fixe de levures immobilisées sur des particules de DEAE-cellulose ou de verre.

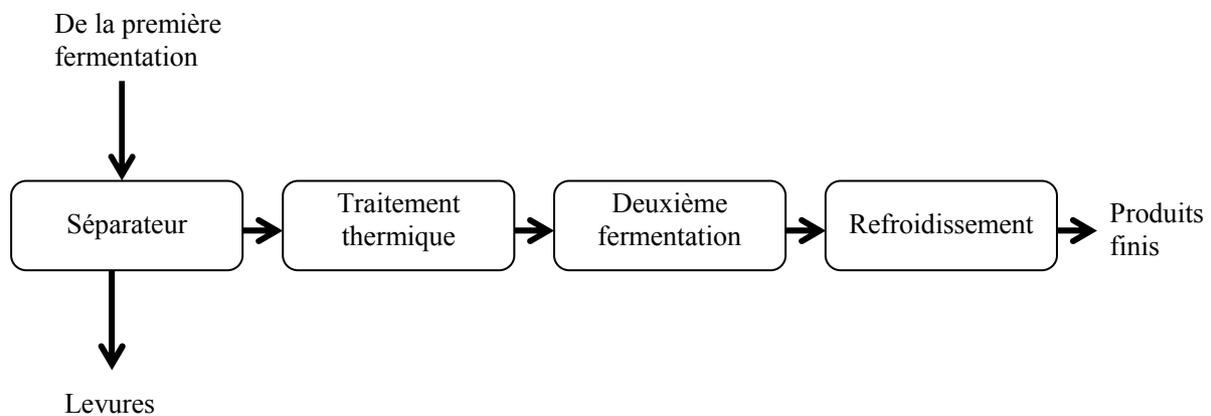


Figure 28 : Schéma du procédé de fabrication de la bière

Une autre application des levures immobilisées a été et est toujours la production de bière à faible taux d'alcool. Traditionnellement, ces produits proviennent de cuves en arrêt de fermentation grâce à un maintien de faibles températures, ce qui limite la production d'éthanol par les levures. Grâce aux développements des systèmes utilisant les cellules immobilisées, cette étape peut être réalisée en lit fixe comme c'est déjà le cas chez le producteur Bavaria dont la capacité de production est de l'ordre de 150 000 hL par an (Van Dieren et al. 1995).

Enfin, le dernier axe de recherche dans le domaine de la bière a été l'implémentation de la fermentation principale en continu. En effet, la première ou principale fermentation est non seulement à l'origine du degré alcoolique mais également du profil organoleptique de la bière. Étant donné que la formation du profil aromatique est notamment liée aux métabolismes des acides aminés, cette étape requiert donc un couplage de la croissance des levures et de la fermentation alcoolique.

L'industrie Japonaise Kirin a développé un système multi-étagé pour la fermentation principale de la bière. Le procédé est constitué d'un Chemostat pour la croissance des levures, de réacteurs à lit fixe et enfin d'une colonne de maturation de type lit fixe également. De la bière de qualité au niveau organoleptique est ainsi produite en 3 à 5 jours. Cependant la productivité n'est ici que doublée, ce qui suppose une utilisation sous optimale des levures immobilisées (Norton et D'Amore 1994).

Le système de Meura Delta, équipementier Belge, consiste en un bioréacteur à cellules immobilisées pour une fermentation partielle et une croissance cellulaire, suivi d'un réacteur agité continu pour la fin de fermentation, la formation des esters et la maturation. Les matrices d'immobilisation utilisées dans ce système sont des tiges de carbure de silicium. L'ensemencement du réacteur agité continu quant à lui est réalisé grâce aux levures libérées dans le premier étage.

Enfin, un dernier système prometteur est le réacteur de type Gaz-lift. C'est d'ailleurs celui qui fait le plus l'objet de recherches en laboratoire (Tableau 7). En effet, celui-ci garantit un bon mélange des différentes phases sans pour autant endommager le support d'immobilisation. Ainsi, l'amélioration des transferts liquide (moût) – solide (levures immobilisées), permet d'obtenir un produit fini bien équilibré au niveau aromatique. Les brasseries Labatt (Canada) ont réalisé des essais à l'échelle pilote dans un réacteur type Gaz-lift de 50 L et des levures incluses dans du  $\kappa$ -Carrageenan. Ils ont obtenu un fonctionnement stable permettant d'obtenir une bière à 5,09 % (v/v) et au profil organoleptique acceptable en un temps de séjour compris entre 20 et 24 h contre 5 à 7 jours en procédé classique (Mensour et al. 1997).

#### IV.2.3. Production de vin

Dans le domaine de l'œnologie, l'immobilisation des cellules est un sujet de recherche qui intéresse de plus en plus de monde, même si les applications à l'échelle industrielle restent très limitées. L'objectif de l'utilisation de cette technique, en outre de permettre une production en continu, est surtout d'améliorer la productivité et le profil organoleptique. Pour une production industrielle réussie, le support d'immobilisation doit bien entendu être un produit alimentaire, relativement abondant dans la nature et économiquement intéressant. En France, le seul support autorisé aujourd'hui est l'alginate de calcium, mais uniquement pour des applications bien spécifiques. Nous avons donc focalisé notre intérêt sur les études utilisant ce support ou des supports similaires.

##### A. Fermentation alcoolique

L'une des configurations les plus citées dans la littérature est le réacteur à lit fixe. Un exemple réussi est présenté par Drichoutis et al. (2007). Utilisant une simple colonne de rapport H/D autour de 7, les auteurs produisent un vin à 12,7 % (v/v) d'éthanol avec un temps de séjour

d'environ 50 h. Malgré un chargement en billes à 80 % du volume apparent, ils ne font aucunement mention de problème hydrodynamique.

Au contraire, Uematsu et al. (1988), anticipant les difficultés de fonctionnement engendrées par la production de CO<sub>2</sub> (rétention de gaz et mélange non homogène), ont proposé une évolution des colonnes à lit fixe : la colonne fuselée. Grâce à l'augmentation de la section de colonne tout au long de la hauteur du réacteur, les gradients de pression se formant en configuration traditionnelle sont contrebalancés.

Le système utilisé par Bakoyianis et al. (1992, 1997), est également constitué de colonnes en lit fixe. Mais leur montage comporte deux colonnes en série de 1,5 L de volume utile. Grâce à ce montage bi-étagé, le temps de séjour pour obtenir une fermentation complète est d'environ 80 h. Malheureusement, aucun essai comparatif en mono-étagé n'a été réalisé. Dans leur cas, il n'est aucunement fait mention de problème de rétention de gaz.

Enfin, un dernier montage décrit dans la littérature est le réacteur compartimenté. Ce type de réacteur est décrit par Ogonna et al. (1989) en version horizontale. La compartimentation est réalisée grâce à la mise en place d'assiettes, au nombre de 5, sur lesquelles sont immobilisées les levures *S.cerevisiae*. Comme pour la colonne fuselée, l'intérêt de cette configuration est d'une part de limiter les problèmes liés à la production de CO<sub>2</sub> (horizontalité) mais également de limiter les risques de rupture de billes du fait de trop fortes contraintes de pression appliquées en base du lit fixe (compartimentation). Les levures immobilisées, ainsi réparties sur plusieurs assiettes sous forme de membrane ne risquent plus de s'écraser mutuellement. De plus, le fonctionnement de ce réacteur se rapproche des modèles réacteurs agités en série à N-réacteurs, ce qui en théorie permet de meilleures performances que dans un réacteur simple.

Comme nous le constatons ici, ainsi que dans le Tableau 8, la configuration la plus citée dans la littérature est le réacteur à lit fixe. Bien que les résultats cinétiques obtenus soient généralement intéressants, les auteurs discutent malheureusement trop peu les aspects hydrodynamiques. De plus, leurs résultats restent confiner à la seule échelle du laboratoire, et aucune perspective industrielle n'est abordée à l'inverse des études portant sur le bioéthanol et la bière.

### *B. Fermentation maloalcoolique*

Dans le cas de la fermentation maloalcoolique, les exemples publiés sont plus classiques. En effet, Ciani (1995) étudie la dégradation de l'acide malique dans une colonne à lit fixe, Taillandier et al. (1991) utilisent une colonne à bulles, et finalement Taillandier et al. (1994) présentent des résultats obtenus en lit fluidisé recyclé. Malgré ces différentes configurations et les différences dans les milieux (moût, milieu synthétique, vin), il est important de noter que les résultats rapportés dans ces 3 études (Tableau 9) montrent la faisabilité et l'intérêt d'une

fermentation maloalcoolique en continu face à un procédé batch. Selon Ciani et al. (1995), 264 hL de vin pourraient être désacidifiés en 20 jours dans un réacteur de 10 hL.

### C. Cas de cultures séquentielles et mixtes

Compte tenu de la faisabilité de la fermentation maloalcoolique en continu, certains auteurs se sont intéressés aux cultures séquentielles et cultures mixtes de *S.cerevisiae* et *Sch.pombe* pour réaliser les deux fermentations.

Dans leurs travaux de 1993, Yokotsuka et al. ont évalué l'effet d'une culture séquentielle des deux souches rendue possible par l'utilisation des levures sous forme immobilisée. Trois options ont été testées en batch :

- dégradation totale de l'acide malique par *Sch.pombe* puis inoculation de *S.cerevisiae* pour la fermentation alcoolique ;
- fermentation alcoolique complète puis inoculation de *Sch.pombe* pour la fermentation maloalcoolique ;
- fermentation alcoolique partielle (7 % (v/v)) puis inoculation de *Sch.pombe* pour la dégradation de l'acide malique.

Avec ces trois options, les auteurs démontrent que la vitesse de désacidification est d'autant plus lente que la concentration en alcool est élevée. Ils montrent également que malgré la présence de *S.cerevisiae* dans le milieu, l'activité désacidifiante de *Sch.pombe* est maintenue. Ainsi donc, sont mises en avant les faisabilités de cultures séquentielles ou mixtes permettant fermentations alcoolique et maloalcoolique.

Ogbonna et al. (1989) ont également évalué la faisabilité d'une culture mixte continue en utilisant le même système précédemment décrit (paragraphe IV.2.3 A de ce chapitre). Dans ce cas là, une partie des assiettes était constituée de *S.cerevisiae* dans du gel d'alginate et une autre de *Sch.pombe* également dans du gel d'alginate.

Placées en position 1 et 3, les assiettes de *Sch.pombe* montrent des activités différentes : plus celles-ci sont proches de l'alimentation, plus la désacidification est importante, confirmant l'effet inhibiteur de l'éthanol. Cependant, cela n'a pas empêché d'obtenir une double fermentation continue plus qu'acceptable puisqu'en environ 33 h de temps de séjour globale, le produit en sortie présentait une concentration en sucres résiduels de 17 g.L<sup>-1</sup>, un taux d'éthanol de 14,5 % (v/v) et une concentration en acide malique de 0,5 g.L<sup>-1</sup> (soit 2 g.L<sup>-1</sup> consommés).

D'après les résultats présentés dans la littérature, la réalisation de la fermentation du moût de raisin en continu sur levures immobilisées semblent tout à fait possible et intéressante puisqu'elle permettrait a priori de réduire les temps de fermentation de quelques jours. Bien évidemment, il est peu vraisemblable d'atteindre les performances obtenues dans le cas du bioéthanol (de l'ordre de quelques heures) dans la mesure où pour cette application, une

conversion totale du sucre n'est pas indispensable alors que cela est le cas pour la production du vin.

Parmi les configurations proposées, nous voyons déjà que certaines, bien qu'intéressantes dans leur domaine d'application, ne pourront pas s'appliquer à la vinification en continu. C'est notamment le cas des systèmes Gaz-lift utilisés en brasserie qui, nécessitant une injection de gaz, ne seront pas bienvenus dans le domaine oenologique. D'autres configurations, conçues spécifiquement pour étudier et limiter des problèmes d'hydrodynamiques à l'échelle laboratoire, ne seront jamais réalisables à grande échelle.

Au contraire, certains procédés ayant été transférés à l'échelle pilote montrent la faisabilité d'une fermentation continue à grande échelle.

Enfin, une dernière piste de recherche qui ressort ici est la double fermentation. En effet, dans l'objectif de produire en continu des vins de consommation rapide, il peut être intéressant de remplacer la fermentation malolactique, étape plutôt longue et difficile, par la fermentation maloalcoolique et de réaliser celle-ci en amont ou en même temps que la fermentation alcoolique.

Tableau 5 : Synthèse des études de fermentation alcoolique continue sur levures immobilisées pour la production d'éthanol publiées

Références	Réacteur	Support	Biomasse en cellules.mL <sup>-1</sup>	Température en °C	Milieu en entrée, sucres en g.L <sup>-1</sup>	Ethanol en sortie en % (v/v)	Temps de séjour moyen sur le liquide / globale en h
Yadav et al. (1996)	Lit fixe	Ca-alginate		30	Milieu synthétique 100	5,8 % (v/v)	2,8h / ?
Lee et al. (1983)	Lit fixe	Ca-alginate			Milieu synthétique 200	11,4 % (v/v)	3,8 h ?
Gòdia et al. (1987)	Lit fixe	κ-Carraghénane	9,5.10 <sup>7</sup>	25	Milieu synthétique 165	7,9 % (v/v)	≈ 2 h / ≈ 5 h
Göksungur and Zorlu (2001)	Lit fixe (90 % de billes)	Ca-alginate	2,8.10 <sup>8</sup>	30	Mélasses de betterave 110	4,6 % (v/v)	1,2 h / 5,1 h
Shiotani et Yamané (1981)	Lit fixe	Poly-acrylamide		30	Mélasses 196	8,2 % (v/v)	? / 5h
	Lit fixe horizontal	Poly-acrylamide		30	Mélasses 196	10,8 % (v/v)	? / 5h
Axelsson (1988)	Lit fixe horizontal	Ca-alginate			Milieu synthétique 100	5,7 % (v/v)	8 h / 20 h
	Lit fixe horizontal bafflés	Ca-alginate			Milieu synthétique 100	5,6 % (v/v)	< 1 h / 1,5 h

Tableau 6 : Synthèse des études de fermentation alcoolique continue sur levures immobilisées pour la production d'éthanol publiées (suite)

Références	Réacteur	Support	Biomasse en cellules.mL <sup>-1</sup>	Température en °C	Milieu en entrée, sucres en g.L <sup>-1</sup>	Ethanol en sortie en % (v/v)	Temps de séjour moyen sur le liquide / globale en h
Nagashima et al. (1984)	Lit fixe bi-étagé	Ca-alginate	>1.10 <sup>9</sup> ?	≈ 30	Mélasses	≈ 10 % (v/v)	≈ 3,5 h / ≈ 7 h
	Lit fixe bi-étagé, échelle pilote (2*1000 L)	Ca-alginate	>1.10 <sup>9</sup> ?	≈ 30	Mélasses	≈ 8,5-9 % (v/v)	≈ 2 h / ≈ 5 h
McGhee et al. (1982)	Lit fixe compartimenté (25)	Ca-alginate	1,2.10 <sup>10</sup>		Solution de glucose 100	≈ 6,3 % (v/v)	38 h / ≈ 65 h
Valach et al. (2006)	Lit fixe compartimenté (7) tri-étagé	Ca-pectate		≈ 31	Milieu synthétique 250	≈ 10,5-11 % (v/v)	14 h / 18 h
	Gaz- lift tri-étagé	Ca-pectate		≈ 31	Milieu synthétique 250	≈ 11,5-12 % (v/v)	14 h / 18 h
Tyagi et al. (1992)	Lit fixe	Bagasse	1.10 <sup>9</sup>	30	Mélasses 200	≈ 12,2 % (v/v)	? / 1,89 h

Tableau 7 : Synthèse des études de fermentation alcoolique continue sur levures immobilisées pour la production de bière publiées

Références	Réacteur	Support	Biomasse en cellules.mL <sup>-1</sup>	Température en °C	Milieu en entrée, sucres en g.L <sup>-1</sup>	Ethanol en sortie en % (v/v)	Temps de séjour moyen sur le liquide / globale en h
Ryder et Masschelein (1985)	Lit fixe	Ca-alginate	>1.10 <sup>9</sup>	15	Moût ≈ 120	≈ 5,8 % (v/v)	8 h / 16 h
Tata et al. (1999)	Lit fluidisé recirculé bi-étagé	Verre	1-1,5.10 <sup>9</sup>	15,6	Moût ≈ 100	≈ 6,1 % (v/v)	76 h
Dragone et al. (2007)	Colonne à bulles	Drèches	3.10 <sup>8</sup>	15	Moût ≈ 135	≈ 6 % (v/v)	25 h / 47 h
Dömény et al. (1998)	Réacteur bi-étagé (1. Gaz-lift ; 2. Lit fixe)	1. Levures immobilisées 2. Ca-alginate Ca-pectate κ-Carraghénane		15	Moût 85-90	1. 4,1	1. ? / 12,8 h
						2. 5,9	2. ? / 57,2 h
						6,1 5,6	? / 56,4 h ? / 64,7 h
Silva et al. (2008)	Réacteur tri-étagé (1. Gaz-lift ; 2. Sédimenteur ; 3. Lit fixe)	Support alternatif économique		1. 16 2. 5 3. 2	Moût 85-90	1. ≈ 4,3 2. ≈ 5,5 3. ≈ 6,4	43 h / ?
Mensour et al. (1997)	Pilote Gaz-lift	κ-Carraghénane	4.10 <sup>8</sup>			5,09 % (v/v)	20-24 h / ?

Tableau 8 : Synthèse des études de fermentation alcoolique continue sur levures immobilisées pour la production de vin publiées

Références	Réacteur	Support	Biomasse en cellules.mL <sup>-1</sup>	Température en °C	Milieu en entrée, sucres en g.L <sup>-1</sup>	Ethanol en sortie en % (v/v)	Temps de séjour moyen sur le liquide / globale en h
Drichoutis et al. (2007)	Lit fixe mono-étagé	Double couches Ca-alginate-Chitosan	5.10 <sup>8</sup>	20	Muscat 217	12,7	50 h / 10 h
Uematsu et al. (1989)	Colonne fuselée	κ-Carraghénane	2.10 <sup>9</sup>	13	Colombard 220	7,1	? / 10 h
Bakoyianis et al. (1997)	Lit fixe bi-étagé	Ca-alginate	1.5.10 <sup>9</sup>	20	Roditis 195-215	12,6	80 h / 120 h
Ogbonna et al. (1989)	Lit fixe compartimenté horizontal	Ca-alginate	> 5. 10 <sup>8</sup>	25	Koshu ajusté 250	13,6	? / 33 h

Tableau 9 : Synthèse des études de fermentation maloalcoolique continue sur levures immobilisées publiées

Références	Réacteur	Support	Biomasse en cellules.mL <sup>-1</sup>	Température en °C	Milieu en entrée	Malique consommé en g.L <sup>-1</sup>	Temps de séjour moyen sur le liquide / globale en h
Ciani et al. (1995)	Lit fixe	Ca-alginate	?	25	Vin 12,2 % (v/v)	5,5	18 h / 25 h
Taillandier et al. (1991)	Colonne à bulle	Ca-alginate double couche	?	30	Milieu synthétique	7,5	4,2 / ? h
Taillandier et al. (1994)	Lit fluidisé recyclé	Ca-alginate	8.10 <sup>8</sup>	25	Moût concentré redilué	8,7	6 h / ? h



**Partie III :**  
**Détermination des cinétiques des levures**  
**immobilisées**



Afin de dimensionner un procédé continu utilisant les levures immobilisées, nous avons commencé par étudier les cinétiques de celles-ci en culture batch. L'impact de la concentration en billes ainsi que l'effet d'un recyclage ont également été étudiés.

Dans un 2<sup>e</sup> temps et compte tenu des résultats, une analyse plus systématique du comportement des billes a été réalisée, avec notamment l'analyse de l'activité spécifique à différentes concentrations en billes et en comparaison avec les levures libres.

Enfin, dans un 3<sup>e</sup> temps, une étude de faisabilité d'une double fermentation simultanée a été menée afin de réunir dans une seule et même étape fermentation alcoolique et fermentation maloalcoolique, comme cela avait été suggéré par Ogbonna et al. (1989) ainsi que Yokotsuka et al. (1993).

## **I. Matériel et méthodes**

### **I.1 Milieux de fermentation**

Les essais laboratoire sont réalisés soit sur jus de raisin rouge commercial ('100% pur jus de raisin' Carrefour Discount®, France) soit sur du concentré de jus de raisin rouge (CJRR) (ex-Grape® juice Inosud, France).

Le jus de raisin contient environ 150 g.L<sup>-1</sup> de sucres réducteurs, 2,3 g.L<sup>-1</sup> d'acide malique, 161 mg.L<sup>-1</sup> d'azote assimilable et présente un pH de 3,45. Afin de respecter les caractéristiques d'un jus industriel, 60 g.L<sup>-1</sup> de sucres (moitié glucose, moitié fructose), 225 mg.L<sup>-1</sup> de sulfate d'ammonium et 5 g.hL<sup>-1</sup> de dioxyde de soufre sont ajoutés systématiquement. La concentration en acide malique est ajustée à 5 g.L<sup>-1</sup>.

Le concentré de raisin, chargé à environ 800 g.L<sup>-1</sup> de sucre, est quant à lui dilué au quart. Sa concentration initiale en azote assimilable étant de l'ordre de 1000 mg.L<sup>-1</sup>, aucun ajout d'azote n'est fait. Par contre, 2,2 g.L<sup>-1</sup> d'acide malique et 5 g.hL<sup>-1</sup> de dioxyde de soufre sont ajoutés pour garder les mêmes teneurs que dans le jus industriel.

### **I.2. Levures**

#### **I.2.1 Levures immobilisées**

La levure *S.cerevisiae* QA23, immobilisée dans de l'alginate de calcium 'mono couche' avec un noyau d'alginate pur, est utilisée pour la fermentation alcoolique. La souche *Sch.pombe* G2, immobilisée dans de l'alginate de calcium 'double couche' avec une couche externe d'alginate pur, est quant à elle utilisée pour la fermentation maloalcoolique. Les deux souches immobilisées et séchées sont fournies par la société portugaise Proenol Lda, Portugal sous les références ProRestart® et ProMalic® respectivement. Initialement, les billes sèches présentent un diamètre moyen de 2 mm, et contiennent plus de 10<sup>9</sup> cellules par gramme de billes sèches.

## I.2.2 Levures libres

La levure *S.cerevisiae* QA23 conservée sur pente de gélose YEPD à 4°C, est utilisée pour des fermentations en levures libres.

## I.3. Préparation de l'inoculum

### I.3.1 Levures immobilisées

Qu'il s'agisse des billes de *S.cerevisiae* ou de *Sch.pombe*, le protocole de préparation préconisé par le fabricant est le même :

- sortir les billes et laisser revenir à température ambiante,
- préparer une solution de réhydratation à 40 g.L<sup>-1</sup> de glucose à 37°C,
- mettre 5 masses de solution de réhydratation pour 1 masse de billes sèches,
- laisser réhydrater 4 à 5 h avant inoculation.

Au moment de l'inoculation, la différence de température entre la solution de réhydratation et le milieu de fermentation ne doit pas dépasser les 10°C.

### I.3.2 Levures libres

La préparation de l'inoculum se fait en deux étapes.

Dans un premier temps, la levure, conservée sur pente, sert à l'inoculation de 100 mL de milieu YEPD dont la composition est donnée ci-dessous. La fiole est incubée à 30°C sous une agitation de 120 rpm pendant 24 h.

Dans un deuxième temps, ces 100 mL sont transférés dans 500 mL de milieu YEPD dans une nouvelle fiole. Celle-ci est incubée à 30°C sous une agitation de 120 rpm pendant 20 h.

Pour l'inoculation, nous calculons le volume de pré-culture qu'il nous faut centrifuger afin d'atteindre la population souhaitée après inoculation du jus par le culot. Ce volume est centrifugé une première fois 10 min à 5000 g. Un lavage au jus de raisin est ensuite réalisé, suivi d'une deuxième centrifugation à 5000 g pendant 10 min avant le transfert final du culot dans le milieu de fermentation.

Tableau 10 : Composition du milieu de pré-culture YEPD

Milieu	g.L <sup>-1</sup>
Glucose	20
Extrait Autolytique Levure	10
Peptone de soja	20

## I.4. Fermentation en batch

Les essais de fermentation en batch, en levures immobilisées ou levures libres, sont conduits dans des fioles de 500 mL préalablement stérilisées à vide, contenant 250 mL de jus additionné des levures. Une agitation de 100 rpm, vitesse permettant un bon transfert et une bonne homogénéisation du milieu sans mise en suspension des billes, est appliquée. La température de fermentation est maintenue à 20°C.

Afin d'évaluer les éventuelles déviations de cinétique conséquentes à l'utilisation prolongée des billes, plusieurs cycles sont effectués en renouvelant le milieu de fermentation à la fin de chaque cycle.

### I.5. Suivi des fermentations

Pour toutes les analyses de substrats et produits, les échantillons sont centrifugés afin de séparer milieu de fermentation et cellules. Les échantillons sont ensuite congelés et stockés à -20°C.

#### I.5.1 Suivi de la consommation des sucres

##### A. Mesure de la perte de poids

En supposant que la perte de poids est uniquement la conséquence du CO<sub>2</sub> dégagé, cette mesure nous donne accès à la quantité de CO<sub>2</sub> produite et donc à la quantité de sucres consommés. Une mesure est réalisée avant et après chaque prélèvement afin de ne pas introduire d'erreur.

##### B. Dosage des sucres réducteurs :

Les sucres réducteurs sont dosés suivant la méthode de l'acide dinitrosalicylique (Miller, 1959).

1 mL de réactif DNS (Tableau 11) est mélangé avec 1 mL d'échantillon à analyser, préalablement dilué si nécessaire. Après homogénéisation, le tout est incubé à 100 °C pendant 5 minutes. En fin d'incubation, un refroidissement dans un bain de glace et l'ajout de 10 mL d'eau distillée arrête la réaction. Enfin, la lecture de l'absorbance à 540 nm permet de déterminer, à partir de la gamme étalon et en tenant compte des dilutions, la teneur en sucres réducteurs des différents échantillons, exprimée en g.L<sup>-1</sup>. Cette méthode permet de doser des échantillons dont la teneur en sucres réducteurs est comprise entre 0 et 2 g.L<sup>-1</sup>.

Tableau 11 : Composition du réactif DNS

Composés	g.L <sup>-1</sup>
NaOH	16
DNS	10
KNaC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	300

Le réactif est à conserver à l'abri de la lumière.

##### C. Dosage du glucose/fructose :

L'utilisation du kit enzymatique de dosage du D-Glucose/D-Fructose (E5160 Boehringer R-Biopharm) nous permet d'accéder à la concentration en glucose/fructose.

### I.5.2 Dosage de l'acide malique

La concentration en acide L-malique est mesurée par méthode enzymatique (E5280 Boehringer R-Biopharm).

### I.5.3 Dosage du glycérol

La concentration en glycérol est également mesurée par méthode enzymatique (E5360 Boehringer R-Biopharm).

### I.5.4 Dosage de l'éthanol

#### A. Mesure par ébulliométrie

Cette mesure se base sur la différence de température d'ébullition entre l'eau et l'alcool. Le vin pouvant être considéré comme un mélange hydroalcoolique, plus sa teneur en éthanol est importante, plus sa température d'ébullition est faible.

L'appareil de mesure, l'ébulliomètre (Figure 29) est constitué d'une chaudière chauffée par une lampe à alcool, surmontée d'un réfrigérant et d'un thermomètre. La mesure consiste à déterminer la température d'ébullition de l'eau de façon à étalonner l'appareil et à mesurer ensuite celle du vin. La correspondance entre température d'ébullition du vin et son titre alcoométrique volumique est donnée par une table.

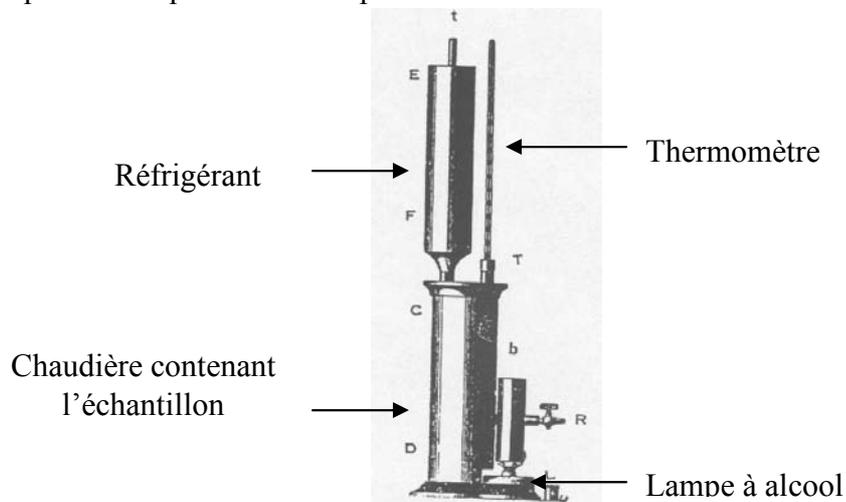


Figure 29 : Illustration d'un ébulliomètre

#### B. Mesure par HPLC

Les mesures par HPLC se font sur une colonne Rezex ROA-H<sup>+</sup> de 250 mm de long sur 4,6 mm de large avec une phase mobile d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 1,87 mmol.L<sup>-1</sup> circulant à 170 μL.min<sup>-1</sup> et 30°C, dans un appareil HPLC ACCELA (Thermo electron corporation) monté d'un détecteur externe (Surveyor RI Plus detector®, Finnigan®).

### I.5.5. Analyses de la biomasse

#### A. Numération cellulaires

La numération cellulaire est réalisée par un comptage direct sous microscope optique (Olympus® BH2, objectif 40) sur cellule de Thoma. La cellule est constituée de 16 grands carreaux d'un volume de  $4 \cdot 10^{-6}$  mL, chacun d'eux étant divisé en 16 petits carreaux (Figure 30).

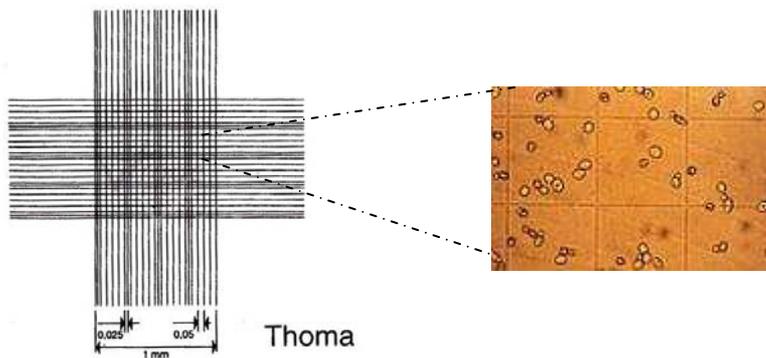


Figure 30 : Représentation du quadrillage d'une cellule de Thoma

Les microorganismes se répartissent aléatoirement sur le quadrillage. Les comptages sont donc réalisés sur les 5 même grands carreaux de la cellule. Le prélèvement doit être dilué de manière à obtenir entre 25 et 250 cellules sur le comptage considéré. Dans le cas d'un échantillon trop peu concentré, des carreaux supplémentaires sont pris en compte. La concentration cellulaire est obtenue grâce à l'équation (1) suivante :

$$\text{Concentration cellules / mL} \quad X = \text{Dilution} \times \frac{\text{Nombre cellules comptées}}{\text{Nombre grands carreaux comptés}} \times \frac{1}{4 \cdot 10^{-6}} \quad (1)$$

Pour les levures immobilisées, le comptage est précédé d'une dissolution du gel d'alginate dans une solution de tricitrate de sodium à 2 % (w/v). 10 à 20 min de vortex sont nécessaires à la dissolution de 4 billes dans 1 mL de tricitrate de sodium.

#### B. Viabilité

Le pourcentage de population viable est estimé par comptage après coloration au bleu de méthylène. Le réactif, 0,1 g de bleu dans un litre de citrate de sodium à 2 % (w/v), est à conserver à l'abri de l'air et de la lumière (Lange et al. 1993).

Pour l'analyse, l'échantillon est mélangé volume à volume avec le bleu de méthylène. Après homogénéisation et un temps de contact de quelques minutes, les cellules non viables apparaissent bleues alors que les viables restent incolores.

#### C. Poids sec

La mesure du poids sec des levures est réalisée à l'aide d'une thermobalance (Precisa, Dietikon-Suisse®). Pour chaque échantillon, un volume est déposé dans la thermobalance qui va chauffer et entraîner une évaporation de l'eau contenue dans cet échantillon. Le poids de

l'échantillon diminue progressivement jusqu'à se stabiliser : la valeur atteinte correspond donc au poids sec exprimé en  $\text{g.L}^{-1}$ . Afin de ne pas introduire d'erreur, les échantillons sont centrifugés et lavés à l'eau distillée pour éliminer d'éventuels substrats résiduels.

#### I.5.6. Analyses morphologiques des billes

##### A. Taille des billes

La taille des billes est évaluée par mesure directe du diamètre au double décimètre sur un groupe de 10 billes.

##### B. Microscope Electronique à Balayage

Des observations morphologiques avec notamment un intérêt pour la répartition des levures au sein des billes d'alginate sont réalisées par microscopie électronique à balayage.

Les billes d'alginate sont préparées suivant le protocole modifié décrit par Vives et al. (1993). Elles sont préalablement fixées par immersion dans une solution de glutaraldéhyde à 2 % dans un tampon cacodylate à 0,1 M pendant 2 h, lavées deux fois avec le même tampon et post fixées dans une solution d'Osmium à 1 % pendant 2 h à température ambiante et dans le noir. Après la post fixation, les échantillons sont progressivement déshydratés dans des solutions d'acétone-eau de plus en plus concentrées (50 %, 70 % pendant 5 min chacun, et 100 % acétone pendant 30 min) puis dans une solution d'acétone-hexamethyldisilazane (HDMS) à 50 % pendant 10 min avant de finir par une solution d'HDMS pure jusqu'à évaporation totale. Une section des billes ainsi préparées est ensuite réalisée pour une observation directe du cœur et de la couche externe des billes.

L'observation est réalisée sur un microscope électronique à balayage de paillasse (MiniMEB Hitachi TM 3000)

##### C. Microscope à Epifluorescence

Toujours pour observer la répartition des levures au sein des billes, des observations sont réalisées au microscope à épifluorescence. Dans un premier temps, les billes sont marquées avec une solution d'acridine orange (A6014, Sigma) à 0,03 % pendant quelques heures. Après un lavage à l'eau, les billes sont disposées dans une goutte d'eau sur une lame de microscope. L'analyse est faite sur un microscope Carl Zeiss® AxioImager® M2 équipé d'une lampe à vapeur de mercure à très haute pression HBO 50 et d'un filtre Zeiss 09® (Excitation HP 450–490, Réflecteur FT 10, Emission LP 520). Les images sont acquises avec une camera digitale monochrome (AxioCam MRm) et sont traitées avec le logiciel Axiovision®.

## II. Etude de la fermentation alcoolique

Dans cette partie, nous nous intéressons à la fermentation alcoolique par *S.cerevisiae* immobilisées. Dans un premier temps, l'impact de la concentration en billes sur les cinétiques de fermentation a été étudié. Du fait de l'observation d'un développement de levures en phase liquide, nous nous sommes intéressés à l'étude des activités spécifiques des levures

immobilisées et des levures libres, afin d'évaluer la participation de chacune des formes au cours de la fermentation.

## II.1. Impact de la concentration en billes

Les différents niveaux d'inoculation testés sont présentés dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Niveaux d'inoculation utilisés pour les essais de fermentation alcoolique en batch

Concentration de billes en $\text{g.L}^{-1}$ de liquide	Population théorique dans le jus inoculé ( $\text{cellules.mL}^{-1}$ de liquide)
152,5	$3,81.10^8$
89,0	$2,22.10^8$
39,5	$9,89.10^7$
9,1	$2,28.10^7$

### II.1.1 Analyse des cinétiques

Le graphique ci-dessous (Figure 31) montre les cinétiques obtenues sur jus commercial pour différentes concentrations en billes sur le premier cycle de fermentation.

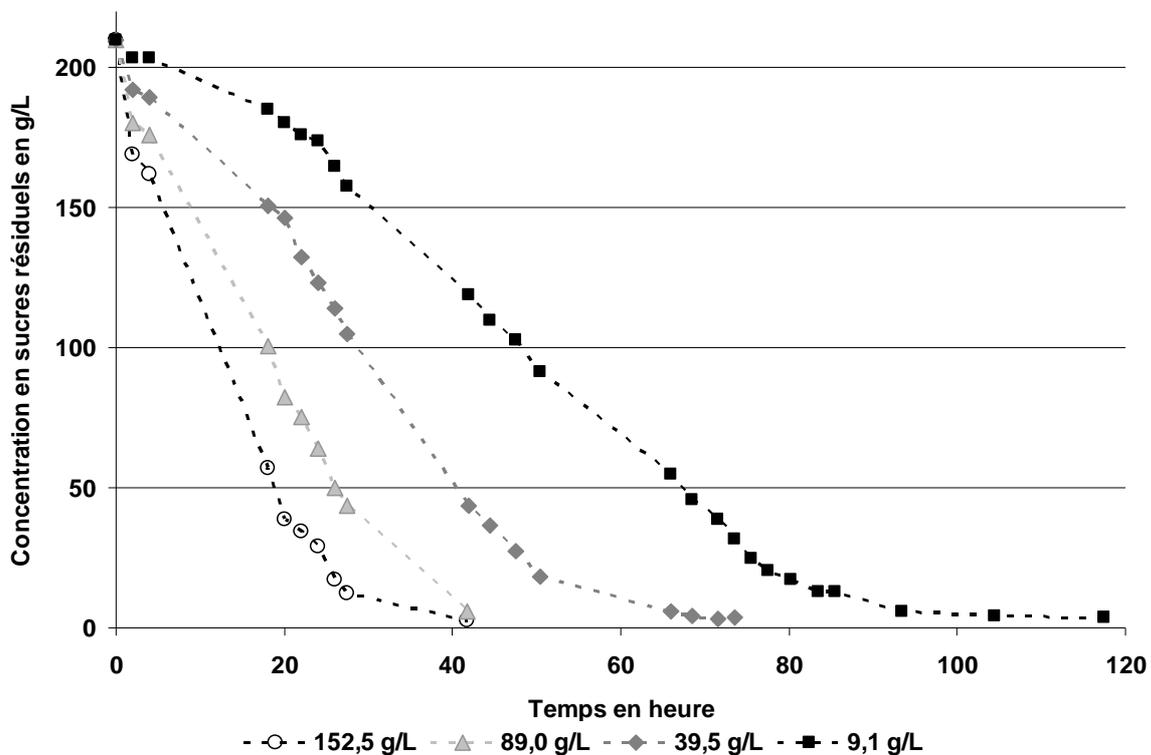


Figure 31 : Cinétiques de fermentation alcoolique obtenues pour différentes concentrations en billes de *S.cerevisiae* lors des essais réalisés en batch sans recyclage du milieu

Les cinétiques de fermentation présentent un profil classique avec néanmoins quelques déviations en début et fin de fermentation.

En début de fermentation, une chute rapide de la concentration en sucres a lieu. Celle-ci, d'autant plus importante que la concentration en billes est grande, ne serait pas une réelle consommation de sucres par la levure mais résulterait du phénomène de diffusion des sucres à l'intérieur des billes d'alginate.

En fin de fermentation, la concentration en sucres n'est pas nulle et reste de l'ordre de  $3 \text{ g.L}^{-1}$ , même après plusieurs heures. Après dosage du Glucose/Fructose par méthode enzymatique, il apparaît que ces sucres ne sont pas fermentescibles. Nous avons évalué la part de ces sucres à  $3\text{-}3,5 \text{ g.L}^{-1}$ .

Quelle que soit la concentration en billes, les cinétiques peuvent être découpées en deux intervalles distincts: une 'phase rapide' de  $210 \text{ g.L}^{-1}$  à  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de sucres, durant laquelle la consommation est rapide (entre  $-3$  et  $-8 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) et une 'phase lente' à partir de  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de sucres où la vitesse est très lente ( $< -1 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ). Ce ralentissement s'explique par une diminution de la disponibilité du substrat d'une part, et par un effet inhibiteur de l'éthanol d'autre part (Casey et al. 1986). Nous constatons également que plus la concentration en billes est importante, plus la cinétique de fermentation est rapide.

Enfin, il est à noter la libération de cellules dans la phase liquide conséquence probable d'une croissance au sein des billes (Tableau 13). Plusieurs auteurs ont également pu observer ce phénomène (Melzoch et al. 1994 ; Gòdia et al. 1985 ; Gòdia et al. 1987). Mais nous rediscuterons ce point par la suite.

Tableau 13 : Population dans la phase liquide en fin de fermentation alcoolique batch sans recyclage du milieu, pour différentes concentrations en billes de *S.cerevisiae*

Concentration de billes en $\text{g.L}^{-1}$ de liquide	Population dans la phase liquide (cellules. $\text{mL}^{-1}$ de liquide)
152,5	$1,7.10^6$
89,0	$1,3.10^6$
39,5	$3,4.10^6$
9,1	$1,9.10^7$

### II.1.2 Evolution des cinétiques au cours de plusieurs cycles

Afin de connaître l'évolution des billes sur un temps d'utilisation assez long, de l'ordre d'une campagne de vendanges, un recyclage des billes a été réalisé. Selon les concentrations, elles ont été utilisées 7 à 10 fois consécutives pour à chaque fois un cycle de fermentation alcoolique complet sans rinçage entre les cycles.

Comme le montrent les graphiques sur la Figure 32 et la Figure 33, les cinétiques s'accroissent au fur et à mesure des cycles de fermentation avant de se stabiliser. Ce phénomène est visible sur la phase rapide de fermentation, quelque soit la concentration en billes dans le milieu. Cette accélération, déjà observé par Kourkoutas et al. (2001) pour *S.cerevisiae* immobilisée sur de la pomme, est plus ou moins marquée en fonction de la population initiale dans la phase liquide. A l'origine de celle-ci se trouve en fait la croissance des levures au sein du support d'immobilisation, leur libération dans le milieu et la croissance de ces levures libérées. Et ce phénomène semble d'autant plus important que la concentration en billes est

faible, probablement du fait d'une plus faible concurrence face aux nutriments pour les faibles concentrations en billes. Cela expliquerait donc également le fait que la stabilisation des cinétiques soit d'autant plus rapide que la concentration en billes est faible.

Une fois les cinétiques de fermentation stabilisées, la durée d'un cycle varie entre 12 h et 45 h en fonction de la concentration en billes dans le milieu (Tableau 14). Nous constatons alors qu'il n'existe pas de linéarité entre temps de fermentation et concentration en billes. Les levures libérées dans la phase liquide ont peut-être un impact non négligeable sur les vitesses de fermentation.

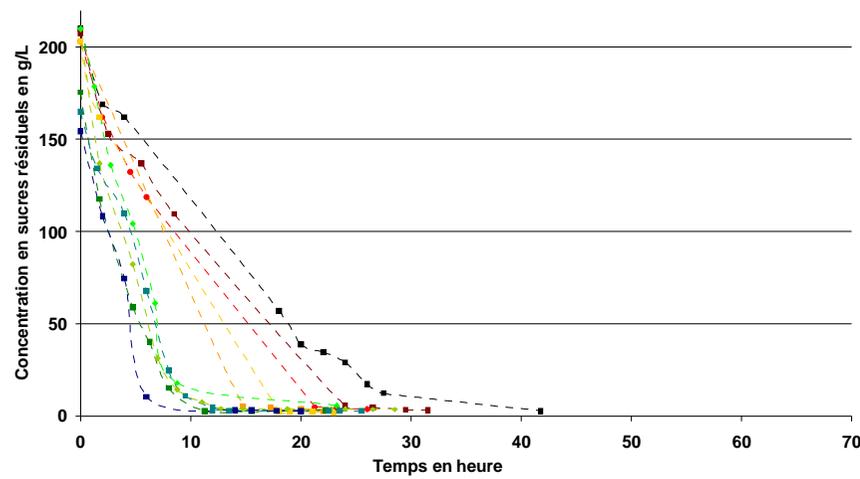
Tableau 14 : Durée moyenne d'un cycle batch après stabilisation des cinétiques de fermentation pour les différentes concentrations en billes de *S.cerevisiae*

<b>Concentration de billes en g.L<sup>-1</sup> de liquide</b>	<b>Temps moyen de fermentation en batch en h</b>
<b>152,5</b>	12
<b>89,0</b>	16
<b>39,5</b>	22
<b>9,1</b>	45

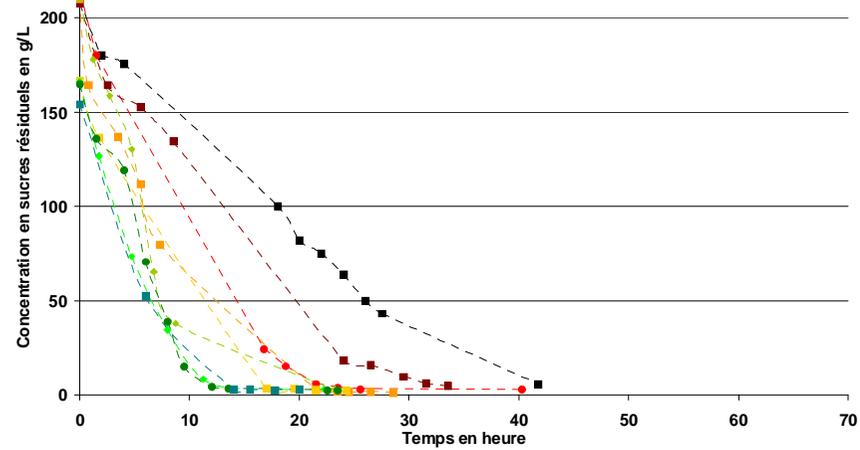
### II.1.3 Evolution de la morphologie des billes

Une autre observation intéressante, mentionnée par plusieurs auteurs (Vives et al. 1993 ; Gòdia et al. 1985, Nagashima et al. 1984), est l'augmentation du diamètre des billes. Alors qu'un facteur multiplicatif de 1,4 avait été mentionné par Vives et al. (1993), nous avons ici des facteurs différents et fonction de la concentration en billes utilisée (Figure 34).

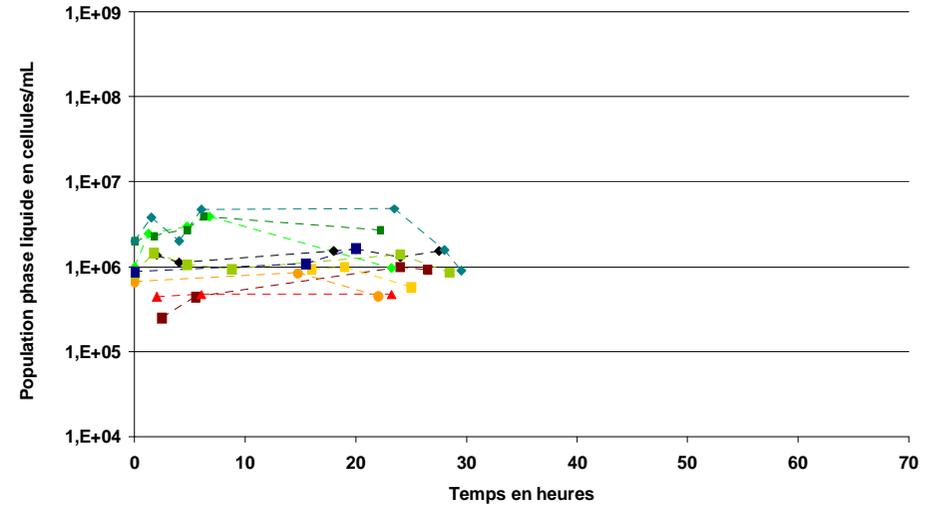
En effet, après l'étape de réhydratation, le diamètre de billes mesuré est de l'ordre de 3 mm. Celui-ci évolue au cours des cycles de fermentation ; et plus la concentration en billes est faible, plus l'augmentation du diamètre est importante. Cette augmentation est plus ou moins progressive mais semble se stabiliser assez rapidement après quelques cycles. Il existerait donc peut-être un parallèle entre 'croissance' des billes, croissance cellulaire et décrochage des cellules.



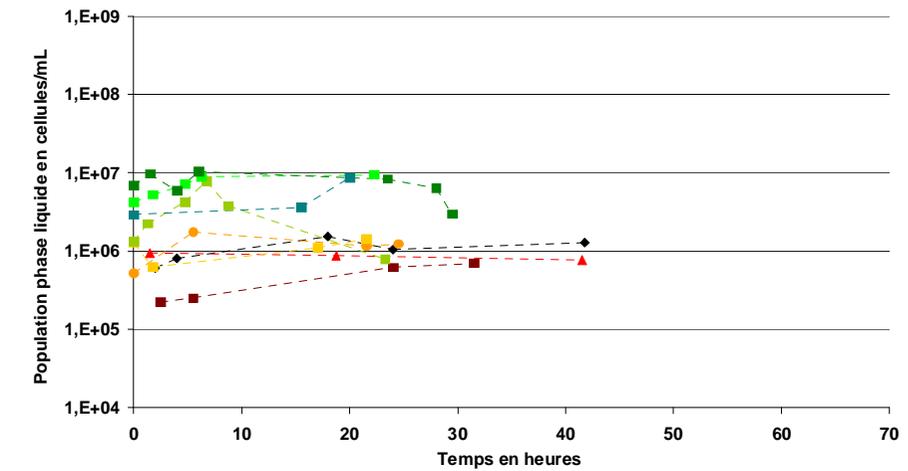
a-  
 - Cycle 1 - Cycle 2 - Cycle 3 - Cycle 4 - Cycle 5  
 - Cycle 6 - Cycle 7 - Cycle 8 - Cycle 9 - Cycle 10



b-  
 - Cycle 1 - Cycle 2 - Cycle 3 - Cycle 4 - Cycle 5  
 - Cycle 6 - Cycle 7 - Cycle 8 - Cycle 9

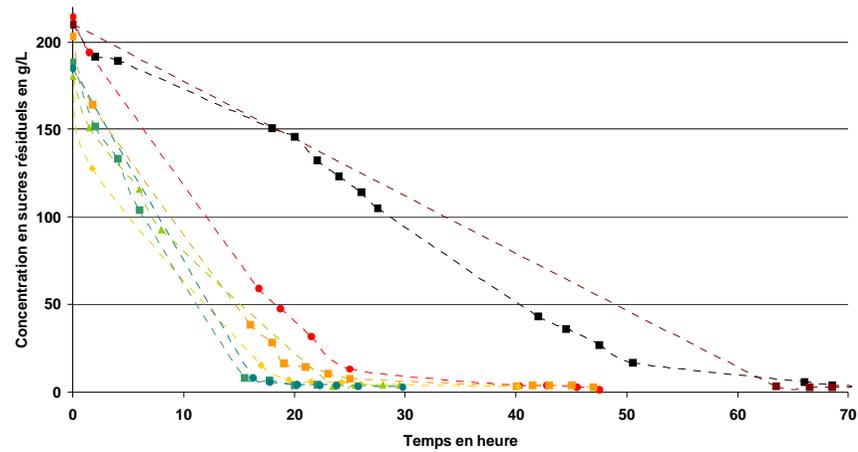


- Cycle 1 - Cycle 2 - Cycle 3 - Cycle 4 - Cycle 5  
 - Cycle 6 - Cycle 7 - Cycle 8 - Cycle 9 - Cycle 10

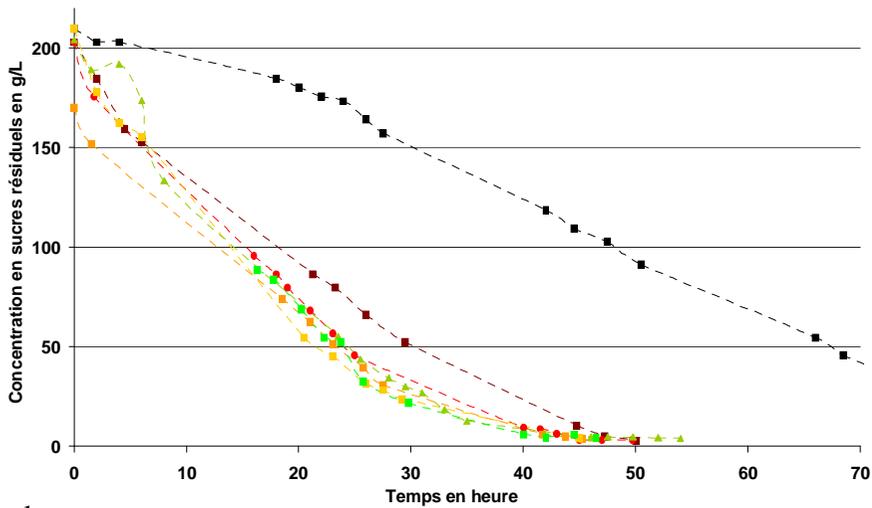


- Cycle 1 - Cycle 2 - Cycle 3 - Cycle 4 - Cycle 5  
 - Cycle 6 - Cycle 7 - Cycle 8 - Cycle 9

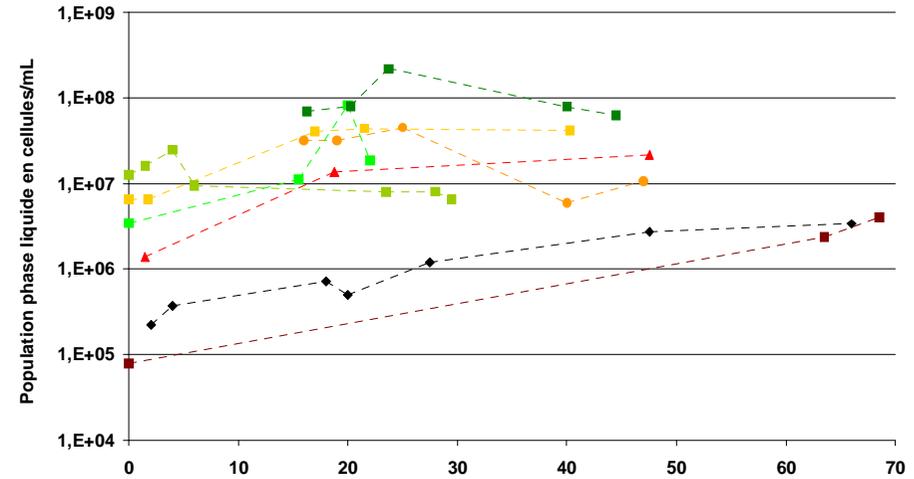
Figure 32 : Evolution des cinétiques de fermentation alcoolique (gauche) et de la population en phase liquide (droite) au cours des recyclages pour des concentrations en billes de *S.cerevisiae* de 152,5 (a-); 89,0 g.L<sup>-1</sup> (b-)



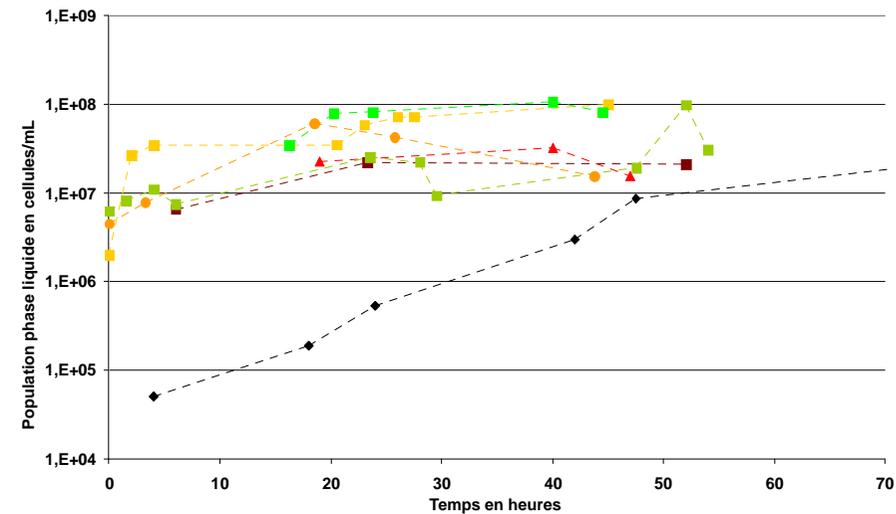
a-   
 -■- Cycle 1 -■- Cycle 2 -●- Cycle 3 -□- Cycle 4 -◇- Cycle 5   
 -▲- Cycle 6 -■- Cycle 7 -●- Cycle 8



b-   
 -■- Cycle 1 -■- Cycle 2 -●- Cycle 3 -□- Cycle 4 -◇- Cycle 5 -▲- Cycle 6 -■- Cycle 7



Temps en heures   
 -◇- Cycle 1 -■- Cycle 2 -▲- Cycle 3 -○- Cycle 4 -□- Cycle 5   
 -■- Cycle 6 -■- Cycle 7 -■- Cycle 8



Temps en heures   
 -◇- Cycle 1 -■- Cycle 2 -▲- Cycle 3 -○- Cycle 4 -□- Cycle 5 -■- Cycle 6 -■- Cycle 7

Figure 33 : Evolution des cinétiques de fermentation alcoolique (gauche) et de la population en phase liquide (droite) au cours des recyclages pour des concentrations en billes de *S.cerevisiae* de 39,5 (a-); 9,1 g.L<sup>-1</sup>(b-)

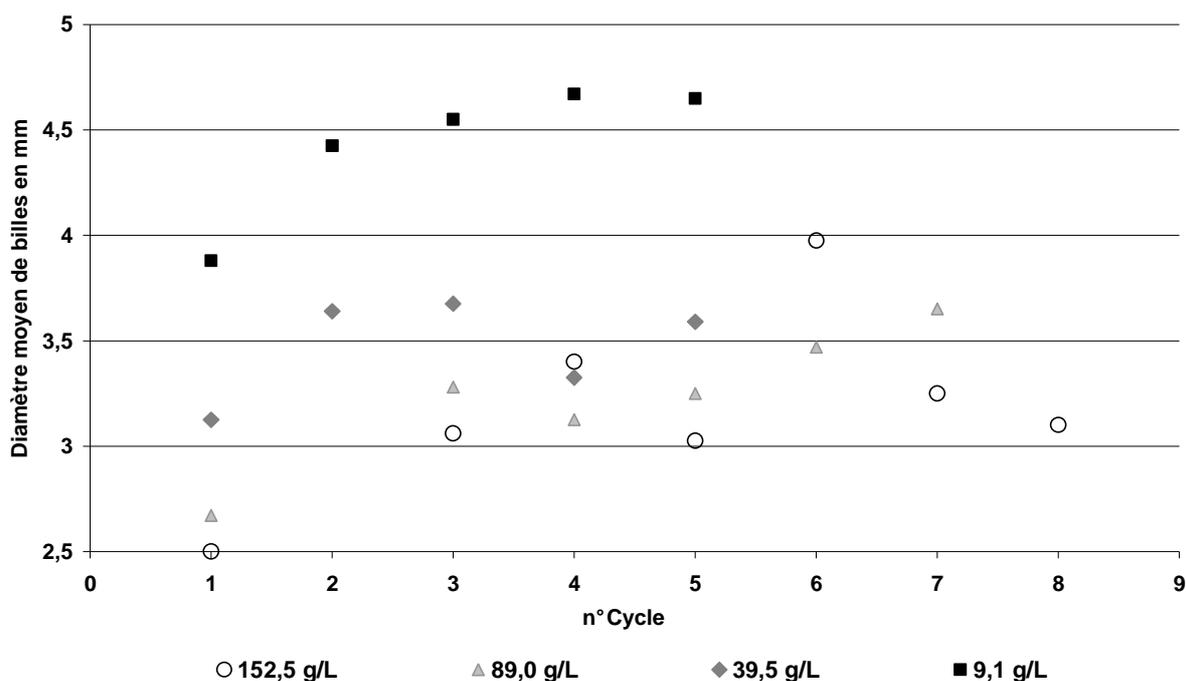


Figure 34 : Evolution du diamètre des billes au cours des recyclages lors des essais batch pour différentes concentrations en billes de *S.cerevisiae*

#### II.1.4 Conclusion

A la suite de ces premiers essais, quelques éléments nous permettent d'orienter notre choix dans la suite de la démarche.

Comme nous l'avons constaté, les vitesses en fin de fermentation sont faibles. Ceci pose donc une première difficulté pour le passage en fonctionnement continu dans un réacteur parfaitement mélangé. En effet, si le produit obtenu en sortie doit être exempt de sucres fermentescibles, il faudra probablement travailler à très faible vitesse, donc avoir un temps de séjour élevé, ce qui pourrait finalement remettre en question l'intérêt du passage en continu. Par exemple, si nous considérons un procédé fonctionnant à une vitesse de consommation en sucres constante de l'ordre de  $-1 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ , le temps de séjour en continu sera de 9 jours. Au niveau industriel, la fermentation en batch se fait déjà en 3 à 5 jours dans certaines caves. Cela implique donc pour la suite du projet de produire un vin dans lequel il restera des sucres fermentescibles. Ces sucres peuvent néanmoins être source de carbone pour des contaminants pouvant apparaître entre la fin de fermentation alcoolique et la fermentation malolactique. Compte tenu de cela, l'une des options qui s'offre à nous est la production d'un vin contenant des sucres résiduels en fin de fermentation alcoolique (environ  $10 \text{ g.L}^{-1}$ ), vin qui devra alors être sulfité dès la fin de fermentation pour éviter toute contamination. Dans ce cas là, la fermentation malolactique ne pourra pas se faire. Il faut donc envisager la réduction de l'acidité avant ou pendant la fermentation alcoolique. Comme cela a été mentionné dans la bibliographie, plusieurs méthodes sont possibles :

- réalisation de la fermentation malolactique en co-inoculation,
- réalisation d'une désacidification du moût (fermentation maloalcoolique par des levures de *Schizosaccharomyces pombe*),
- réalisation d'une désacidification du vin (jus après fermentation alcoolique avec *Saccharomyces cerevisiae*).

Dans notre cas, le plus intéressant serait de proposer un procédé permettant de réunir les deux étapes en une seule ce qui sera développé dans le paragraphe III de ce chapitre.

Le choix de la concentration en billes sera lui aussi déterminant. Entrent en jeu non seulement la vitesse mais également le coût et la stabilité des billes dans le temps. Or, une libération des levures dans le milieu ainsi qu'une 'croissance' des billes plus ou moins conséquentes ont été observées. Ces deux phénomènes qui en eux-mêmes ne semblent pas poser de problèmes majeurs pour la suite, soulèvent tout de même des questions auxquelles il est important de répondre: à quoi est dû le phénomène de libération des cellules en phase liquide et comment se passe-t-il ?, quelles sont les participations respectives de chacune des deux formes, libres ou immobilisées, dans la fermentation ? donc quel est le réel impact de la concentration en billes sur les vitesses de fermentation ? et pourquoi le lien entre temps de fermentation et concentration en billes n'est-il pas proportionnel ?

## II.2. Levures libres versus levures immobilisées

Comme nous venons de le voir, il existe une accélération des cinétiques au cours des cycles de fermentation conséquence très probable de la croissance des levures et de la libération des cellules en phase liquide observée. Afin de confirmer et d'expliquer ces phénomènes, des essais supplémentaires ont été réalisés en se concentrant notamment sur la croissance des levures intra / extra billes et sur le rôle joué par les levures présentes en phase liquide au cours de la fermentation.

Dans un premier temps, des cultures batch en levures libres sont réalisées (Tableau 15). Le choix d'un fort taux d'inoculation a été fait pour limiter la croissance des levures, favoriser la fermentation alcoolique et donc permettre la comparaison avec les levures immobilisées. Ces essais ont été réalisés en triple.

Puis nous avons répété les essais en levures immobilisées pour deux concentrations distinctes (Tableau 16) afin d'effectuer une comparaison entre levures libres et levures immobilisées mais également évaluer si il existe un effet concentration en billes sur l'activité spécifique des levures immobilisées. Pour chaque concentration, deux essais indépendants ont été faits.

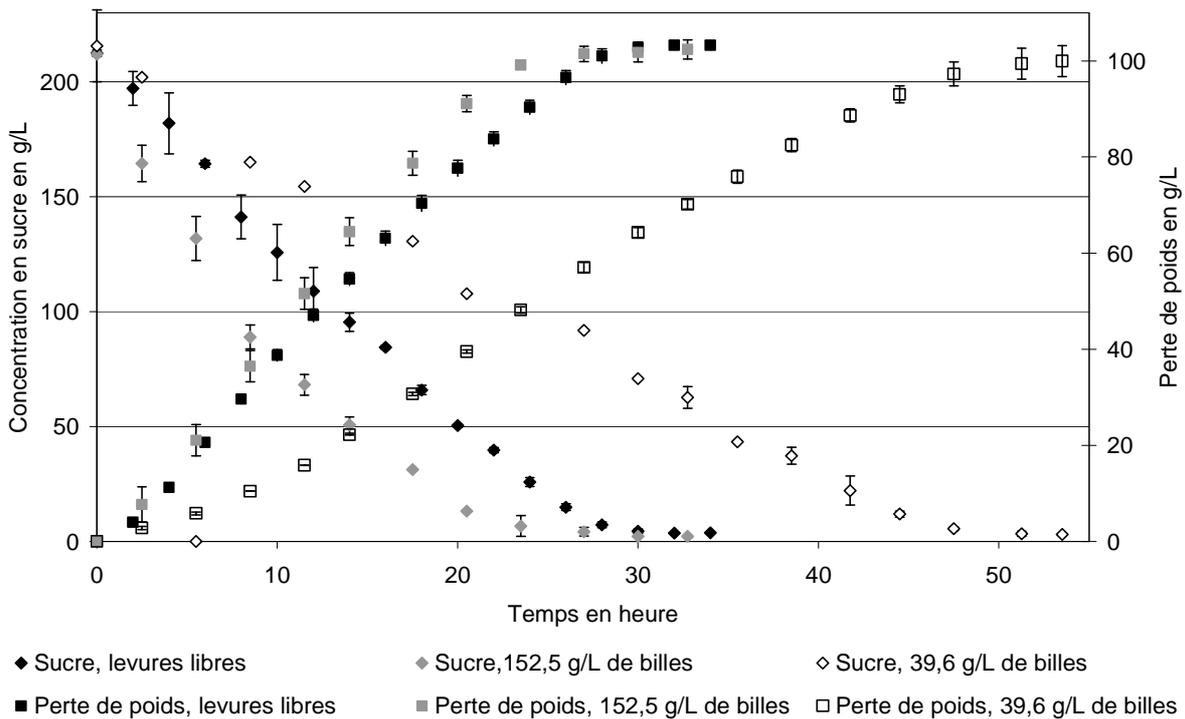
Tableau 15 : Présentation des essais réalisés en levures libres en batch pour le calcul d'activité spécifique

Population théorique dans le jus inoculé (cellules.mL <sup>-1</sup> )
3,81.10 <sup>8</sup>

Tableau 16 : Présentation des essais réalisés en levures immobilisées en batch pour le calcul d'activité spécifique

Concentration en billes <i>S.cerevisiae</i> (g.L <sup>-1</sup> liquide)	Population théorique dans le jus inoculé (cellules.mL <sup>-1</sup> )
152,5	$3,81.10^8$
39,5	$9,89.10^7$

## II.2.1 Cinétiques de fermentation

Figure 35 : Consommation en sucres et production de CO<sub>2</sub> au cours des essais de fermentation en batch en levures libres et levures immobilisées à 152,5 et 39,5 g.L<sup>-1</sup> de billes

Comme lors des essais précédents, les profils cinétiques obtenus sont très semblables et les essais ne diffèrent que par la durée de fermentation (Figure 35).

Pour les essais billes à 152,5 et 39,5 g.L<sup>-1</sup>, bien que la population initiale en levures théorique soit divisée par 3, nous constatons que le temps de fermentation ne fait que doubler. Cela est d'ailleurs remarquable sur le graphique de vitesses de production de CO<sub>2</sub> (Figure 36). En effet, la vitesse maximale atteinte pour 39,5 g.L<sup>-1</sup> est de l'ordre de 3 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> alors qu'elle est de 5 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> pour 152,5 g.L<sup>-1</sup>. Pour expliquer cela, nous avons regardé ce qui se passait au niveau de la biomasse (Tableau 17). Au début de la fermentation, un facteur 5 différencie les deux essais. Mais, une croissance importante a lieu dans le cas de l'essai à 39,5 g.L<sup>-1</sup> alors que la population est maintenue constante dans l'essai à 152,5 g.L<sup>-1</sup>. Un facteur 3 différencie les deux essais en termes de biomasse finale. Il existe donc un lien non proportionnel entre population levurienne et vitesse de fermentation qui ne résulte pas uniquement de la croissance cellulaire mais d'autre chose.

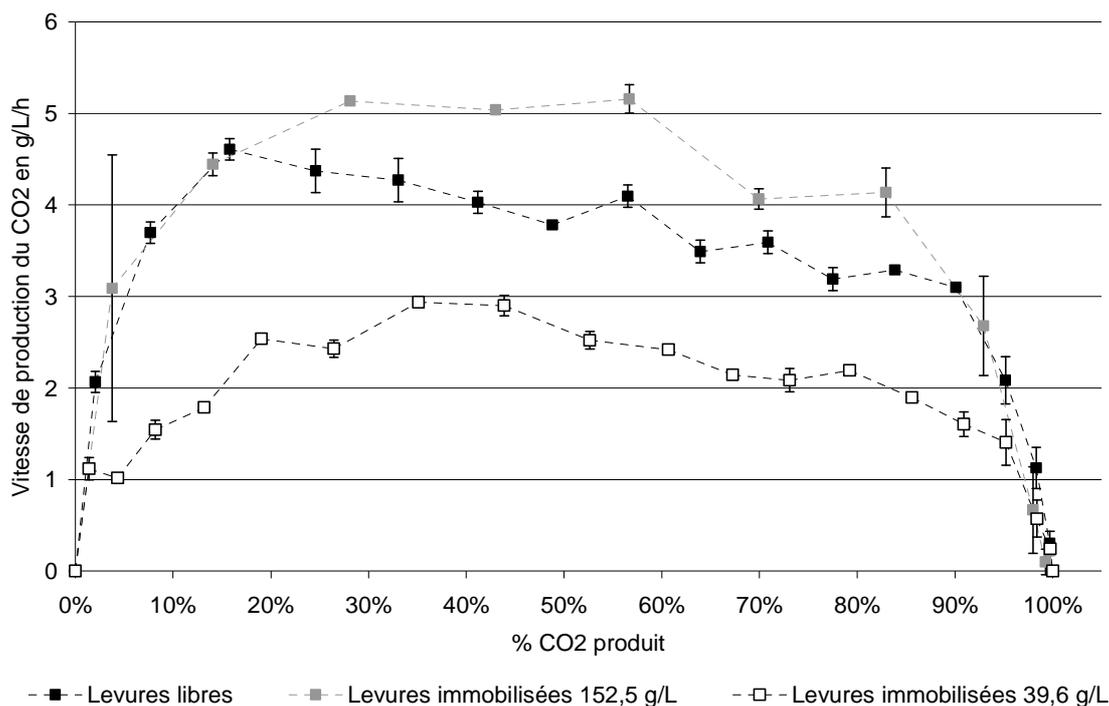


Figure 36 : Vitesse de production de CO<sub>2</sub> au cours des essais de fermentation en batch en levures libres et levures immobilisées à 152,5 et 39,5 g.L<sup>-1</sup> de billes

Si nous regardons maintenant la fermentation en levures libres, nous observons un profil tout à fait semblable à l'essai à 152,5 g.L<sup>-1</sup> de billes, avec des temps de fermentation qui ne diffèrent que de quelques heures. De plus, la vitesse maximale de production de CO<sub>2</sub> atteinte en levures libres est de l'ordre de 4,5 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> c'est à dire presque la même que pour 152,5 g.L<sup>-1</sup> de billes (Figure 36). Pourtant, au niveau de la biomasse, nous avons des populations bien différentes. Et malgré un accroissement moyen (Tableau 17) de 6,2.10<sup>8</sup> cellules.mL<sup>-1</sup> mesuré pour les levures libres, le niveau de biomasse global en levures libres reste toujours inférieur à celui des billes à 152,5 g.L<sup>-1</sup>. Ceci suppose donc une moins bonne activité spécifique des levures immobilisées à 152,5 g.L<sup>-1</sup> par rapport aux levures libres ce que nous allons vérifier par le calcul.

D'autre part, bien que les niveaux de biomasse des essais libres et immobilisées à 39,5 g.L<sup>-1</sup> soient identiques au départ, l'accroissement de la population en cellules libres est bien supérieur. Il est possible qu'une conséquence directe de l'immobilisation soit, comme mentionné dans la littérature, une limitation de la croissance. Un des mécanismes supposé à l'origine de ce phénomène a été proposé par Doran et Bailey (1986). Selon eux, l'immobilisation des cellules limiterait leur capacité à bourgeonner et donc leur croissance au sein de la matrice. L'encombrement stérique ou encore le 'quorum sensing' pourraient également expliquer ce phénomène.

Une dernière remarque intéressante est qu'une fois le maximum atteint, la vitesse de production de CO<sub>2</sub> diminue progressivement, très probablement du fait de l'effet inhibiteur de l'éthanol. Ce phénomène, visible pour les trois essais, apparaît dès 20 % de CO<sub>2</sub> produit pour les levures libres alors qu'il n'apparaît qu'autour de 30 % pour les deux essais en levures immobilisées. Par conséquent, nous supposons que l'effet inhibiteur de l'éthanol existant en

levures libres n'est visible que plus tardivement en levures immobilisées grâce à l'effet protecteur du support. En effet, plusieurs études mentionnent le rôle positif de l'immobilisation sur une matrice type gel (Norton et al. 1995; Puligundla et al. 2011). De plus, il a été observé que les supports à base de calcium présentent un effet protecteur plus marqué, très probablement de par l'influence positive des ions calcium sur la tolérance à l'éthanol (Ciesarová et al. 1996; Ciesarová et al. 1998; Nabais et al. 1988).

Tableau 17 : Evolution des populations au cours de la fermentation en batch pour les essais en levures libres et levures immobilisées à 152,5 et 39,5 g.L<sup>-1</sup> de billes

	Levures libres	Levures immobilisées 152,5 g.L <sup>-1</sup>		Levures immobilisées 39,5 g.L <sup>-1</sup>	
		Levures billes	Levures libérées	Levures billes	Levures libérées
Population initiale en cellules.mL <sup>-1</sup>	3,79.10 <sup>8</sup>	≈1,46.10 <sup>9</sup>	7,18.10 <sup>5</sup> *	≈3.10 <sup>8</sup>	2,15.10 <sup>6</sup> *
Biomasse initiale en g.L <sup>-1</sup>	6,93				20
Viabilité en %	100	100	10	100	
Population finale en cellules.mL <sup>-1</sup>	9,98.10 <sup>8</sup>	≈1,46.10 <sup>9</sup>	2,85.10 <sup>6</sup>	≈4,5.10 <sup>8</sup>	8,44.10 <sup>6</sup>
Biomasse finale en g.L <sup>-1</sup>	18,25				
Viabilité en %	100	100	10	100	20
Accroissement en cellules.mL <sup>-1</sup>	6,19.10 <sup>8</sup>	0	2,13.10 <sup>6</sup>	≈1,5.10 <sup>8</sup>	2,29.10 <sup>6</sup>
Accroissement en g.L <sup>-1</sup>	11,32				

\* Les levures libérées dans la phase liquide dénombrées en début de fermentation proviennent uniquement de l'étape de réhydratation des billes.

## II.2.2 Bilan matière

Avant de calculer les activités spécifiques, nous avons vérifié les bilans matières sur les 3 fermentations. Nous nous sommes également attachés au calcul des différents rendements produits. En effet, du fait des écarts dans les accroissements de biomasse, une utilisation des sucres différente devrait être notée. D'autre part, l'influence de l'immobilisation sur le métabolisme des levures est souvent mentionnée dans la littérature. Généralement ces modifications consistent en une diminution des rendements produits pour les levures immobilisées. Certains auteurs (Doran et Bailey 1986 ; Galazzo et Bailey 1990 ; Jirků et al. 2000) montrent une activation du métabolisme énergétique et une augmentation dans les polysaccharides de stockage et de structure. Hilge-Rotmann et Rehm (1990), quant à eux, constatent une augmentation du rendement en éthanol au détriment du rendement en CO<sub>2</sub>.

Le calcul du bilan matière a été réalisé suivant l'équation (2) :

$$\text{Bilan matière} = 100 * \frac{S - E - CO_2 - X - G}{S} \quad (2)$$

S: sucres consommés en g.L<sup>-1</sup>; E, CO<sub>2</sub>, X, G: respectivement éthanol, dioxyde de carbone, biomasse, glycérol produit en g.L<sup>-1</sup>.

Les rendements Y<sub>ES</sub>, Y<sub>CO<sub>2</sub>S</sub>, Y<sub>XS</sub>, Y<sub>GS</sub>, exprimés en %, sont définis comme le ratio de, respectivement, E, CO<sub>2</sub>, X, G en g.L<sup>-1</sup> sur S en g.L<sup>-1</sup>.

Que ce soit pour le calcul du bilan matière ou des rendements, toutes les valeurs sont prises en fin de fermentation.

Tableau 18 : Présentation du bilan matière pour les essais batch en levures libres et en levures immobilisées à 152,5 et 39,5 g.L<sup>-1</sup> de billes

Substrats/Produits	Levures libres <sup>(1)</sup>	Levures immobilisées à 152,5 g.L <sup>-1</sup> <sup>(2)</sup>	Levures immobilisées à 39,5 g.L <sup>-1</sup> <sup>(2)</sup>
S en g.L <sup>-1</sup>	207,93 ± 1,80	200,00 ± 14,14	212,67 ± 16,12
E en g.L <sup>-1</sup>	92,84 ± 1,64	87,58 ± 0,00	97,40 ± 0,28
CO <sub>2</sub> en g.L <sup>-1</sup>	103,67 ± 0,95	103,87 ± 2,01	101,45 ± 3,22
X en g.L <sup>-1</sup>	10,98 ± 0,70	0,03 ± 0,01 *	2,94 ± 0,00 *
G en g.L <sup>-1</sup>	3,93 ± 0,01	3,67 ± 0,02	3,67 ± 0,16
Bilan en g.L <sup>-1</sup>	-3,50 ± 5,09	4,85 ± 16,18	7,21 ± 19,79
Bilan en %	101,67 ± 1,59	97,78 ± 5,89	96,94 ± 8,66

<sup>(1)</sup> Essais réalisés en triple ; <sup>(2)</sup> Essais réalisés en double.

\* Dans le cas des levures immobilisées, la biomasse exprimée en g.L<sup>-1</sup> a été calculée en considérant un poids sec identique aux levures libres, c'est-à-dire en considérant que 6,19.10<sup>8</sup> cellules.mL<sup>-1</sup> pesaient 11,32 g.L<sup>-1</sup>.

Pour tous les essais, le calcul du bilan matière (Tableau 18) montre que la totalité du sucre est utilisée pour la production d'éthanol, de dioxyde de carbone, de biomasse et de glycérol. Les autres produits secondaires tels que l'acide acétique ou succinique, par exemple, peuvent être négligés. Cependant, en calculant les rendements de petites différences apparaissent comme présenté dans le tableau ci-dessous (Tableau 19). Pour les levures libres, plus de sucre est consacré à la production de biomasse alors que dans l'essai à 152,5 g.L<sup>-1</sup> de billes, ce sucre se retrouve dans la production de CO<sub>2</sub>. En effet, si nous nous attachons au ratio Ethanol/CO<sub>2</sub>, nous constatons que pour une même quantité d'éthanol produit, plus de CO<sub>2</sub> est produit dans l'essai à 152,5 g.L<sup>-1</sup> de billes, alors qu'aucune production de biomasse n'est notée. L'essai à 39,5 g.L<sup>-1</sup> de billes, quant à lui, peut être considéré comme intermédiaire.

Au niveau de l'éthanol et du glycérol, des rendements sensiblement similaires sont observés ce qui est en opposition avec certaines valeurs mentionnées dans la littérature. En effet, Doran et Bailey 1986 ont obtenu en levures immobilisées des rendements plus faibles pour chacun de ces composés. Néanmoins, dans leur cas, les bilans matière n'ont pas été vérifiés ce qui pourrait expliquer ces différences.

Tableau 19 : Présentation des rendements produits  $Y_{PS}$  pour les essais batch en levures libres et en levures immobilisées à 152,5 et 39,5 g.L<sup>-1</sup> de billes

	Levures libres <sup>(1)</sup>	Levures immobilisées à 152,5 g.L <sup>-1</sup> <sup>(2)</sup>	Levures immobilisées à 39,5 g.L <sup>-1</sup> <sup>(2)</sup>
$Y_{ES}$ en %	44,66 ± 1,07	43,90 ± 3,10	45,93 ± 3,35
$Y_{XS}$ en %	5,28 ± 0,30	0,02 ± 0,01	1,39 ± 0,10
$Y_{CO_2S}$ en %	49,86 ± 0,82	52,03 ± 2,67	47,90 ± 5,15
$Y_{GS}$ en %	1,87 ± 0,02	1,84 ± 0,12	1,73 ± 0,06
Ethanol/CO <sub>2</sub>	0,90 ± 0,01	0,84 ± 0,02	0,96 ± 0,03

<sup>(1)</sup> Essais réalisés en triple ; <sup>(2)</sup> Essais réalisés en double.

Suite à nos observations, nous nous sommes donc intéressés aux différentes voies métaboliques permettant la production de CO<sub>2</sub>.

L'équation de la fermentation alcoolique est la suivante :



donc la quantité de CO<sub>2</sub> produit par formation d'éthanol s'exprime comme (3) :

$$[CO_2]_{Ethanol} = \frac{M_{CO_2}}{M_{C_2H_6O}} [C_2H_6O] = \frac{44}{46} [C_2H_6O] \quad (3)$$

D'après les travaux de Serra (2004), en condition de croissance levurienne sur mélasse, le saccharose est utilisé suivant l'équation ci-dessous :



Les rendements  $Y_{XS}$  et  $Y_{CO_2S}$  en condition de croissance sont donc de 0,51 g<sub>Biomasse</sub>·g<sup>-1</sup><sub>Sucres</sub> et 0,53 g<sub>CO<sub>2</sub></sub>·g<sup>-1</sup><sub>Sucres</sub> respectivement. Et le rendement  $Y_{CO_2X}$  est de 1,05 g<sub>CO<sub>2</sub></sub>·g<sup>-1</sup><sub>Biomasse</sub>. Nous pouvons ainsi calculer la part de CO<sub>2</sub> provenant de la formation de biomasse et celui provenant de l'éthanol (Tableau 20).

Tableau 20 : % de CO<sub>2</sub> en provenance des différentes voies métaboliques pour les essais batch en levures libres et en levures immobilisées à 152,5 et 39,5 g.L<sup>-1</sup>

	Levures libres <sup>(1)</sup>	Levures immobilisées à 152,5 g.L <sup>-1</sup> <sup>(2)</sup>	Levures immobilisées à 39,5 g.L <sup>-1</sup> <sup>(2)</sup>
CO <sub>2</sub> Ethanol en %			
CO <sub>2</sub> total	85,65 ± 0,74	80,67 ± 1,56	91,88 ± 3,19
CO <sub>2</sub> Biomasse en %			
% CO <sub>2</sub> total	11,13 ± 0,80	0,03 ± 0,01	3,05 ± 0,10
CO <sub>2</sub> Autre en %			
CO <sub>2</sub> total	3,22 ± 0,35	19,30 ± 1,55	5,07 ± 3,28

<sup>(1)</sup> Essais réalisés en triple ; <sup>(2)</sup> Essais réalisés en double.

D'après le Tableau 20, nous constatons que 19,3 % du CO<sub>2</sub> produit en levures immobilisées à 152,5 g.L<sup>-1</sup> de billes ne fait pas appel à une voie métabolique classique contre seulement 5,1 % à 39,5 g.L<sup>-1</sup> de billes et 3,2 % en levures libres. Ce CO<sub>2</sub> autre, que nous supposons

provenir de la maintenance cellulaire traduirait donc un état physiologique plus demandeur d'énergie pour les levures immobilisées puisque ramené à la biomasse, 0,77 g de CO<sub>2</sub> autre par g de biomasse sont produits contre 0,19 g par g en levures libres. Cela pourrait en partie expliquer pourquoi le lien entre concentration en billes et vitesse de fermentation n'est pas proportionnel.

### II.2.3 Activité spécifique

A partir des cinétiques ci-dessus, nous avons ensuite calculé l'activité spécifique des levures libres et des levures immobilisées, l'objectif étant ensuite de déterminer l'impact des levures libérées en phase liquide sur la fermentation alcoolique et de vérifier l'effet concentration sur l'activité spécifique des billes :

$$\frac{\Delta CO_2}{X\Delta t} = \frac{\Delta CO_2}{X} = \frac{CO_{2(t+\Delta t)} - CO_{2(t)}}{\frac{X_{(t)} + X_{(t+\Delta t)}}{2}} \quad (4)$$

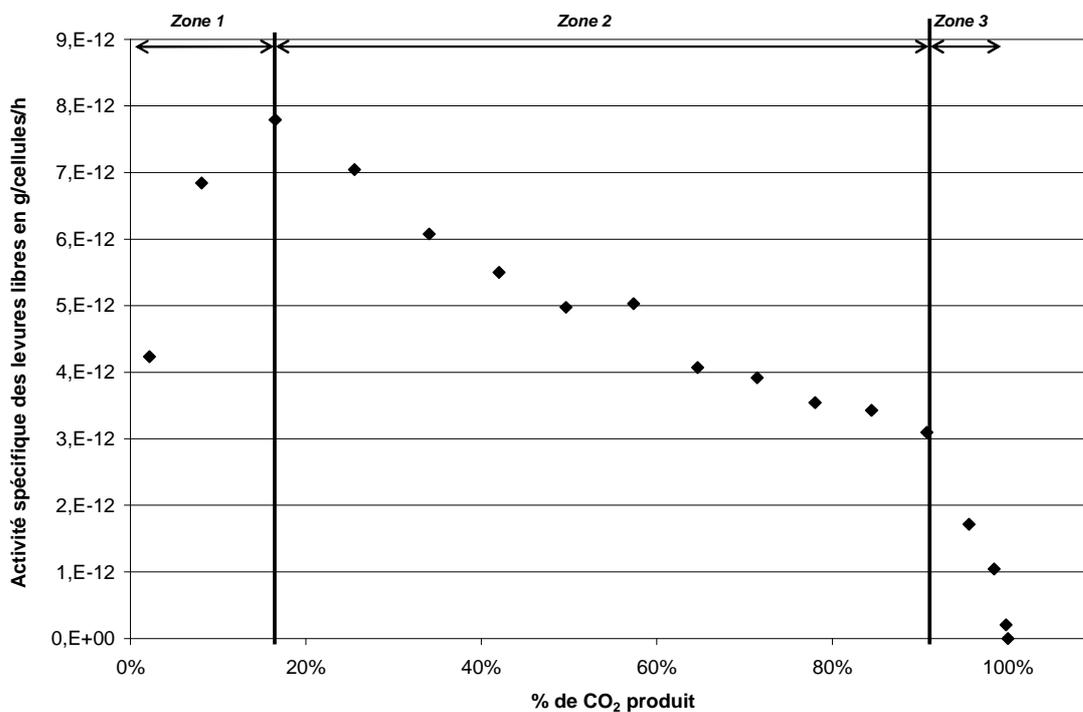


Figure 37 : Profil de l'activité spécifique des levures libres au cours de la fermentation en batch

En levures libres, l'activité spécifique (Figure 37) semble se découper en 3 zones pseudo linéaires. Après l'atteinte rapide du maximum d'activité de l'ordre de  $8 \cdot 10^{-12}$  g.cellules<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> autour de 20 % de CO<sub>2</sub> produit, celle-ci décroît progressivement jusqu'à environ 90 % de CO<sub>2</sub> produit puis brusquement jusqu'à la fin de la réaction. La première décroissance semble traduire le ralentissement provoqué par l'effet inhibiteur de l'éthanol produit. La seconde beaucoup plus brusque vient très probablement de l'épuisement du milieu en sucres conjugué à l'atteinte de la limite d'inhibition par l'éthanol.

Pour le calcul de l'activité spécifique des levures immobilisées, l'activité des levures libres a été retranchée à l'activité globale, suivant l'équation (5).

$$\frac{\Delta CO_2}{X_{\text{immobilisées}} \Delta t} = \frac{\frac{\Delta CO_2}{\Delta t} - X_{\text{libérées}} \times \frac{\Delta CO_2}{X_{\text{libérées}} \Delta t}}{X_{\text{immobilisées}}} \quad (5)$$

L'hypothèse principale faite pour ce calcul est de considérer l'activité spécifique des levures libres constante, même en présence de levures immobilisées.

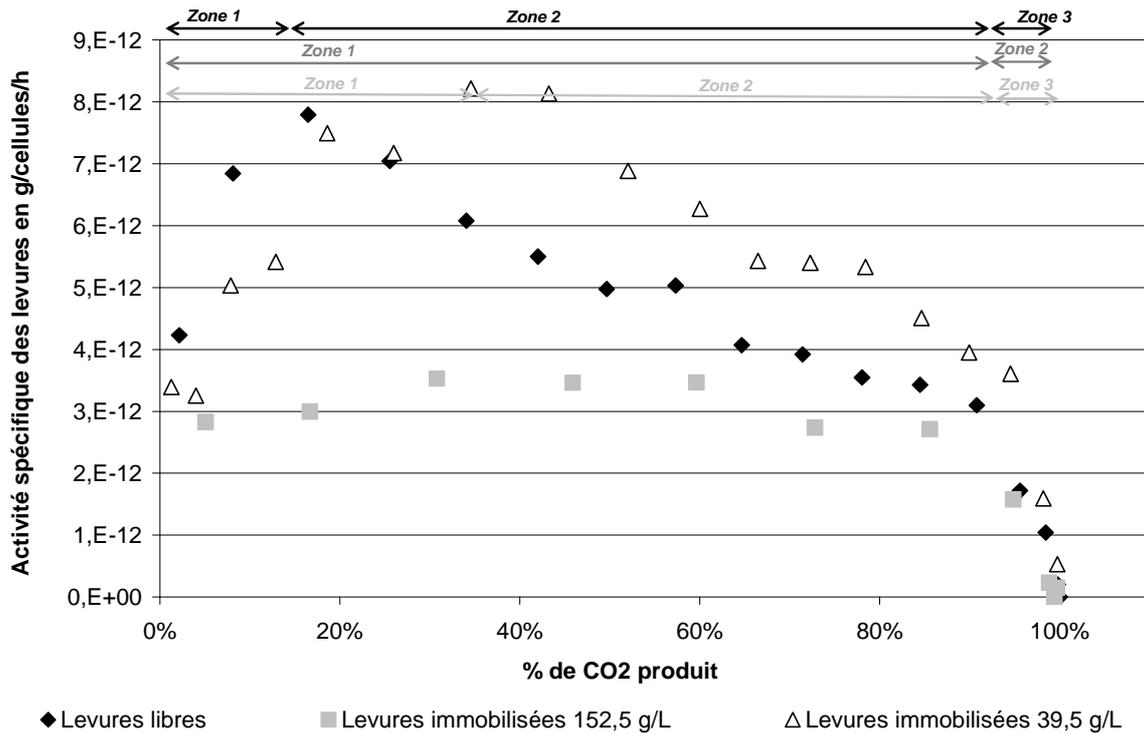


Figure 38 : Profils des activités spécifiques des 3 systèmes (levures libres et levures immobilisées à 152,5 et 39,5 g.L<sup>-1</sup> de billes) au cours de la fermentation en batch

Pour 39,5 g.L<sup>-1</sup> de billes, l'activité spécifique (Figure 38) présente un profil très semblable à celui obtenu en levures libres : une première zone à activité croissante, une valeur maximale de  $9 \cdot 10^{-12}$  g.cellules<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, une deuxième zone de décroissance et finalement une brusque chute en fin de fermentation. La petite différence entre les deux est le moment où la valeur d'activité maximale est atteinte : après 20 % de CO<sub>2</sub> produit pour les levures libres contre 40 % pour les billes à faible concentration. Comme cela a été mentionné précédemment, ce phénomène renforce l'hypothèse d'un effet protecteur de la matrice d'alginate face à l'inhibition par l'éthanol.

Au contraire, le profil obtenu pour 152,5 g.L<sup>-1</sup> de billes (Figure 38) est totalement différent. Seulement deux zones sont identifiables. Du début de la fermentation jusqu'à 90 % du CO<sub>2</sub> produit, une activité constante de l'ordre  $3,5 \cdot 10^{-12}$  g.cellules<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> est obtenue alors que de 90 % à 100 %, comme en levures libres la même chute de l'activité est visible. Donc, comme ci-avant, la limitation en sucres associée à l'inhibition par l'éthanol provoque la soudaine chute d'activité spécifique. En se concentrant sur la première zone, il semble que l'activité

spécifique soit limitée à une certaine valeur, inférieure à celle des autres essais. En effet, dès le début, le maximum est atteint et maintenu pendant 90 % de la fermentation.

Ainsi donc, grâce aux profils d'activité spécifique, nous voyons bien que l'immobilisation n'a pas d'effet direct sur l'activité des levures puisqu'à faible concentration en billes le profil est sensiblement le même qu'en levures libres. Au contraire, la concentration en billes en a un. Et ceci explicite notamment pourquoi certains auteurs (Vives et al. 1993, Daugulis et Swaine, 1987, Monbouquette et al. 1990) ont reporté une activité spécifique en levures immobilisées similaires à celles des levures libres et pourquoi d'autres (Doran et Bailey 1986, Galazzo et Bailey 1990, Ruggeri et al. 1992) ont montré l'inverse.

#### II.2.4 Mécanismes de saturation de l'activité des levures immobilisées

Pour tenter d'expliquer le phénomène de saturation de l'activité spécifique à haute concentration, plusieurs hypothèses ont été faites.

La première hypothèse est l'existence d'une limitation du transfert de masse dans les billes. Cependant, comme nous l'avons vu précédemment, seule la forte concentration en billes présente le phénomène de saturation ; les profils obtenues en levures libres et à faible concentration en billes sont similaires. Si une limitation du transfert de masse était impliquée, nous aurions dû le noter pour les deux essais en billes, ce qui n'est pas le cas. De plus, plusieurs auteurs (Ruggeri et al. 1992, Willaert et Baron 1993) ont montré que la vitesse de diffusion dans des systèmes similaires de levures immobilisées dans de l'alginate de calcium, était plus rapide que la vitesse de fermentation ; dans leur cas, aucune limitation de transfert de masse n'a été observée.

Une deuxième hypothèse avancée est une activité hétérogène fonction de la position de la levure au sein des billes résultat d'une compétition nutritive.

Comme nous l'avons vu lors des premiers essais, le diamètre de bille évolue au cours de la fermentation. A plus faible concentration, les billes voient leur diamètre augmenter davantage par rapport aux fortes concentrations. La répartition des levures au sein de la bille doit donc également changer. Nous avons réalisé des observations au microscope à épifluorescence afin d'évaluer la répartition des levures dans les billes en fin de fermentation.

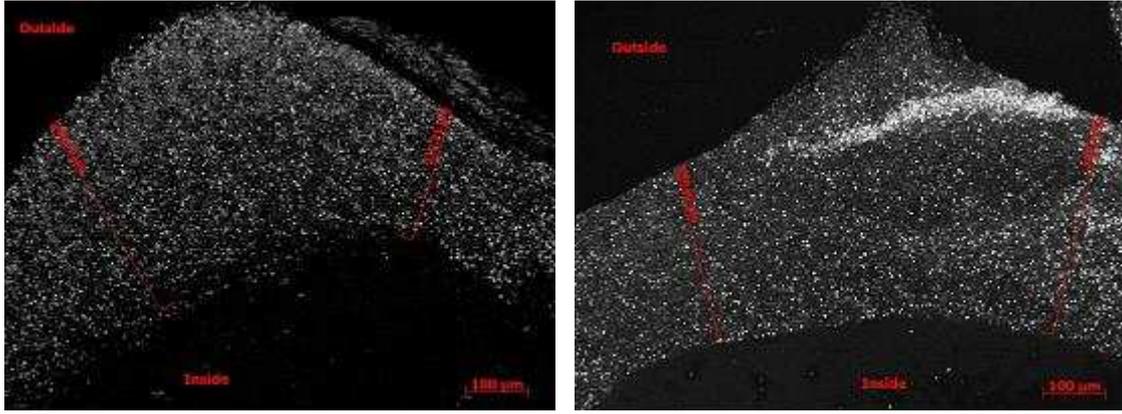


Figure 39 : Observation de la couche externe des billes en fin de fermentation par microscopie à épifluorescence sur une coupe transversale de bille (à gauche pour l'essai à 39,5 g.L<sup>-1</sup> ; à droite pour l'essai à 152,5 g.L<sup>-1</sup>)

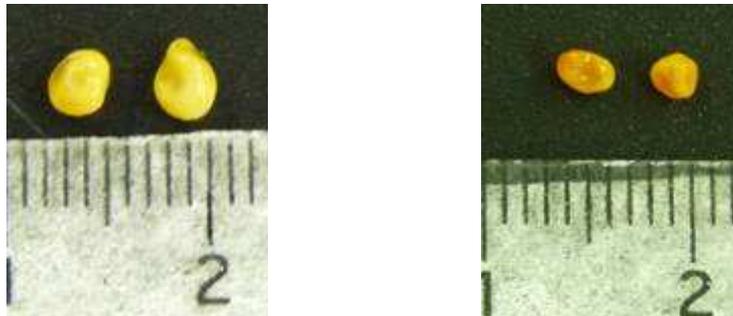


Figure 40 : Photos des billes en fin de fermentation (à gauche pour l'essai à 39,5 g.L<sup>-1</sup> ; à droite pour l'essai à 152,5 g.L<sup>-1</sup>)

Grâce à ces observations (Figure 39), nous avons noté une colonisation différenciée des billes avec une croissance plus importante dans une couche externe de la bille comme cela avait été mentionné par plusieurs auteurs (Vives et al. 1993 ; Gòdia et al. 1985 ; Gòdia et al. 1987 ; Nagashima et al. 1984). L'épaisseur de cette couche externe est la même quelle que soit la concentration en billes utilisée, elle mesure environ 300 à 350 µm. Néanmoins, les diamètres de billes en fin de fermentation (Figure 40) montrent une grande différence en fonction de la concentration en billes. Ainsi, le diamètre moyen des billes en fin de fermentation est de 2,5 mm pour l'essai à 152,5 g.L<sup>-1</sup> de billes contre 3,2 mm pour l'essai à 39,5 g.L<sup>-1</sup>. Sachant que la population viable mesurée dans chaque bille est la même quelque soit la concentration en billes, la répartition des levures dans la bille n'est donc pas identique. Les levures sont davantage compactées dans l'essai à 152,5 g.L<sup>-1</sup> que dans l'essai à 39,5 g.L<sup>-1</sup>, les levures n'ont donc pas le même accès au substrat. Comme la limitation de l'activité spécifique n'a été notée que pour une forte concentration en billes, nous pouvons faire l'hypothèse d'une compétition nutritionnelle conséquence d'une population levurienne trop importante.

Finalement, en reprenant l'ensemble de nos observations, travailler à forte concentration en levures augmenterait la cinétique globale de fermentation. A un certain point, cette vitesse surpasserait la vitesse de diffusion dans les billes engendrant un manque de substrat au sein de la bille. Dans le même sens, l'analyse du ratio Ethanol/Carbone a montré que dans l'essai à forte concentration en billes, les besoins en maintenance étaient plus importants ; globalement

les levures étaient dans ce cas là plus stressées. Cette observation appuie donc l'hypothèse d'une limitation locale résultant d'une compétition nutritive entre les levures. Cela explique aussi pourquoi la relation entre concentration en billes et vitesses de fermentation n'est pas proportionnelle et met en évidence l'existence d'une concentration optimale proche de 39,5 g.L<sup>-1</sup>.

## II.2.5 Conclusion

Grâce à l'étude de l'activité spécifique des levures libres et immobilisées, plusieurs points importants ont été démontrés.

Tout d'abord, nous avons constaté que l'immobilisation des levures n'avait d'impact métabolique que sur la croissance de la biomasse. Celle-ci est, dans le cas des levures immobilisées, plus limitée qu'en levures libres, ce qui dans notre cas n'est pas important. Nous avons également observé une certaine protection des levures immobilisées face à l'effet inhibiteur de l'éthanol. Enfin, nous avons montré qu'au delà d'un certain point, une compétition nutritive entre les levures a lieu. Dans ces conditions, l'activité spécifique des levures au sein de la bille n'est plus homogène et la moyenne devient bien inférieure à celle des levures libres.

## II.3 Détachement cellulaire, croissance et viabilité

Même si nous avons montré que les levures planctoniques avaient une participation négligeable, nous n'avons pas élucidé le fait que le détachement cellulaire est d'autant plus faible que la concentration en billes est forte.

Afin de comprendre ce phénomène et le comportement de la bille, nous avons suivi, au cours des cycles de fermentation et pour chaque concentration en billes, la population dans la phase liquide et sa viabilité.

Pour les quatre concentrations, les résultats sont présentés ci-dessous.

Nous retrouvons les premières observations faites précédemment, à savoir :

- la libération des cellules dans le milieu est d'autant plus importante que la concentration en billes est faible ;
- la population en phase liquide augmente avec les cycles de fermentation.

La nouveauté concerne la viabilité cellulaire. En effet, nous constatons que la viabilité des cellules planctoniques est d'autant plus élevée que la concentration en billes est faible.

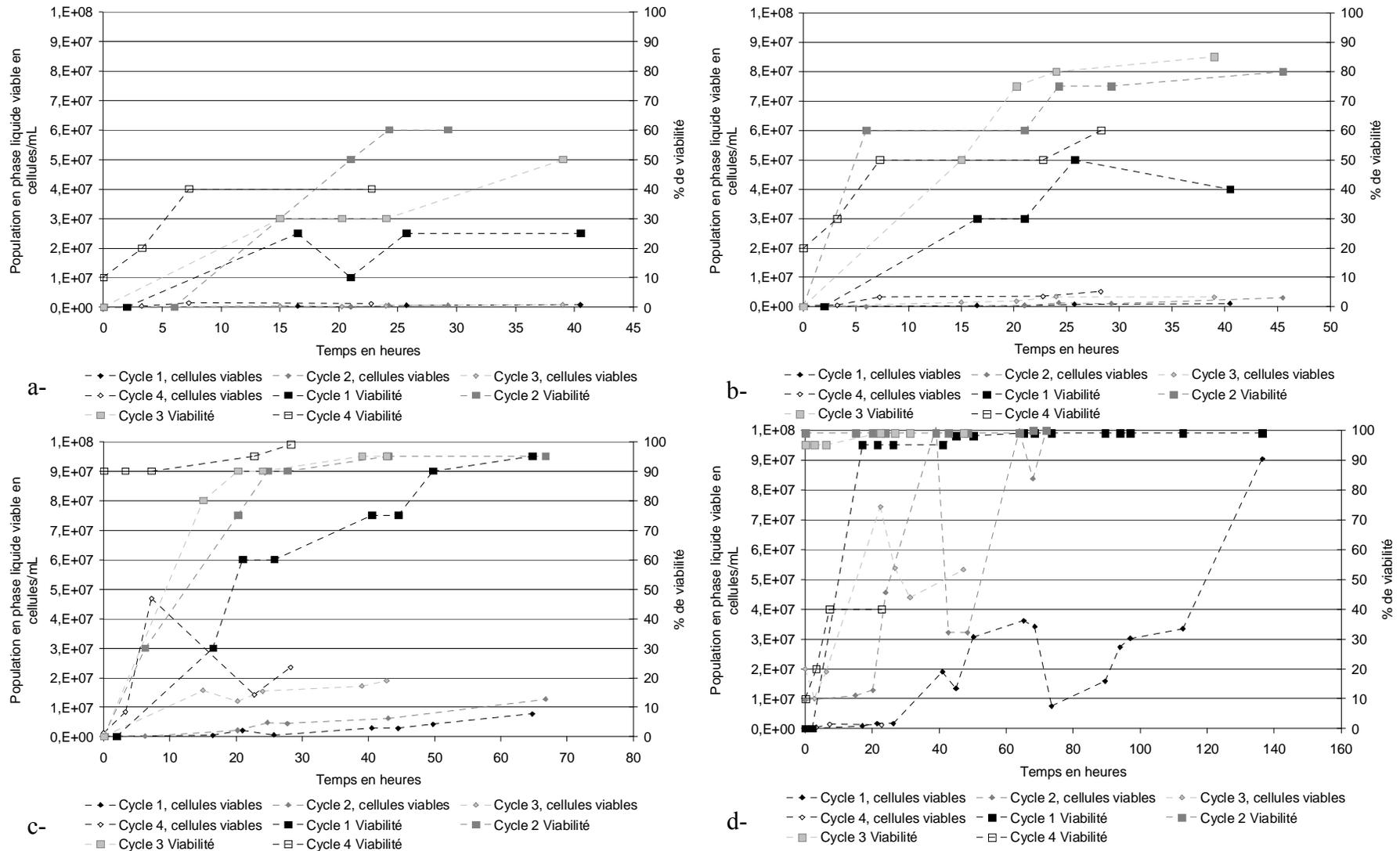


Figure 41 : Evolution de la population levurienne libre et de sa viabilité au cours des recyclages pour les quatre concentrations en billes de *S.cerevisiae* : a- 152,5 g.L<sup>-1</sup>; b- 89,0 g.L<sup>-1</sup>; c- 39,5 g.L<sup>-1</sup>; d- 9,1 g.L<sup>-1</sup>

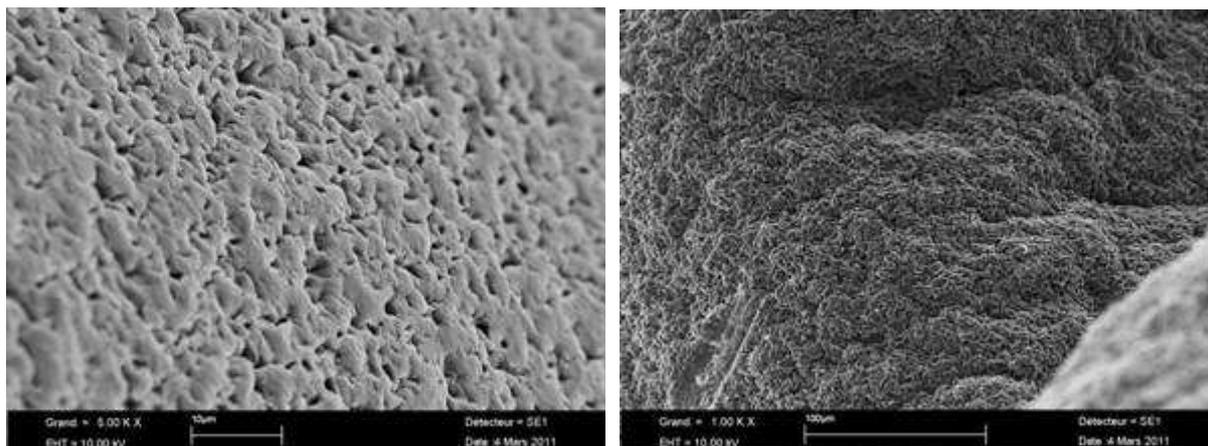


Figure 42 : Observation de la couche externe des billes de *S.cerevisiae* en début et fin de fermentation batch à  $9,1 \text{ g.L}^{-1}$  de billes à l'échelle laboratoire par microscopie électronique à balayage

Compte tenu des observations de surface des billes réalisées au MEB (Figure 42), nous avons avancé l'hypothèse suivante. En surface de chaque bille, il existe en périphérie des levures non viables du fait des étapes de séchage et de stockage. Lors de la réhydratation et de la fermentation, les levures immobilisées présentes dans les billes se multiplient jusqu'à un certain niveau et des levures viables et non viables sont libérées dans la phase liquide. Les levures viables libérées, de même que les levures immobilisées, continuent leur multiplication jusqu'à atteindre un niveau limite au-delà duquel il n'y a plus d'augmentation de la population peut-être par un phénomène de 'quorum sensing'. Ce niveau rapidement atteint pour les fortes concentrations en billes par les levures immobilisées ne permet donc pas une croissance importante des levures libres. A l'inverse, pour les faibles concentrations, l'augmentation de la population en phase liquide avant l'atteinte du seuil limite est beaucoup plus grande. Bien évidemment, cette croissance n'est pas instantanée et en fonction des concentrations, plusieurs cycles sont nécessaires avant d'atteindre une population dans la phase liquide stabilisée, ce qui explique également le temps de stabilisation des vitesses de fermentation.

#### II.4 Conclusion et choix de la concentration en billes

Comme nous l'avons constaté tout au long de cette étude, la concentration en billes est un paramètre déterminant dans le dimensionnement du procédé. En effet, la concentration en billes aura non seulement un impact sur les cinétiques fermentaires mais également sur la libération et croissance cellulaire dans la phase liquide ainsi que sur l'évolution de la morphologie des billes. Grâce à l'analyse des vitesses spécifiques, nous avons montré l'existence d'une concentration en billes adaptée, autour de  $40 \text{ g.L}^{-1}$ . Celle-ci devrait nous permettre de concilier efficacité cinétique et optimisation. Ce sera donc la concentration utilisée pour la suite de l'étude.

### III. Etude de la fermentation maloalcoolique et faisabilité d'une double fermentation

Comme nous l'avons mentionné ci-avant, pour travailler en continu avec un temps de séjour raisonnable, il est nécessaire de produire un vin avec des sucres résiduels, ce qui pose problème vis-à-vis des risques de contamination existant entre la fin de la fermentation alcoolique et la dégradation de l'acide malique. Pour la dégradation de l'acide malique, l'une des solutions mentionnées retenue est l'utilisation de la souche *Sch.pombe* sous forme immobilisée. Comme détaillé dans la bibliographie, cette méthode est largement étudiée pour réduire l'acidité du vin dans le domaine. Cette partie développe l'étude de faisabilité d'une double fermentation en utilisant les deux souches *S.cerevisiae* et *Sch.pombe* sous forme immobilisée.

#### III.1 Désacidification du jus par *Sch.pombe*

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la fermentation maloalcoolique en culture pure pour différentes concentrations en billes (Tableau 21).

Tableau 21 : Présentation des essais de désacidification réalisés en levures *Sch.pombe* immobilisées

Concentration en billes <i>Sch.pombe</i> (g.L <sup>-1</sup> liquide)	Population théorique dans le jus inoculé (cellules.mL <sup>-1</sup> )
5	> 5,00.10 <sup>6</sup>
10	> 1,00.10 <sup>7</sup>
40	> 4,00.10 <sup>7</sup>

Compte tenu de nos observations faites sur la fermentation alcoolique, nous avons également étudié l'influence du recyclage sur la cinétique de fermentation.

Comme nous le constatons d'après la Figure 43, la concentration en billes influence la cinétique de fermentation. Les vitesses globales ainsi obtenues varient entre 0,09 et 0,44 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> pour des concentrations allant de 5 à 40 g.L<sup>-1</sup> de billes.

En traçant la vitesse de fermentation maloalcoolique en fonction de la concentration en billes (Figure 44), il semble y avoir une tendance linéaire pour les faibles concentrations et une inflexion au niveau des fortes concentrations. Ceci traduirait alors l'existence d'une concentration optimale comme cela a été montré pour *S.cerevisiae*.

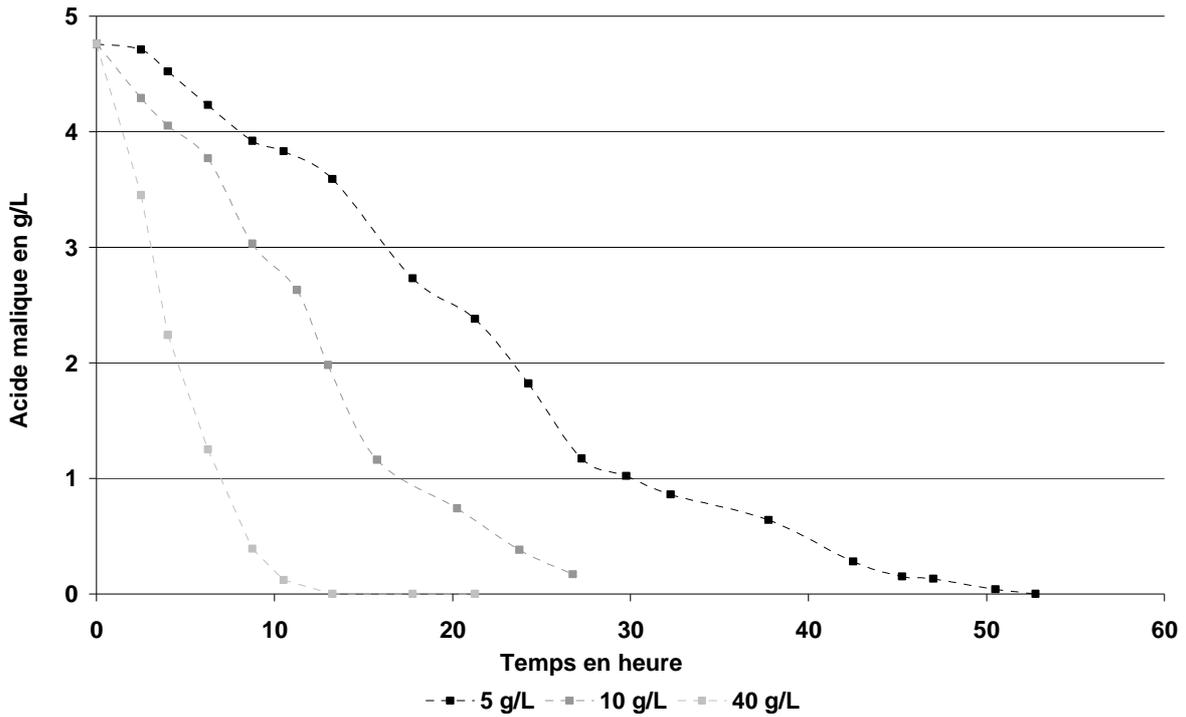


Figure 43 : Cinétiques de désacidification du jus pour trois concentrations en *Sch.pombe* en cultures pures en batch

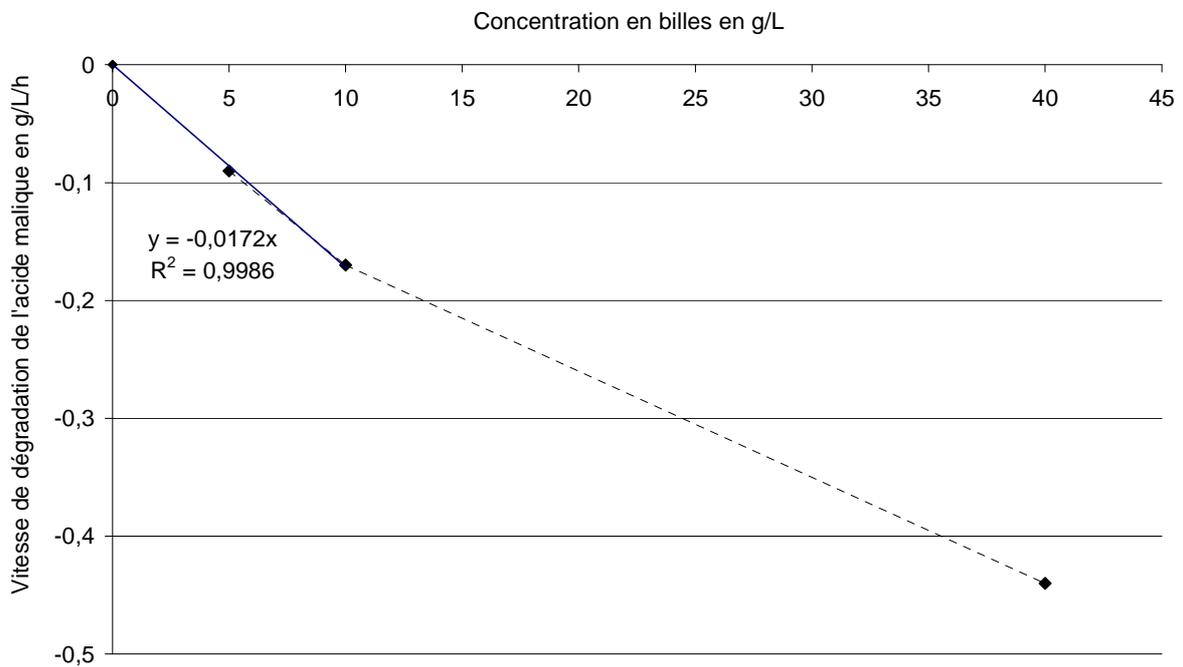


Figure 44 : Effet de la concentration en billes sur la vitesse de fermentation maloalcoolique en culture pure en batch

Concernant l'effet du recyclage, une accélération des cycles est observée comme pour la fermentation alcoolique (Figure 45). Ce phénomène a déjà été mentionné par Silva et al. (2002) et Silva et al. (2003).

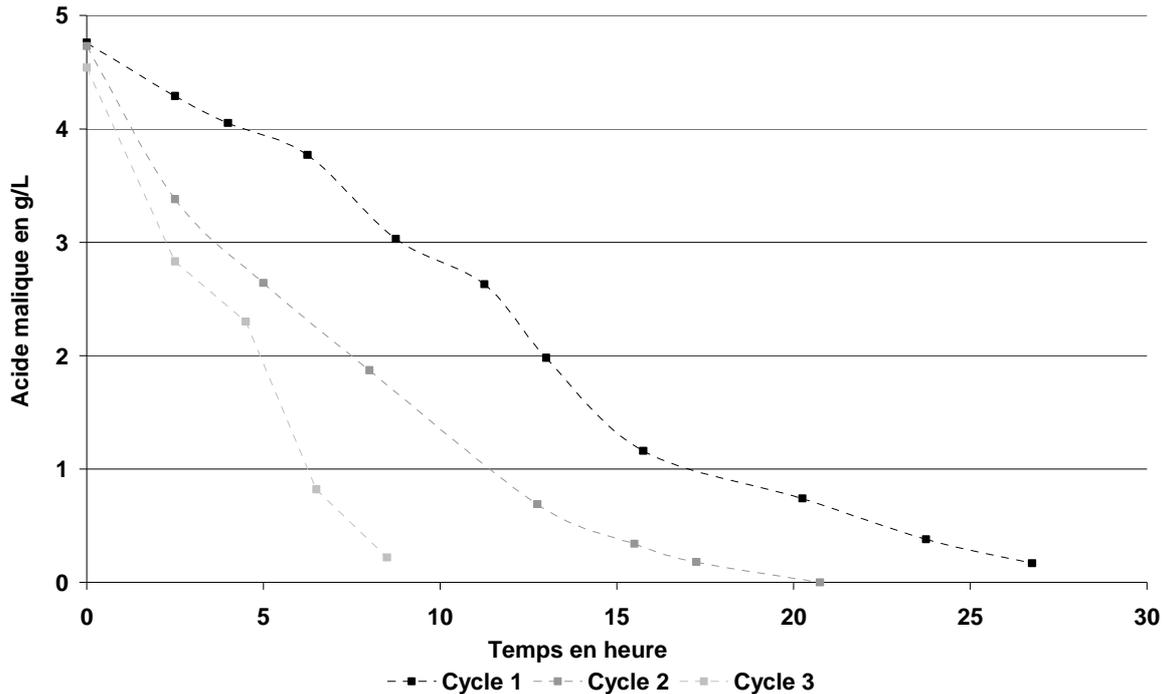


Figure 45 : Cinétiques de fermentation maloalcoolique au cours du recyclage en cultures pures en batch pour  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de billes de *Sch.pombe*

Comme dans le cas de *S.cerevisiae*, l'accélération observée s'explique par la croissance des levures incluses dans les billes, leur libération partielle dans le milieu et la croissance des levures planctoniques. Et ce phénomène est également d'autant plus important que la concentration en billes est faible (Tableau 22). De la même façon, il serait possible de calculer l'activité spécifique des levures libres et d'évaluer la part de celles-ci dans le phénomène d'accélération.

Tableau 22 : Evolution des vitesses de désacidification et des populations en phase liquide au cours des cycles pour les différentes concentrations en billes de *Sch.pombe* en cultures pures en batch

Concentration de billes en $\text{g.L}^{-1}$ de liquide	Cycle 1		Cycle 2		Cycle 3	
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
5	-0,094	$1,3 \cdot 10^6$	-0,368	$8 \cdot 10^7$	-0,456	$1,05 \cdot 10^8$
10	-0,172	$2,34 \cdot 10^5$	-0,264	$1,6 \cdot 10^6$	-0,424	$1 \cdot 10^8$
40	-0,442	$2,81 \cdot 10^5$	-0,824	$3,13 \cdot 10^5$	-0,620	$3,15 \cdot 10^6$

(1) Vitesse désacidification en  $\text{g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ; (2) Population phase liquide en fin de batch en  $\text{cellules.mL}^{-1}$

Au niveau des vitesses, celles-ci varient entre  $0,1$  et  $0,8 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , ce qui est en accord avec les données de la littérature (Silva et al. 2002).

Les données cinétiques en culture pure montrent qu'il est largement possible de réaliser une fermentation maloalcoolique complète en moins de 40 h. Cependant, il nous faut maintenant vérifier que la présence des *S.cerevisiae* n'aura pas d'impact sur l'activité désacidifiante des levures *Sch.pombe* comme cela est mentionné pour certaines souches (Yokotsuka et al. 1993).

### III.2 Désacidification du jus en culture mixte

Afin d'évaluer l'impact de la présence de *S.cerevisiae* sur *Sch.pombe*, des cultures mixtes ont été réalisées en utilisant une concentration standard de 39,5 g.L<sup>-1</sup> de *S.cerevisiae* et les 3 concentrations précédentes de *Sch.pombe*. Dans ces conditions, le recyclage des levures a également été étudié.

Comme le montre le Tableau 23, la présence des *S.cerevisiae* ne semble pas avoir d'impact sur l'activité de désacidification des *Sch.pombe*, tout du moins sur le premier cycle. Les mêmes vitesses de fermentation sont obtenues pour chacune des concentrations testées.

Tableau 23 : Evolution des vitesses de désacidification au cours des cycles pour les différentes concentrations en billes de *Sch.pombe* dans le cas de cultures mixtes en batch

Concentration de billes en g.L <sup>-1</sup> de liquide ( <i>S.cerevisiae</i> / <i>Sch.pombe</i> )	Vitesse de désacidification en g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>		
	Cycle 1	Cycle 2	Cycle 3
39,5 / 5	-0,082	-0,077	-0,011
39,5 / 10	-0,145	-0,182	-0,131
39,5 / 40	-0,431	-0,565	-0,473

Si nous nous concentrons maintenant sur le recyclage (Tableau 23), aucune accélération n'est franchement notable. Les vitesses de désacidification sont sensiblement les mêmes qu'il s'agisse du 1<sup>e</sup>, 2<sup>e</sup> ou 3<sup>e</sup> cycle. Il est également à noter qu'aucune levure *Sch.pombe* libre n'a été observée. Ainsi, comme mentionné par Yokotsuka et al (1993), la présence des *S.cerevisiae* n'influencerait pas l'activité désacidifiante des levures *Sch.pombe* en présence mais aurait un effet inhibiteur sur leur croissance.

La fermentation maloalcoolique en culture mixte est donc envisageable. Néanmoins, dans le cas d'une désacidification en continu et simultanément avec la fermentation alcoolique, les conditions ne seront pas tout à fait les mêmes. En effet, dans le cas d'un réacteur mélangé, le milieu sera intégralement un milieu vin à forte teneur en éthanol. Comme reporté par Ogbonna et al. (1989) et Yokotsuka et al. (1993), les vitesses de fermentation maloalcoolique par *Sch.pombe*, sont également fonction de la teneur en éthanol qui exerce un effet inhibiteur tout comme pour les levures de type *S.cerevisiae*.

### III.3 Désacidification du vin

Pour étudier la fermentation maloalcoolique du vin, nous avons conservé les vins issus des cultures mixtes auxquels nous avons ajouté environ 4 g.L<sup>-1</sup> d'acide malique. Les vitesses obtenues lors de ces essais sont données dans le Tableau 24.

Tableau 24 : Vitesse de désacidification en cultures mixtes sur vin et temps de séjour théorique pour une double fermentation continue pour les différentes concentrations en billes de *Sch.pombe*

Concentration de billes en g.L <sup>-1</sup> de liquide ( <i>S.cerevisiae</i> / <i>Sch.pombe</i> )	Vitesse de désacidification en g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	Temps de séjour minimum en heure
39,5 / 5	- 0,028	144
39,5 / 10	- 0,029	137
39,5 / 40	- 0,094	43

A la lecture du Tableau 24, nous voyons bien l'effet de la présence d'éthanol sur la vitesse de désacidification. Celles-ci sont environ 4 fois plus faibles que sur du jus. Nos résultats sont donc en accord avec les données disponibles dans la littérature (Tableau 9).

A partir de ces vitesses, nous avons ensuite calculé le temps de séjour nécessaire pour une consommation de 4 g.L<sup>-1</sup> d'acide malique dans le cas d'un fonctionnement continu. Les valeurs données montrent qu'il est possible de mettre en œuvre une fermentation maloalcoolique en continu en même temps qu'une fermentation alcoolique, mais à condition d'utiliser une forte concentration en billes de *Sch.pombe*, supérieure ou égale à 40 g.L<sup>-1</sup>.

Ainsi, avec 39,5 g.L<sup>-1</sup> de *S.cerevisiae* et 40 g.L<sup>-1</sup> de *Sch.pombe*, il devrait être possible d'obtenir en continu un vin contenant autour de 10 g.L<sup>-1</sup> de sucres résiduels et 0 g.L<sup>-1</sup> d'acide malique en moins de deux jours.

#### IV. Conclusion

Grâce à l'étude des cinétiques des levures immobilisées, nous avons montré la nécessité d'une fermentation alcoolique pas tout à fait complète pour une mise en œuvre en continu intéressante. En effet, si nous souhaitons atteindre une concentration en sucres résiduels nulle, l'utilisation de levures immobilisées en culture continue ne permettrait plus de gain de temps de fermentation face aux cultures batch classiques. Face aux problèmes des sucres résiduels dans le vin, nous avons démontré la faisabilité d'une culture mixte des souches *S.cerevisiae* et *Sch.pombe* permettant ainsi de réunir en une seule étape fermentation alcoolique et dégradation de l'acide malique. Ceci permettrait alors d'obtenir un vin contenant une dizaine de g.L<sup>-1</sup> sucres résiduels qui pourrait être considéré comme fini pour un certain type de produit.

D'autre part, une étude plus approfondie sur le comportement des levures immobilisées nous a permis de mettre en évidence l'impact de la concentration en billes sur les cinétiques de fermentation, la libération et croissance cellulaire en phase liquide ainsi que sur la morphologie des billes. Il a été montré que plus la concentration en billes était faible, plus nous pouvions observer une augmentation du volume des billes importante, une libération des cellules dans le milieu et une croissance cellulaire rapide, ce qui impliquait également une stabilisation des cinétiques au cours des cycles rapide en comparaison avec de fortes concentrations en billes. Une des suppositions permettant d'expliquer cette observation est l'existence d'une limite de population au-delà de laquelle il n'y a plus ou peu de croissance cellulaire. Cette limite presque déjà atteinte pour les fortes concentrations engendrerait une croissance cellulaire beaucoup plus faible par rapport à celle des faibles concentrations.

Pour *S.cerevisiae*, l'analyse des activités spécifiques nous a également permis de déterminer une concentration en billes adaptée. En effet, nous avons constaté qu'à forte concentration en billes l'activité spécifique était elle aussi limitée, très probablement du fait d'un effet de compétition nutritive entre les levures trop nombreuses.

Ainsi donc, en utilisant environ  $40 \text{ g.L}^{-1}$  de billes de *S.cerevisiae* et  $40 \text{ g.L}^{-1}$  de billes de *Sch.pombe*, nous avons montré la possibilité de réaliser une double fermentation quasi complète en moins de deux jours contre 3 à 5 jours pour seulement la fermentation alcoolique classique en batch. En utilisant, ces concentrations, nous avons ensuite déterminé le procédé le plus approprié pour une mise en œuvre en continue de la double fermentation.



**Partie IV :**  
**Conception d'un réacteur de vinification**  
**en continu sur levures immobilisées à**  
**l'échelle laboratoire**



A partir des cinétiques obtenues en batch, nous avons travaillé à la conception d'un réacteur continu le plus adapté à la production de vin. Nous avons cherché à définir un procédé réunissant fermentation alcoolique et maloalcoolique, et permettant d'obtenir un vin présentant une sucrosité résiduelle recherchée par le consommateur que nous traduirons par une concentration en sucres résiduels d'environ  $10 \text{ g.L}^{-1}$ , et exempt d'acide malique. Cependant, comme discuté dans le paragraphe IV.2 de la partie Introduction bibliographique, les inconvénients majeurs de la réalisation de la fermentation alcoolique en continu sont les problèmes hydrodynamiques liés à la production de  $\text{CO}_2$  non contrôlée dans un milieu liquide-solide. Celle-ci peut donner lieu à la formation de volume mort, voire à une rétention complète du gaz produit et donc conduire à une perte de performance non négligeable.

De nombreuses études sont consacrées à ce sujet et plusieurs modèles de réacteur continu ont été proposés afin de supprimer ou tout du moins limiter ces phénomènes. En prenant en compte les remarques faites par les auteurs sur leur propre montage, nous avons sélectionné les configurations suivantes :

- colonne verticale à lit fluidisé recirculé,
- colonne verticale à lit fixe,
- colonne horizontale à lit fixe.

Les essais sont réalisés pour les concentrations optimales déterminées dans la partie précédente à savoir environ  $40 \text{ g.L}^{-1}$  de *S.cerevisiae* et  $40 \text{ g.L}^{-1}$  de *Sch.pombe*.

## **I. Colonne verticale à lit fluidisé recirculé**

Notre premier choix s'est porté sur un lit fluidisé recirculé. La fluidisation mise en place a pour but de supprimer ou du moins de limiter les rétentions de gaz au sein du lit de billes, de permettre une meilleure homogénéisation et donc un meilleur transfert de matière qui permettrait idéalement d'atteindre des vitesses de réaction supérieures à celles obtenues en batch (Gòdia et Solà, 1995).

Compte tenu des résultats obtenus en batch, il est vraisemblablement impossible de maintenir le lit en état de fluidisation avec le débit d'alimentation correspondant. En effet, considérer les vitesses obtenues à  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de sucres résiduels impliquerait une alimentation continue en jus de l'ordre de  $10 \text{ mL.h}^{-1}$  sur un réacteur contenant 1 L de liquide. Cela reste insuffisant pour permettre une fluidisation du lit de billes. Par conséquent, une recirculation a été mise en place pour justement garantir la bonne fluidisation du lit. L'option fluidisation par un gaz n'a pas été envisagée car travaillant sur du vin, une forte aération est à proscrire.

### **I.1 Calcul des conditions opératoires pour la mise en œuvre de la fermentation en continu en lit fluidisé**

La colonne dont nous disposons est une colonne double enveloppe de diamètre interne 7,4 cm et de hauteur totale 50 cm utilisée à hauteur de 47 cm afin de limiter les risques de débordement. Les données caractéristiques sont récapitulées dans le Tableau 25.

Tableau 25 : Paramètres descriptifs de la colonne utilisée en lit fluidisé recirculé continu

Volume colonne en L	2,15
H Hauteur en cm	50,0
D Diamètre interne en cm	7,4
H/D	6,8
Section de colonne en cm <sup>2</sup>	43

Pour déterminer le débit d'alimentation de la colonne (Tableau 26), nous nous sommes basés sur les cinétiques obtenues en batch en nous plaçant dans la deuxième phase de consommation de sucres, autour de 10 g.L<sup>-1</sup> de sucres réducteurs totaux (Figure 31). Etant en réacteur fluidisé recirculé, nous considérons donc un modèle de fonctionnement du procédé de type RAC.

Tableau 26 : Calculs des débits d'alimentation nécessaires dans le cas d'un fonctionnement type RAC pour les différentes concentrations en billes de *S.cerevisiae*

Concentration de billes en g.L <sup>-1</sup> de liquide	152,5	89,0	39,5	9,12
Volume liquide en mL	2487	2741	2979	3146
Volume réactionnel en mL			3200	
sucres en entrée en g.L <sup>-1</sup>			210	
Sucres en sortie en g.L <sup>-1</sup>			10	
Vitesse de consommation des sucres en g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	-5	-4	-2	-1
Taux de dilution en h <sup>-1</sup>	0,025	0,020	0,010	0,005
Débit alimentation en L.h <sup>-1</sup>	0,062	0,055	0,030	0,016

Quand un liquide ou un gaz passe à travers un lit de particules avec une vitesse très faible, les particules ne bougent pas et la perte de charge est donnée par la loi d'Ergun (1952) (6).

$$\frac{\Delta P}{L} = \frac{150(1-\varepsilon)^2 \mu}{\Phi_s^2 \varepsilon^3 D_p^2} U + \frac{1,75(1-\varepsilon)\rho}{\Phi_s \varepsilon^3 D_p} U^2 \quad (6)$$

$\Delta P$  perte de charge en Pa,

L hauteur du lit de particule en m,

U vitesse du liquide en m.s<sup>-1</sup>,

$\mu$  viscosité du liquide en Pa.s,

$\varepsilon$  porosité du lit de particules (-),

$\rho$  masse volumique du fluide en kg.m<sup>-3</sup>,

$D_p$  diamètre de particule en m,

$\Phi_s$  coefficient de sphéricité des particules (-)

Lorsque la vitesse minimale de fluidisation  $U_{MF}$  est atteinte, le lit de particules commence à être mis en mouvement. Cette vitesse minimale de fluidisation peut se calculer en se basant

sur le fait qu'à cette vitesse, la perte de charge à travers le lit multipliée par la section droite de colonne,  $S$  (en  $m^2$ ), est égale au poids apparent du lit :

$$\Delta P \times S = (\rho_p - \rho)SL(1 - \varepsilon_{MF})g \quad (7)$$

avec :  $g$  constante gravitationnelle en  $m.s^{-2}$ ,  
 $\rho_p$  masse volumique des particules en  $kg.m^{-3}$ ,

$$\text{soit } \frac{\Delta P}{L} = (\rho_p - \rho)(1 - \varepsilon_{MF})g \quad (8)$$

La porosité du lit au point de minimum de fluidisation,  $\varepsilon_{MF}$ , est également la porosité du lit fixe  $\varepsilon$ . La combinaison des équations 6 et 8 conduit à :

$$\frac{150(1 - \varepsilon)^2 \mu}{\Phi_S^2 \varepsilon^3 D_p^2} U + \frac{1,75(1 - \varepsilon)\rho}{\Phi_S \varepsilon^3 D_p} U^2 = (\rho_p - \rho_l)(1 - \varepsilon_{MF})g \quad (9)$$

En définissant,  $Re_{MF} = \frac{U_{MF} D_p \rho}{\mu}$  (10) et  $Ga = \frac{D_p^3 \rho(\rho_p - \rho)g}{\mu^2}$  (11),

il vient  $\frac{150(1 - \varepsilon_{MF})}{\Phi_S^2 \varepsilon_{MF}^3} Re_{MF} + \frac{1,75}{\Phi_S \varepsilon_{MF}^3} Re_{MF}^2 = Ga$  (12)

soit  $A Re_{MF}^2 + B Re_{MF} - Ga = 0$  (13)

avec :  $A = \frac{1,75}{\Phi_S \varepsilon_{MF}^3}$  (14) et  $B = \frac{150(1 - \varepsilon_{MF})}{\Phi_S^2 \varepsilon_{MF}^3}$  (15)

En considérant les billes sphériques ( $\Phi_S = 1$ ) et un taux de vide  $\varepsilon_{MF}$ , mesuré initialement, de 0,33, il vient :

$$A = 48,696$$

$$B = 2796,561$$

Tableau 27 : Calculs des vitesses minimales de fluidisation pour les différentes concentrations en billes de *S.cerevisiae*

Concentration de billes en $g.L^{-1}$ de liquide	152,5	89,0	39,5	9,12
Diamètre de particule en m	$3,25.10^{-3}$	$3,50.10^{-3}$	$3,50.10^{-3}$	$4,50.10^{-3}$
Masse volumique particules $\rho_p$ en $kg.m^{-3}$		1080		
Constante gravitationnelle $g$ en $m^2.s^{-1}$		9,81		
Masse volumique du liquide $\rho$ en $kg.m^{-3}$		$1002,4^{(1)}$		
Viscosité du liquide $\mu$ en Pa.s		0,001		
Nombre de Galilée $Ga$	$2,621.10^4$	$3,273.10^4$	$3,273.10^4$	$6,956.10^4$
Nombre de Reynolds $Re_{MF}$	8,200	9,972	9,972	18,75
Vitesse minimale de fluidisation $U_{MF}$ en $m.s^{-1}$	$2,52.10^{-3}$	$2,84.10^{-3}$	$2,84.10^{-3}$	$4,16.10^{-3}$
Débit minimal de fluidisation $Q_{MF}$ en $L.h^{-1}$	38,97	44,01	44,01	64,37

<sup>(1)</sup> Valeur correspondant à une concentration en sucres de  $10 g.L^{-1}$

D'après le Tableau 27, le débit d'alimentation est très faible devant le débit minimal de fluidisation. La différence va d'un facteur 300 pour 152,5 g.L<sup>-1</sup> de billes à un facteur 1000 pour 9,1 g.L<sup>-1</sup> de billes. Il y a donc nécessité de mettre en place une recirculation du milieu de fermentation avec un débit au minimum égal au débit minimal de fluidisation calculé. Pour assurer la fluidisation, nous envisageons de travailler à vitesse opératoire  $U_{OP} = 1,5U_{MF}$ . Les résultats sont donnés dans le Tableau 28.

Tableau 28 : Calculs des débits de recirculation opératoires pour les différentes concentrations en billes de *S.cerevisiae*

Concentration de billes en g.L <sup>-1</sup> de liquide	152,5	89,0	39,5	9,12
Vitesse opératoire $U_{OP}$ en m.s <sup>-1</sup>	$3,78 \cdot 10^{-3}$	$4,26 \cdot 10^{-3}$	$4,26 \cdot 10^{-3}$	$6,26 \cdot 10^{-3}$
Débit opératoire $Q_{OP}$ en L.h <sup>-1</sup>	58,46	66,02	66,02	96,55

## I.2 Description du montage expérimental

Le montage de la colonne verticale de fluidisation s'inspire du montage décrit par Taillandier et al. (1994) (Figure 46). Il comprend une colonne double enveloppe dont les caractéristiques ont été données précédemment (Tableau 25), une fiole de dégazage de volume utile 1,2 L, une pompe assurant la recirculation du liquide et une pompe servant à l'alimentation et au soutirage. La pompe utilisée pour la recirculation est une pompe Masterflex de vitesse de rotation variable de 6 à 600 rpm. La tête de pompe choisie ici est une 7015 utilisée en double tête, l'ensemble permettant de soutirer et délivrer un débit de l'ordre du L.min<sup>-1</sup>. Pour l'alimentation et le soutirage, une pompe péristaltique Gilson Minipuls 3 est utilisée avec des tubes 2 stops orange de diamètre interne 0,89 mm délivrant un débit de l'ordre de 100 mL.h<sup>-1</sup>. Les données initiales du montage sont données dans le Tableau 29.

Afin d'assurer le bon fonctionnement de la recirculation, il est indispensable d'empêcher le passage des billes dans le circuit. Pour cela, nous avons mis en place une grille dans la partie supérieure de la colonne.

Le contrôle de la température est réalisé grâce à la double enveloppe de la colonne.

Tableau 29 : Données initiales du montage expérimental lit fluidisé recirculé continu

Volume utile total en L	3,4
Volume du lit de billes en L	0,34
Porosité du lit de billes	0,33
Volume de liquide en L	3,2

Pour ce premier essai, seule la fermentation alcoolique est suivie. Dans un premier temps, la colonne est chargée avec les billes de *S.cerevisiae* et le jus commercial supplémenté. Ce fonctionnement en batch est maintenu jusqu'à atteindre une concentration en sucres résiduels de l'ordre de 10 g.L<sup>-1</sup>. Pendant cette phase, nous mettons en route la recirculation entrecoupée du dégazage dans l'Erlen pour permettre la fluidisation des billes, favoriser l'évacuation du CO<sub>2</sub> et ainsi limiter les risques de rétention de gaz au sein de la colonne.

Une fois la concentration en sucres résiduels cible atteinte, la pompe d'alimentation et de soutirage est à son tour mise en route.

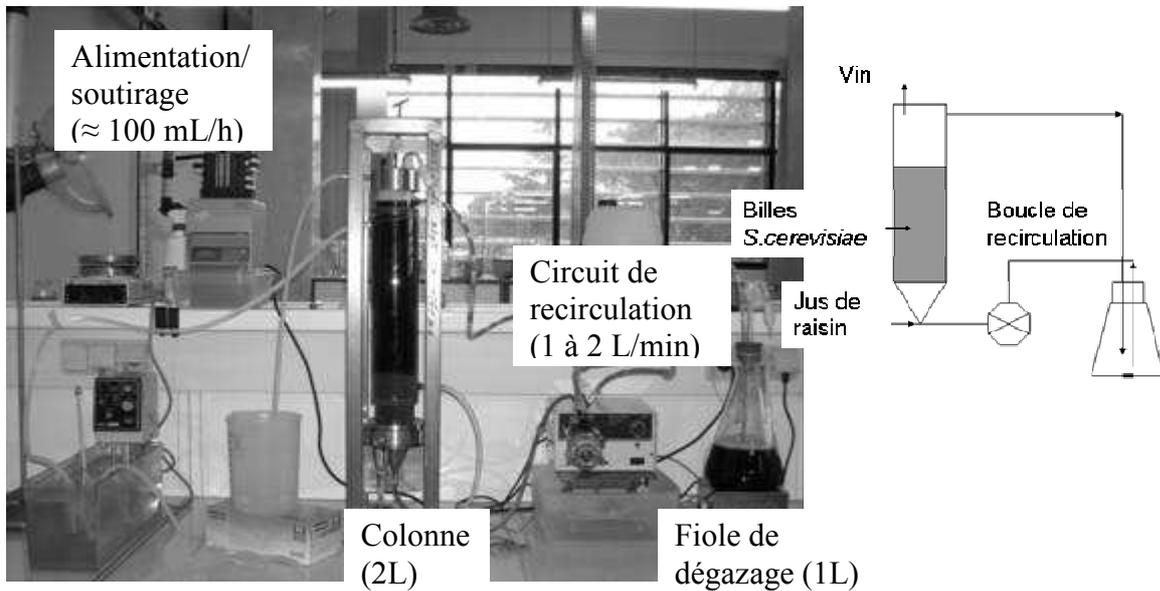


Figure 46 : Photo et schéma du montage expérimental du réacteur fluidisé recirculé continu

### I.3. Analyse des cinétiques

#### I.3.1 Evaluation de l'impact de la fluidisation durant la phase de batch

D'après le graphique ci-après (Figure 47), il apparaît que la fermentation durant la phase batch du continu a été plus rapide que celle du 1<sup>e</sup> cycle de l'essai en batch. Cependant, du fait d'un problème sur le système de refroidissement, la 1<sup>e</sup> phase de la fermentation a été conduite à 25°C. Afin de comparer les cinétiques et ainsi évaluer l'impact de la fluidisation, nous avons calculé la vitesse équivalente à 20°C. Pour cela, nous avons utilisé les données fournies par Proenol.

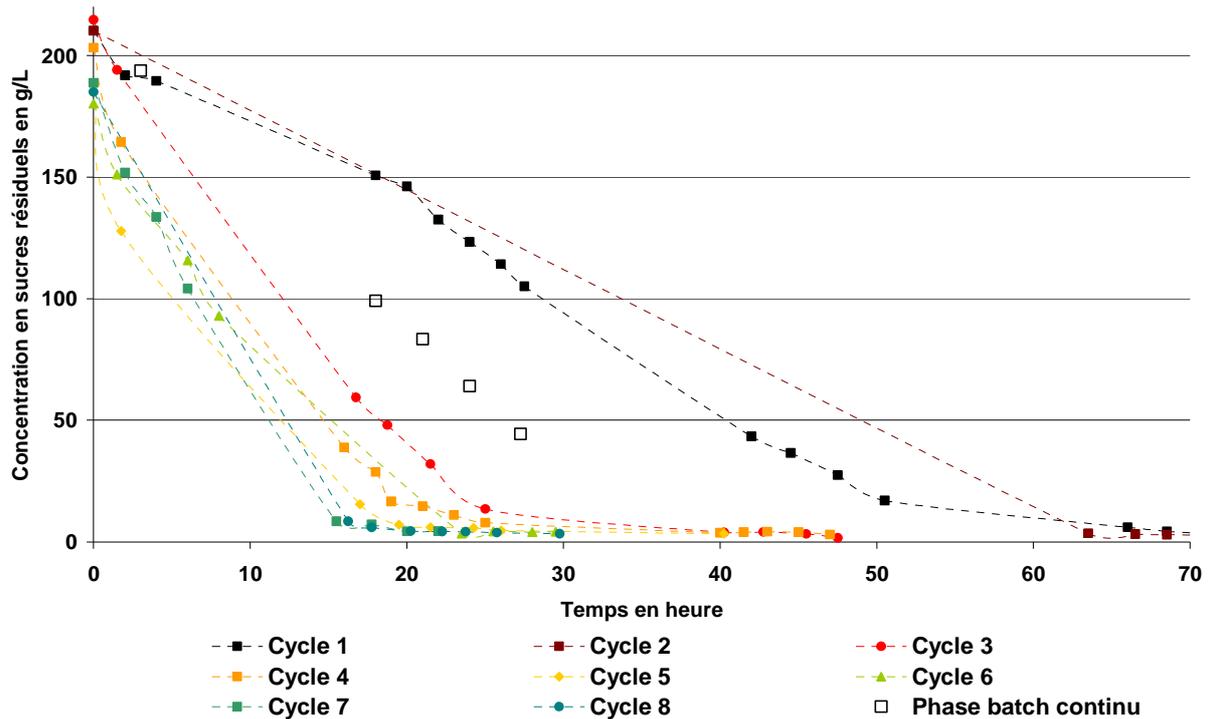


Figure 47 : Comparaison des cinétiques de fermentation alcoolique de la phase de démarrage du réacteur à lit fluidisé recirculé avec les essais batch pour  $39,5 \text{ g.L}^{-1}$  de billes de *S.cerevisiae*

La vitesse de consommation des sucres est indépendante de la concentration, c'est-à-dire qu'il s'agit d'une réaction d'ordre 0. Nous considérons donc  $ds/dt = k$ , constante cinétique.

L'équation d'Arrhenius établie la relation entre cette constante et la température :

$$k = Ae^{-E/RT} \quad (16)$$

k constante cinétique,

E énergie d'activation,

T température,

R constante des gaz parfaits,

A constante.

Pour les levures ProRestart®, l'énergie d'activation E a été évaluée comme étant égale à  $74,43 \text{ kJ.mol}^{-1}$ .

A  $25^\circ\text{C}$ ,

$$7,16 = Ae^{-E/R*(25+273,15)} \quad (a)$$

et à  $20^\circ\text{C}$ ,

$$k_{20^\circ\text{C}} = Ae^{-E/R*(20+273,15)} \quad (b)$$

soit en passant en logarithme et en soustrayant  $\ln(b) - \ln(a)$  :

$$\ln k_{20^\circ\text{C}} = \ln(7,16) - \frac{E}{R} \cdot \left( \frac{1}{(20 + 273,15)} - \frac{1}{(25 + 273,15)} \right) \quad (c)$$

et  $k_{20^\circ\text{C}} = 4,290 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$

Tableau 30 : Comparaison des vitesses de fermentation obtenues en batch avec celles obtenues en réacteur à lit fluidisé recirculé après correction en température

Concentration en billes de <i>S.cerevisiae</i> en g.L <sup>-1</sup> / Essai	39,5 / Batch	39,5 / continu	39,5 / continu
Température en °C	20	25	20
'Cycle' considéré	1	Batch	Extrapolation
Vitesse phase rapide g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	<b>-4,204</b>	-7,160	<b>-4,291</b>
Accélération / Ralentissement en %	-	-	<b>2</b>

Compte tenu de la correction en température (Tableau 30), nous constatons que la mise en place de la fluidisation ne donne pas lieu à une accélération de la cinétique en batch.

### I.3.2 Analyse des cinétiques durant la phase en continu

Durant le fonctionnement continu, une température de 20°C ± 1°C a été maintenue. Plusieurs taux de dilutions ont été testés. D'après les différentes réponses obtenues (Figure 48), le taux de dilution le plus élevé permettant de maintenir la concentration en sucres résiduels autour de 10 g.L<sup>-1</sup> est de 0,028h<sup>-1</sup> soit un temps de séjour d'environ 36 h.

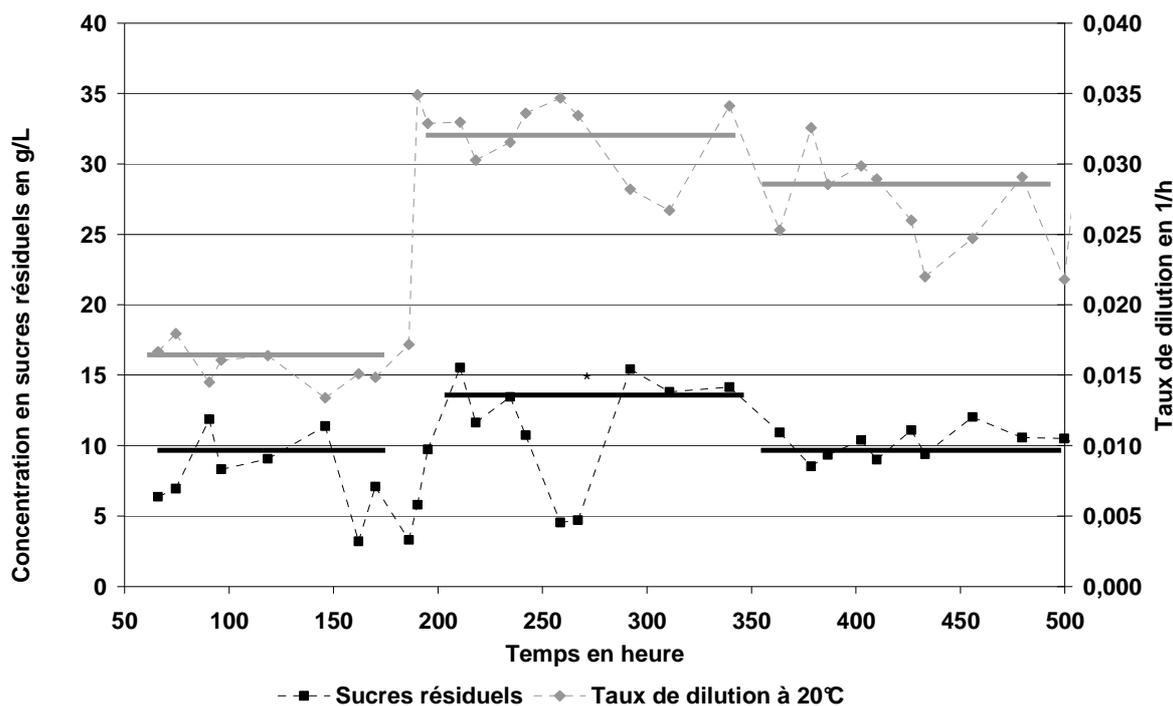


Figure 48 : Suivi cinétique du réacteur à lit fluidisé recirculé fonctionnant en continu avec 39,5 g.L<sup>-1</sup> de billes de *S.cerevisiae*

Au niveau de la population dans la phase liquide, une augmentation progressive a été observée tout au long de la culture avec une tendance de stabilisation autour de  $3.10^8$  cellules.mL<sup>-1</sup> vers la fin. Néanmoins, dans ce cas, la viabilité n'a pas été évaluée et suite à nos précédentes observations, nous pouvons supposer que celle-ci n'était pas très élevée. Le volume de billes a également augmenté mais aucune donnée n'a été relevée sur cet essai.

## I.3.3 Comparaison des performances en fonctionnement batch et continu

Pour chaque taux de dilution testé, nous avons estimé les vitesses instantanées de consommation de sucres présentées sur la Figure 49.

Nous constatons que le passage en fonctionnement continu permet d'augmenter la vitesse en phase dite 'lente' autour de  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de sucres résiduels. Celle-ci, d'environ  $2 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  en mode batch, passe à 3 à  $4 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  en fonctionnement continu. Cette différence vient très probablement du fait d'une évaluation des vitesses délicates autour de cette zone d'inflexion et ne constitue finalement pas une amélioration réelle.

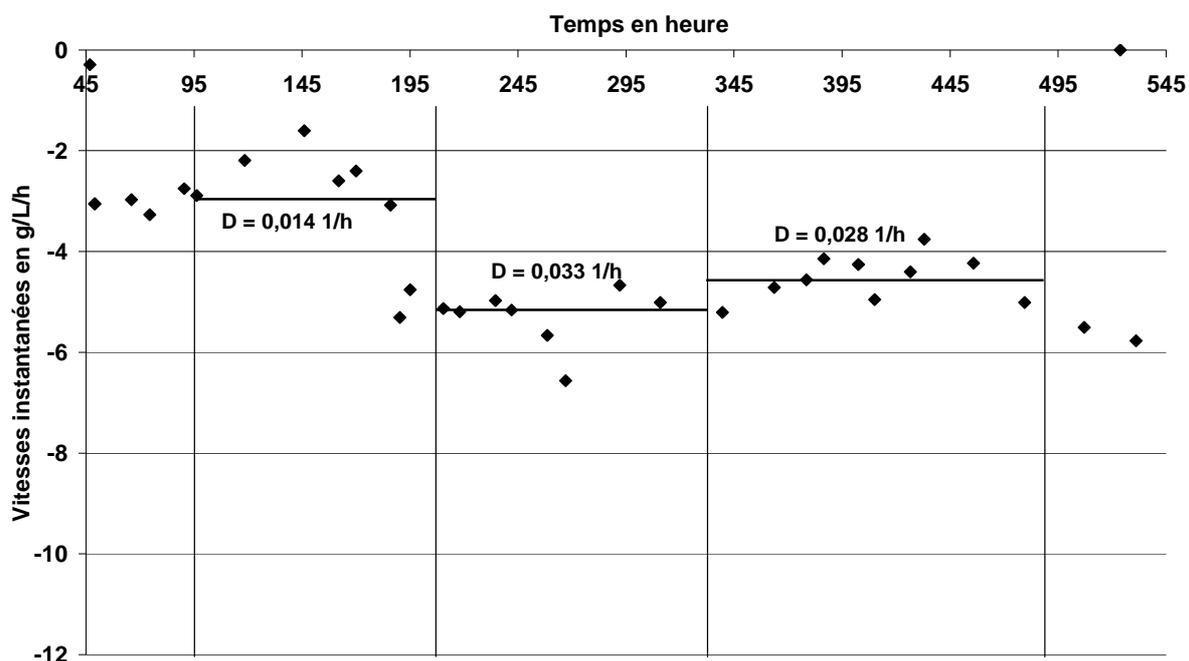


Figure 49 : Vitesses de consommation des sucres associées au fonctionnement continu du réacteur à lit fluidisé recirculé à  $39,5 \text{ g.L}^{-1}$  de billes de *S.cerevisiae*

Si nous comparons le batch et le continu, en tenant compte de l'accélération des cinétiques au cours des cycles constatée en batch, le passage en continu n'apparaît finalement pas comme si intéressant : une fois les cycles stabilisés, le temps de fermentation en batch est de l'ordre de 30 h contre 36 h dans cette configuration.

Le fonctionnement choisi ici, assimilable à un réacteur agité continu du point de vue fonctionnement, ne semble donc pas le plus adapté. Un fonctionnement de type piston (temps de séjour théoriquement égal ou inférieur au temps de fermentation en batch), lui sera peut-être préférable.

## I.4. Conclusion

Le montage mis en place a montré un fonctionnement en continu stable pendant 3 semaines. Avec un temps de séjour sur le liquide de 36 h, il permet d'obtenir un vin à  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de sucres résiduels.

Cependant, deux points négatifs sont à noter :

- les débits nécessaires à la fluidisation sont importants (débit de fluidisation de  $1 \text{ L.min}^{-1}$  sur une colonne de 2 L soit en extrapolant  $6000 \text{ hL.h}^{-1}$  pour une cuve de 200 hL) ;
- la recirculation mise en place risque d'avoir un impact négatif sur la qualité organoleptique des produits tel que la perte d'arômes volatils.

Même si d'un point de vue cinétique, la colonne fluidisée recirculée donne des résultats intéressants, cette configuration ne sera vraisemblablement pas transférable à plus grande échelle.

## II. Colonne à lit fixe verticale

Notre deuxième montage a tout simplement été, une colonne verticale à lit fixe. En effet, compte tenu des inconvénients que comporte la fluidisation par recirculation et de l'impossibilité de maintenir un état de fluidisation stable sans recirculation, cette configuration s'est imposée d'elle même. De plus, cette configuration présente en théorie un fonctionnement de type piston, et devrait donc permettre d'obtenir un meilleur temps de séjour que celui obtenu en réacteur fluidisé recirculé.

Cependant, malgré tout ces points positifs, un problème majeur pourrait subvenir dans ce montage : la rétention de gaz au sein du lit. En effet, de précédents essais réalisés au laboratoire ont montré que le  $\text{CO}_2$  produit par les levures pouvait rester piégé, formant d'importantes poches de gaz entre les billes et limitant l'accès au liquide. Gòdia et al. (1987) en font mention dans leurs essais de fermentation continue sur levures immobilisées sur du  $\kappa$ -Carrageenan et Valach et al. (2006) ont également constaté ce phénomène. Néanmoins, d'après Melzoch et al. (1994), dans le cas d'une colonne dont le chargement en billes ne dépasserait pas 50 % (v/v), la formation de poche de gaz et par la même de volume mort devrait être limitée. Les concentrations en billes mises en œuvre ici étant plus faibles (environ  $40 \text{ g.L}^{-1}$  pour *S.cerevisiae* et  $40 \text{ g.L}^{-1}$  pour *Sch.pombe* soit 10 % (v/v) de chaque), nous ne devrions pas observer de rétention gazeuse.

### II.1 Description du montage expérimental

Le montage en lit fixe (Figure 50) est constitué d'une colonne et d'une pompe. La colonne est la même que ci-avant, mais celle-ci n'est utilisée que sur un volume 1 L pour limiter les risques de débordement en cas de dysfonctionnement de la pompe. Les caractéristiques du réacteur sont données dans le Tableau 31.

Tableau 31 : Données initiales du montage expérimental lit fixe vertical

Volume utile total en L	1,0
Volume du lit de billes en L	0,21
Porosité du lit de billes	0,33
Volume de liquide en L	0,86

L'alimentation et le soutirage sont assurés par la même pompe péristaltique Gilson Minipuls 3, avec des tubes 2 stops orange de diamètre interne 0,89 mm délivrant un débit de l'ordre de  $100 \text{ mL.h}^{-1}$ . L'alimentation se fait par un tuyau plongeant au fond de la colonne et le soutirage par un tuyau en surface du liquide.

L'ensemble est maintenu en température grâce à la double enveloppe de la colonne.

Lors de cet essai, en plus d'évaluer le montage en lit fixe, nous avons testé la double fermentation en continu.

Comme mentionné précédemment, la double fermentation permet une bonne croissance des levures de *S.cerevisiae* mais pas *Sch.pombe*. Nous avons donc choisi de réaliser dans un premier temps, une acclimatation des billes en batch sur du jus supplémenté, à  $20^\circ\text{C}$  et 100 rpm pendant 72 h.

Après cette première étape, les billes sont mélangées et chargées dans la colonne avec le jus supplémenté. Le système commence en fonctionnement batch jusqu'à atteindre une concentration en sucres résiduels cible de  $10 \text{ g.L}^{-1}$ . Une fois cette concentration atteinte, la pompe d'alimentation et de soutirage est mise en route.

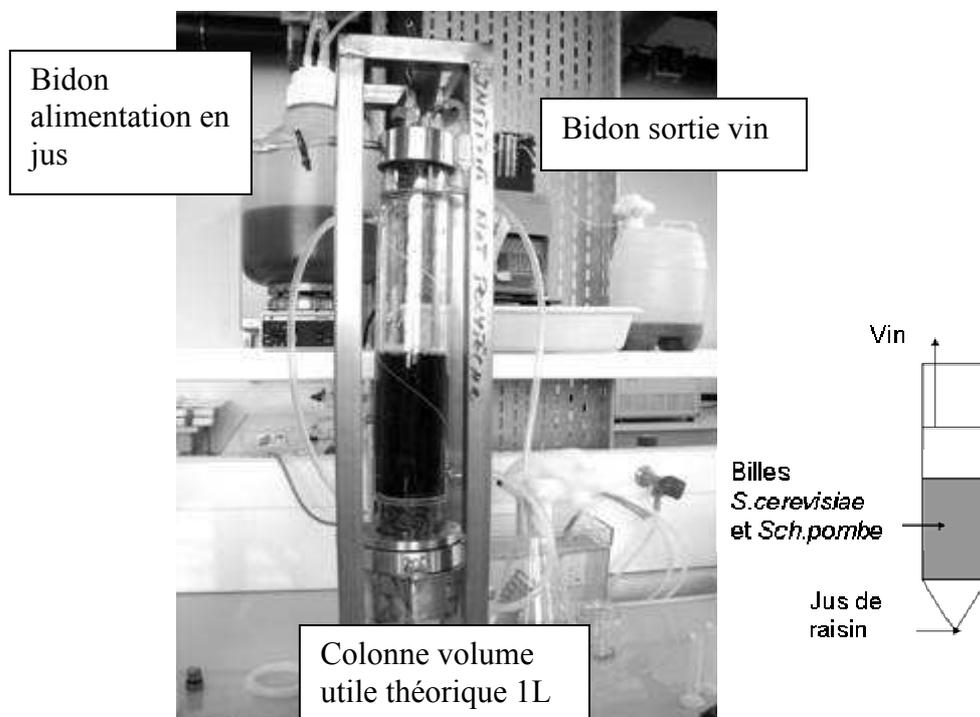


Figure 50 : Photo et schéma du montage expérimental du réacteur de type lit fixe vertical continu

## II.2. Analyse des cinétiques

### II.2.1 Evolution des fermentations pendant la phase de batch.

La Figure 51 présente les cinétiques de fermentations alcoolique et maloalcoolique obtenues pendant la phase de démarrage batch du réacteur lit fixe vertical. La température de fermentation a été maintenue à  $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

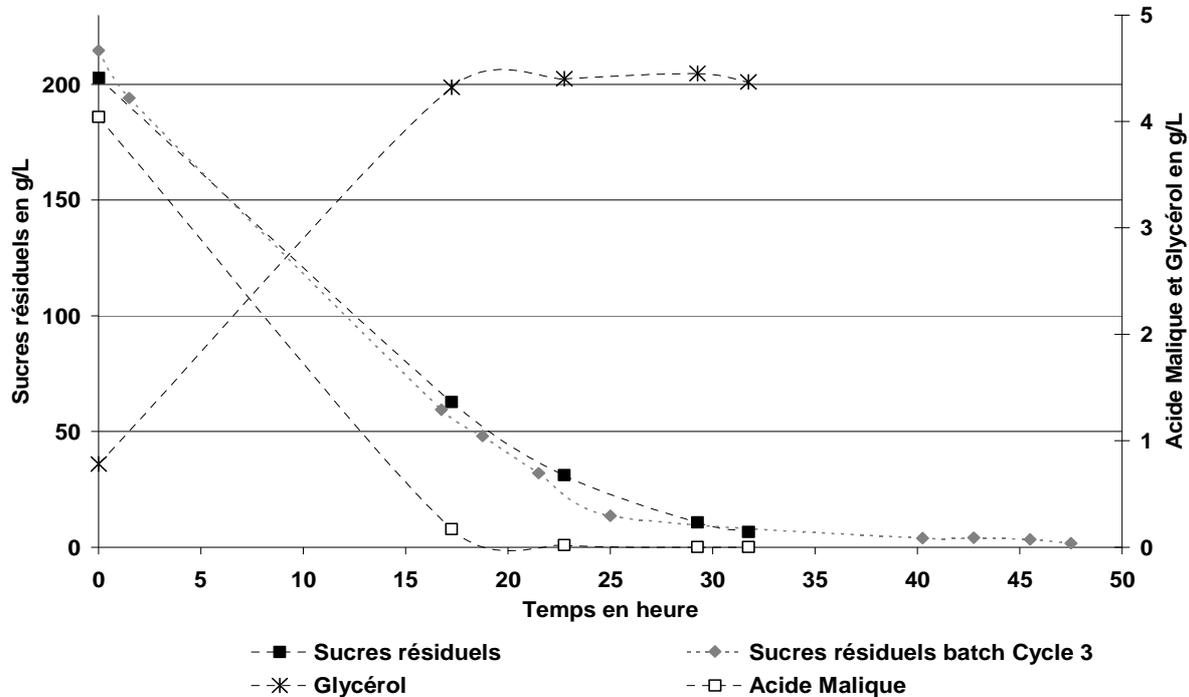


Figure 51 : Evolution des substrats et produits pendant la phase de démarrage en batch du réacteur lit fixe vertical à  $45,6 \text{ g.L}^{-1}$  de billes de *S.cerevisiae* et  $50,6 \text{ g.L}^{-1}$  de billes de *Sch.pombe*

L'évolution de la consommation des sucres pendant la phase batch de ce montage est similaire à la cinétique obtenue lors du 3<sup>e</sup> cycle des essais en batch (les données du cycle 2 n'étaient pas exploitables). La phase d'acclimatation mise en œuvre ici, afin de garantir une bonne fermentation maloalcoolique, permet d'obtenir des profils cinétiques satisfaisant pour chacune des deux souches.

Sur cet essai, nous avons également suivi la production de glycérol. Comme attendu, cette production a lieu en début de fermentation puis se stabilise autour de  $4,5 \text{ g.L}^{-1}$ .

### II.2.2 Analyse des cinétiques durant la phase en continu

Durant le continu, plusieurs taux de dilution ont été testés. Les débits appliqués ont été calculés en prenant en compte les cinétiques de la phase batch. D'après les différentes réponses obtenues, présentées sur la Figure 52, le taux de dilution permettant de maintenir la concentration en sucres résiduels autour de  $10 \text{ g.L}^{-1}$  et en acide malique autour de  $0-0,5 \text{ g.L}^{-1}$  se situe au dessous de  $0,048 \text{ h}^{-1}$  soit un temps de séjour inférieur à 35 h. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature (Drichoutis et al. 2007 pour la fermentation alcoolique et Ciani et al. 1995 pour la fermentation maloalcoolique sur vin).

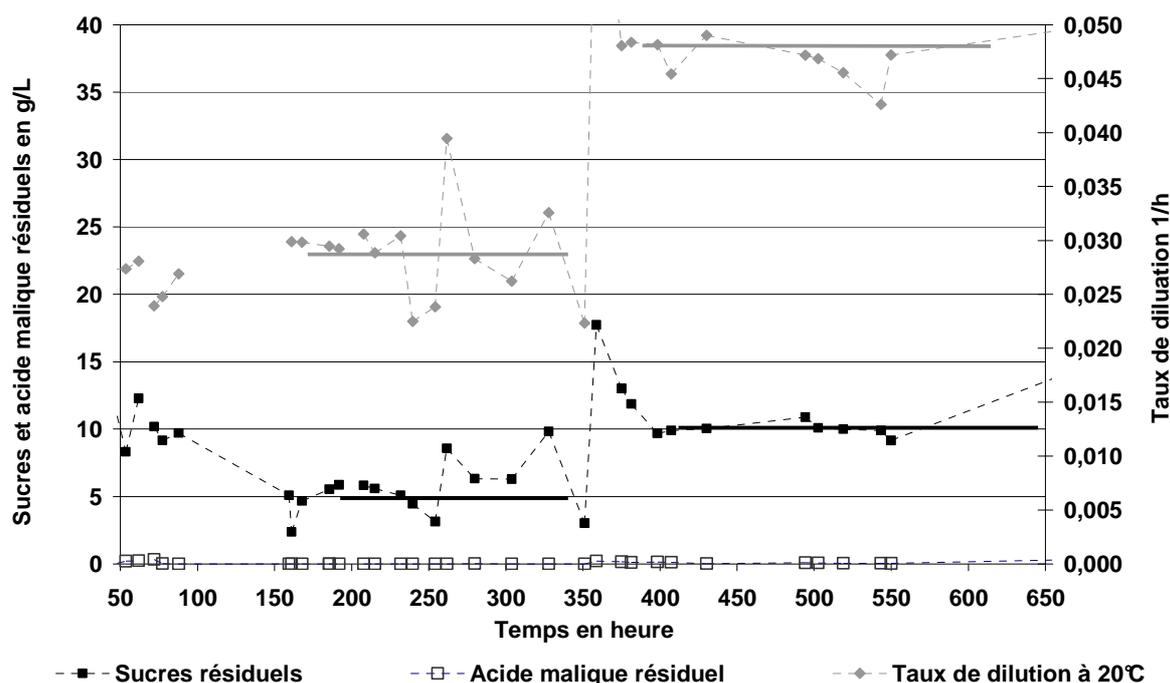


Figure 52 : Suivi cinétique du lit fixe vertical à  $45,6 \text{ g.L}^{-1}$  de billes de *S.cerevisiae* et  $50,6 \text{ g.L}^{-1}$  de billes de *Sch.pombe* fonctionnant en continu

Le dosage du glycérol montre une stabilisation de la concentration autour de la valeur atteinte en fin de batch à savoir  $4,5 \text{ g.L}^{-1}$ . Cette production qui a donc lieu à une vitesse de l'ordre de  $0,14 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , correspond à un rendement par rapport aux sucres consommés de 2,5 %, ce qui est en accord avec les données obtenues en batch.

Pour l'éthanol, une concentration moyenne de 11-11,5 % (v/v) a été mesurée, soit un rendement en éthanol  $Y_{ES}$  autour de 47 %, ce qui correspond aux données de la littérature et à nos données batch.

### II.2.3 Comparaison des performances en fonctionnement batch et continu

Au niveau des vitesses présentées sur la Figure 53, le fonctionnement en réacteur type lit fixe permet d'atteindre des vitesses de  $5,5$  et  $9 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (pour  $D = 0,03$  et  $0,048 \text{ h}^{-1}$  respectivement) contre  $2 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  en batch et  $3$  à  $4 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  dans la configuration lit fluidisé recirculé. Concernant la désacidification, les vitesses atteintes sont également supérieures, de l'ordre de  $0,16 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  contre  $0,1 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  pour  $40 \text{ g.L}^{-1}$  de billes de *Sch.pombe* en fin de fermentation.

Ces améliorations peuvent s'expliquer par un fonctionnement du réacteur semblable au fonctionnement du réacteur piston. La probable formation d'un gradient de concentration permettrait de n'atteindre les vitesses dites 'de phase lente' qu'en partie haute de colonne. Une analyse de la distribution des temps de séjour nous permettrait de confirmer cela.

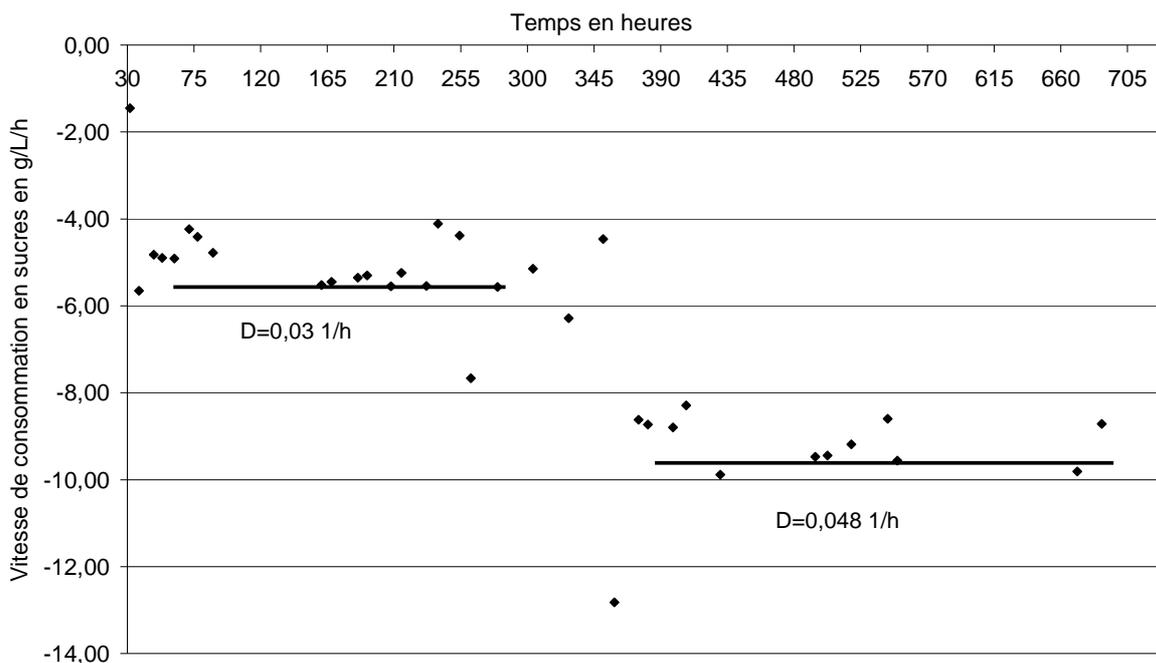


Figure 53 : Vitesses de consommation des sucres associées au réacteur lit fixe vertical à 45,6 g.L<sup>-1</sup> de billes de *S.cerevisiae* et 50,6 g.L<sup>-1</sup> de billes de *Sch.pombe* fonctionnant en continu

### II.3. Evolution des populations et des billes

L'analyse des populations en phase liquide montre une libération de *S.cerevisiae* dans le milieu mais la population reste relativement stable autour de  $1-5 \cdot 10^7$  cellules.mL<sup>-1</sup> (rendement  $Y_{XS}$  de l'ordre de 0,05 %). Par contre, ici encore, les mesures de viabilité n'ont pas été faites. Pour *Sch.pombe*, aucune levure libre n'a été observée conformément à nos attentes.

A l'inverse, l'évolution des billes est importante. Comme le montre la Figure 54, nous avons une augmentation progressive mais relativement importante de la hauteur du lit pendant les 3 premières semaines de fonctionnement. Sur la fin de l'essai, il semble que la hauteur de lit se stabilise autour de 11 cm soit deux fois plus qu'en début du continu. Cette augmentation, résultat probable de modification de la matrice d'alginate en partie due à la production de gaz sera à prendre en compte dans le dimensionnement.

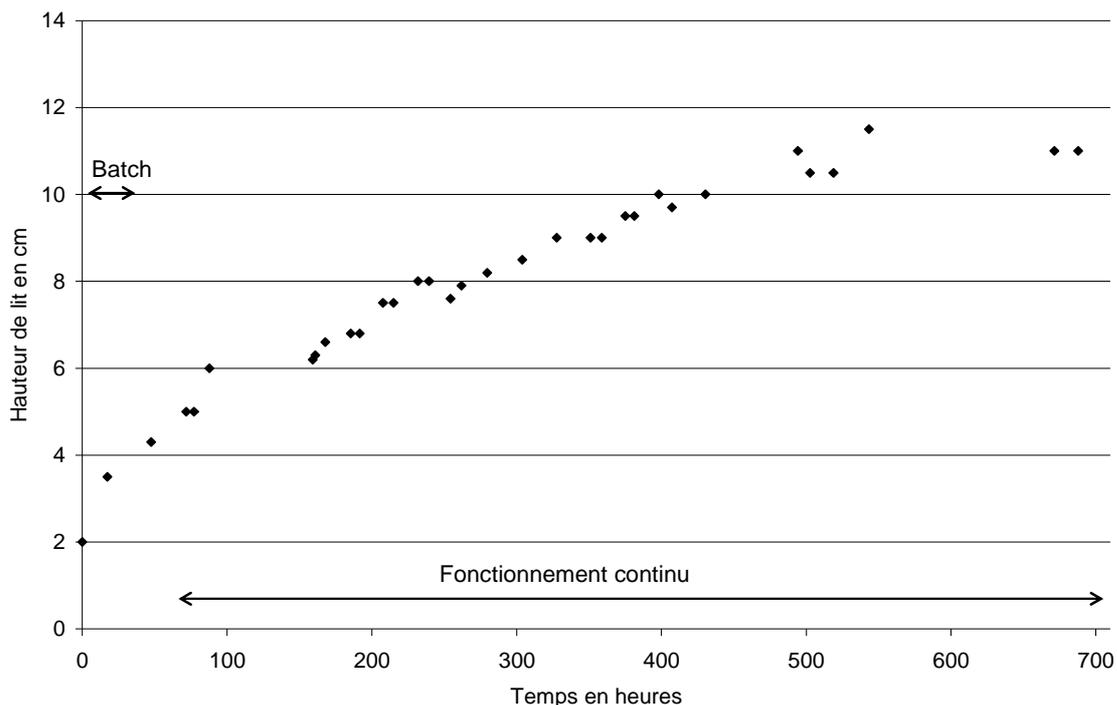


Figure 54 : Evolution de la hauteur du lit au cours du fonctionnement en continu du réacteur lit fixe vertical à  $45,6 \text{ g.L}^{-1}$  de billes de *S.cerevisiae* et  $50,6 \text{ g.L}^{-1}$  de billes de *Sch.pombe*

#### II.4 Rétention de $\text{CO}_2$ et fluidisation spontanée

Au cours de ces essais, nous craignons des problèmes de rétention de gaz au sein du lit, mais ceux-ci n'ont pas eu lieu. Néanmoins, un autre phénomène est observé : une fluidisation intermittente. Le gaz produit par les levures s'accumule au sein du lit sous forme de poches de gaz jusqu'à un certain point où il s'échappe provoquant un déplacement du gaz suivi d'une fluidisation du lit de billes (Figure 55, Figure 56). Nagashima et al. (1984) reportait également un effet de turbulence existant au sein du lit fixe continu.

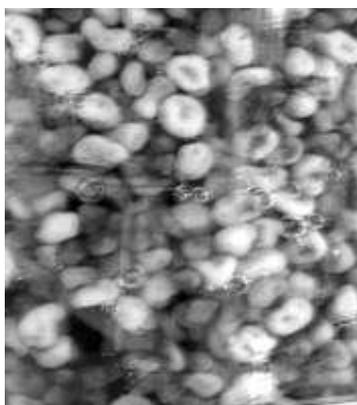


Figure 55 : Photo illustrant la formation des poches de gaz au sein du lit de billes dans le réacteur lit fixe vertical continu

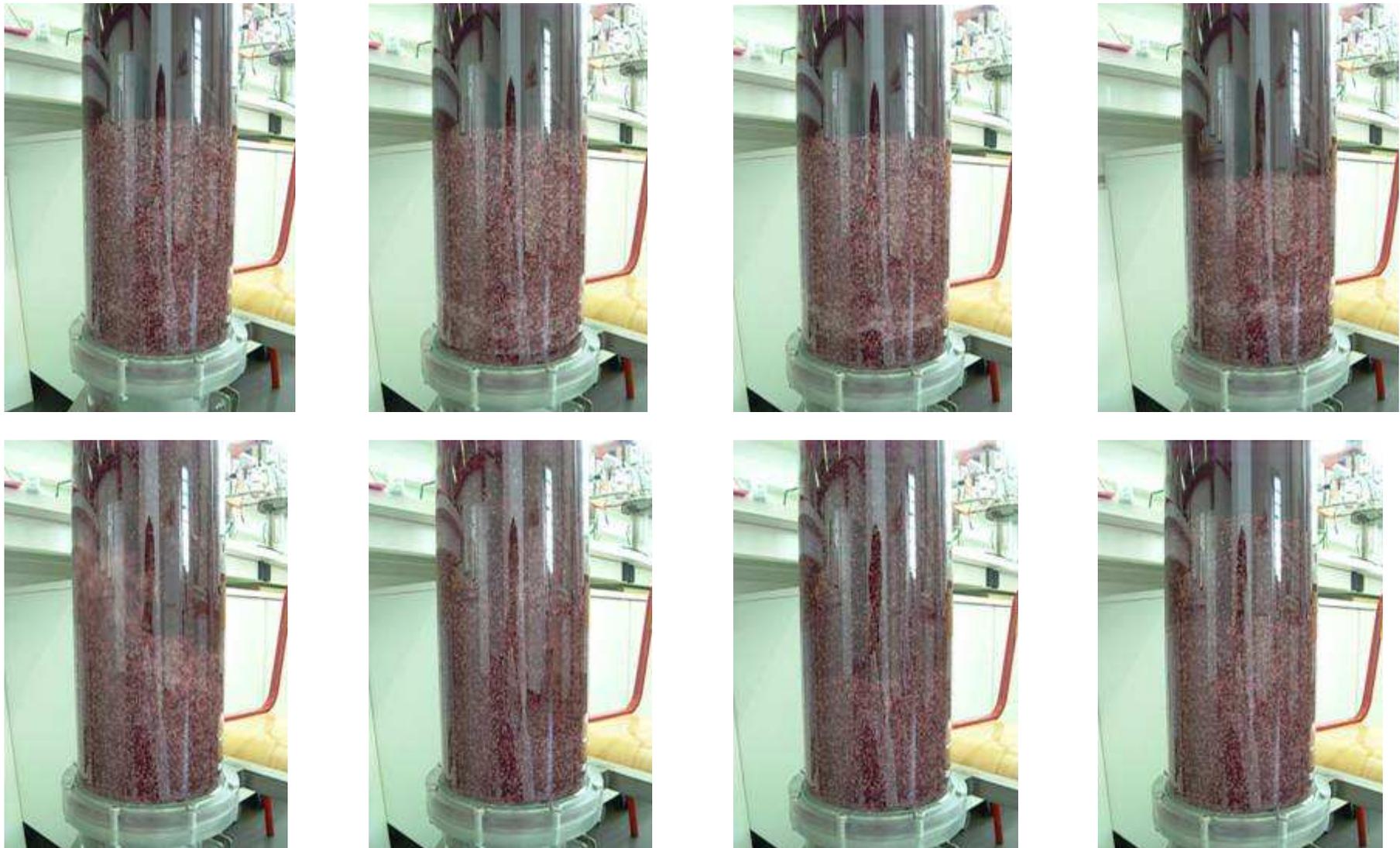


Figure 56 : Photos descriptives de la fluidisation intermittente dans le réacteur continu de type lit fixe à l'échelle laboratoire

## II.5 Conclusion

En plus de présenter l'avantage d'être un réacteur de configuration et fonctionnement simple et peu coûteux, le réacteur lit fixe permet d'atteindre en continu des vitesses de fermentation intéressantes. Néanmoins, le phénomène de fluidisation spontanée pourrait être un problème pour le changement d'échelle, c'est pourquoi nous avons cherché une nouvelle configuration permettant de le limiter.

## III. Colonne à lit fixe horizontale

Afin de limiter les problèmes hydrodynamiques et d'améliorer la productivité, plusieurs auteurs privilégient l'utilisation du lit fixe en version horizontale compartimenté ou non (Shiotani et Yamané 1981 ; Axelsson 1988 ; Ogbonna et al. 1989). Nous avons donc nous aussi cherché à évaluer les performances d'un tel système.

### III.1 Description du montage expérimental

La colonne utilisée (Figure 57, Tableau 32) est une colonne horizontale en plexiglas, de diamètre interne 9 cm et de longueur 80 cm, soit un rapport H/D d'environ 9. Le volume total de la colonne est de 5,1 L mais nous ne l'utiliserons qu'au 2/3 c'est-à-dire sur un volume de 3,4 L (Tableau 33). Afin de permettre l'évacuation des gaz, des trous de 1 cm de diamètre sont répartis sur toute la longueur de la colonne.

Tableau 32 : Paramètres descriptifs de la colonne à lit fixe horizontal continu

Volume colonne en L	5,1
L Longueur en cm	80
D Diamètre interne en cm	9
L/D	9

Tableau 33 : Données initiales du montage expérimental lit fixe vertical

Volume utile total en L	3,4
Volume du lit de billes en L	0,72
Porosité du lit de billes	0,33
Volume de liquide en L	2,9

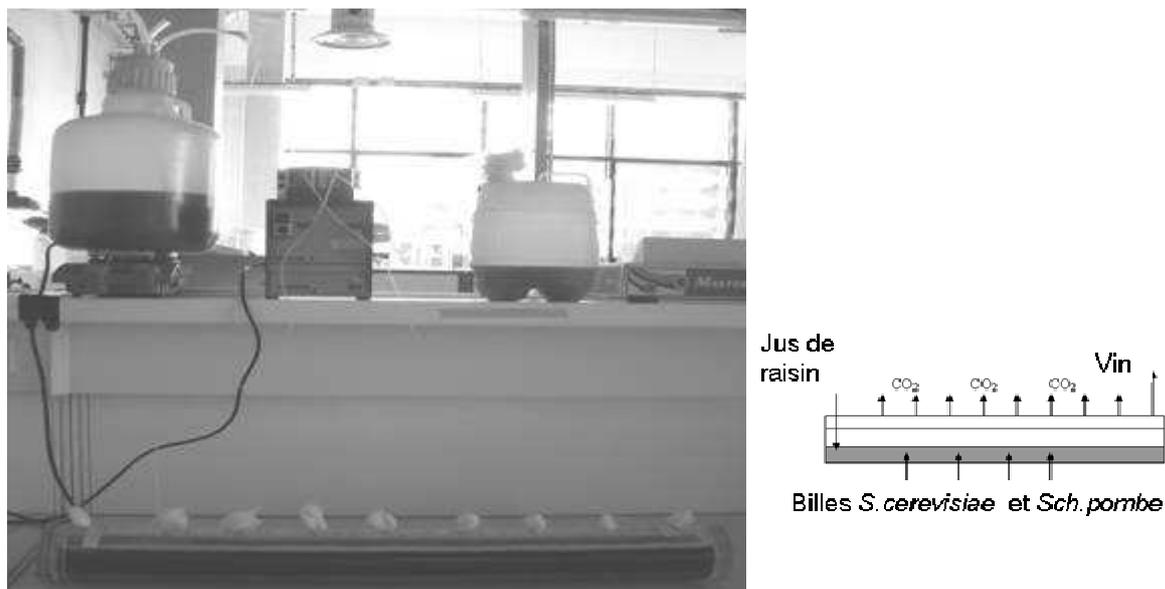


Figure 57 : Photo du montage expérimental du réacteur lit fixe horizontal continu

Après une première phase d'acclimatation réalisée dans les mêmes conditions que précédemment, la colonne est chargée en billes puis fermée de façon étanche. Le jus commercial supplémenté est ensuite ajouté. Un fonctionnement en batch est maintenu jusqu'à atteindre la concentration en sucres résiduels cible de  $10 \text{ g.L}^{-1}$  puis le continu est démarré avec alimentation du jus et soutirage du vin avec la même pompe utilisée précédemment. La colonne n'étant pas équipée d'une double enveloppe, aucun système de refroidissement n'a été mis en place. Les résultats obtenus à température ambiante (environ  $30^\circ\text{C}$ ) seront donc extrapolés à  $20^\circ\text{C}$ .

### III.2. Analyse des cinétiques

#### III.2.1 Evolution des fermentations pendant la phase de batch.

Les cinétiques de fermentation alcoolique et maloalcoolique de la phase de démarrage du réacteur lit fixe horizontal sont données en Figure 58.

D'après la Figure 58, l'évolution de la consommation des sucres pendant la phase batch de ce montage semble similaire à la cinétique obtenue lors du 3<sup>e</sup> cycle des essais en batch. Cependant, la température du milieu étant de  $26^\circ\text{C}$ , la vitesse moyenne de consommation des sucres recalculée pour une température de  $20^\circ\text{C}$  ne montre pas de différence par rapport au batch (Tableau 34).

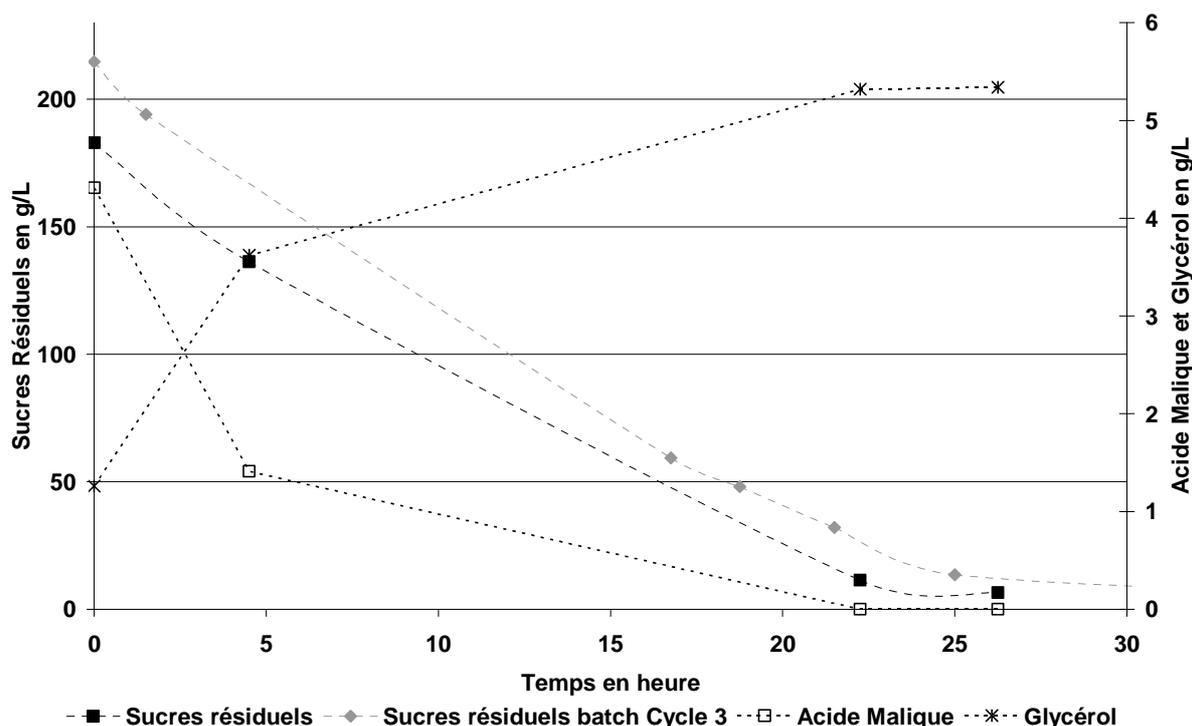


Figure 58 : Evolution des substrats et produits pendant la phase de démarrage du continu en réacteur lit fixe horizontal à 50,4 g.L<sup>-1</sup> de billes de *S.cerevisiae* et 56,7 g.L<sup>-1</sup> de billes de *Sch.pombe*

Tableau 34 : Comparaison des vitesses de consommation des sucres en essai batch et au démarrage du continu en réacteur lit fixe horizontal à 50,4 g.L<sup>-1</sup> de billes de *S.cerevisiae* et 56,7 g.L<sup>-1</sup> de billes de *Sch.pombe*

Concentration en billes de <i>S.cerevisiae</i> en g.L <sup>-1</sup> / Essai	39,5 / Batch	50,4 / continu piston horizontal	
Température en °C	20	26	20
'Cycle' considéré	1	Batch	Extrapolation
Vitesse phase rapide en g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	- 3,96	-7,71	- 4,18
Gain / Ralentissement en %	-	-	+ 5

D'un point de vue de la fermentation maloalcoolique, celle-ci est réalisée en une vingtaine d'heures soit presque deux fois plus que lors des essais de double fermentation en batch. Après correction en température (Tableau 35), la vitesse est de 74 % inférieure à celle obtenue en batch. Une explication peut être une limitation de la fluidisation qui ne permettrait pas d'assurer un brassage au sein du réacteur. Ainsi, l'accès à l'acide malique pourrait être plus réduit dans cette configuration par rapport au batch qui lui était agité à 100 rpm.

Tableau 35 : Comparaison des vitesses de dégradation de l'acide malique en essai batch et au démarrage du continu en réacteur lit fixe horizontal à 50,4 g.L<sup>-1</sup> de billes de *S.cerevisiae* et 56,7 g.L<sup>-1</sup> de billes de *Sch.pombe*

Concentration en billes de <i>Sch.pombe</i> en g.L <sup>-1</sup> / Essai	39,5 / Batch	56,7 / continu piston horizontal	
Température en °C	20	26	20
'Cycle' considéré	1	Batch	Extrapolation
Vitesse phase rapide en g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	<b>-0,431</b>	-0,194	<b>- 0,112</b>
Gain / Ralentissement en %	-	-	<b>- 74</b>

## IV.2.2 Analyse des cinétiques durant la phase en continu

Dans cette configuration, il semble impossible d'atteindre les objectifs de fonctionnement, à savoir 10 g.L<sup>-1</sup> de sucres réducteurs et 0-0,5 g.L<sup>-1</sup> d'acide malique, en un temps raisonnable (Figure 59). En effet, en appliquant un taux de dilution de 0,02 h<sup>-1</sup> soit un temps de séjour de 50 h, les sucres résiduels se stabilisent autour de 11-12 g.L<sup>-1</sup> et l'acide malique autour de 0,5 g.L<sup>-1</sup> soit 4 g.L<sup>-1</sup> d'acide consommés.

Afin d'évaluer l'influence d'un plus fort taux de dilution sur la cinétique, nous avons appliqué un taux de dilution supérieur de 0,035 h<sup>-1</sup>, soit un temps de séjour de 28,5 h. Avec ce taux de dilution, la concentration en sucres résiduels augmente à 13-14 g.L<sup>-1</sup> et celle en acide malique à 1,5 g.L<sup>-1</sup>.

Dans cette configuration horizontale, il faut donc effectivement un temps de séjour supérieur à 50 h pour atteindre en sortie les concentrations cibles.

Au niveau du glycérol, la concentration se stabilise à 5,3 g.L<sup>-1</sup> soit du même ordre de grandeur qu'en configuration verticale.

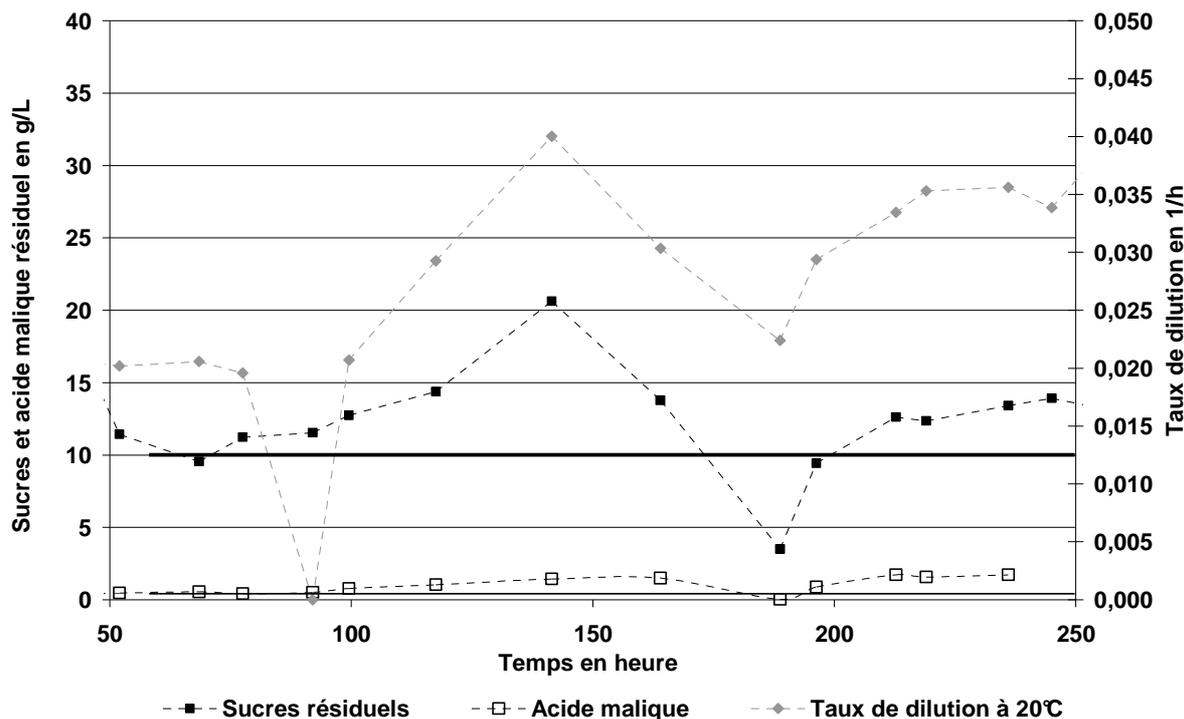


Figure 59 : Suivi cinétique du lit fixe horizontal fonctionnant en continu à  $50,4 \text{ g.L}^{-1}$  de billes de *S.cerevisiae* et  $56,7 \text{ g.L}^{-1}$  de billes de *Sch.pombe*

Nous constatons donc un écart de performance entre les configurations verticale et horizontale, contraire aux résultats de Shiotani et Yamané (1981) qui ont obtenu une amélioration de productivité de 30 %.

Pour essayer d'expliquer ce phénomène, nous avons effectué un traçage au bleu de méthylène.

Comme le montre les photos ci-après (Figure 60), ce traçage montre que le liquide injecté au sein du lit passe rapidement dans la 'phase liquide' et en conséquence ne traverse pas l'intégralité du lit comme c'est le cas en configuration verticale. Il y a donc dans le cas de notre configuration horizontale, existence d'un chemin préférentiel qui engendre une perte d'efficacité au niveau de la fermentation. Ce phénomène de court-circuit avait déjà été observé par Shiotani et Yamané (1981) et par Axelsson (1988) sur des réacteurs non compartimentés. Cependant dans leurs études, les temps de séjour et débits d'alimentation appliqués, étaient bien plus importants que dans notre essai. Nous espérons donc avoir un débit suffisamment faible pour ne pas observer de court-circuit, ce qui n'a pas été le cas.

Afin d'évaluer réellement les performances de cette configuration horizontale, des améliorations devraient être faites pour notamment maintenir l'alimentation au sein du lit et supprimer ces courts-circuits.

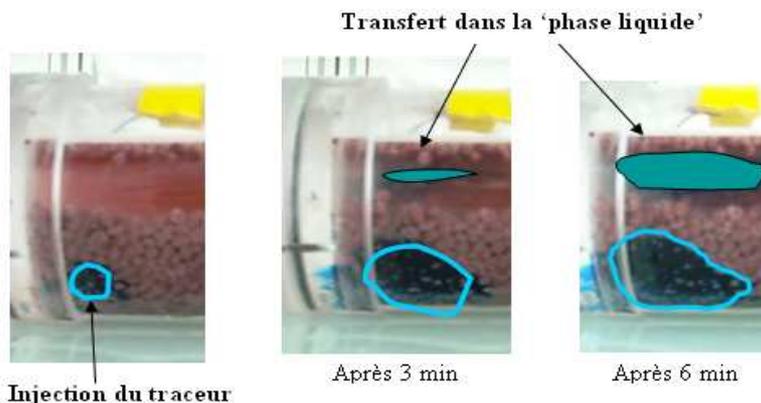


Figure 60 : Photos illustrant le traçage au bleu de méthylène de l'alimentation du réacteur lit fixe horizontal continu

#### IV. Comparaison des 3 montages étudiés

Pour conclure sur ce chapitre, un récapitulatif des trois essais est donné dans le tableau ci-dessous (Tableau 36).

Tableau 36 : Synthèse des résultats obtenus dans les 3 configurations continues testées à l'échelle laboratoire

Montage	Lit fluidisé recirculé vertical	Lit fixe vertical	Lit fixe horizontal
Fermentation(s)	Alcoolique	Alcoolique et maloalcoolique	Alcoolique et maloalcoolique
Concentration(s) <i>S.cerevisiae</i> / <i>Sch.pombe</i> en g.L <sup>-1</sup>	39,5	45,6 / 50,6	50,4 / 56,7
Volume réactionnel en L	3,2	1,0	3,4
H/D utile	6,5	3	10
Temps séjour en h	36	20 à 35	≥ 50
Sucres résiduels minimum en g.L <sup>-1</sup>	10	10	11-12
Acide Malique résiduel en g.L <sup>-1</sup>	-	0 à 0,5	1 à 1,5
Durée de fonctionnement en jours	23	28	10
Commentaires	Débit de fluidisation important Impact organoleptique négatif	Possible problème de rétention de gaz à l'échelle industrielle	Chemin préférentiel du liquide au sein du lit Problème d'extrapolation à l'échelle industrielle

D'après ces résultats, il semble que le lit fixe vertical soit le montage le plus approprié pour la suite du travail.

D'un point de vue cinétique, il s'agit du montage le plus performant des trois. En moins de deux jours de fermentation, nous obtenons un vin avec un maximum de  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de sucres résiduels et  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  d'acide malique. Le montage type lit fluidisé est également correct au niveau cinétique. Cependant, en se projetant à l'échelle industrielle, il apparaît clairement que la recirculation ne pourra être appliquée, elle engendrerait des coûts trop importants. De plus, la mise en place d'une recirculation risque d'avoir un impact organoleptique négatif sur le vin produit.

Le lit fixe, quant à lui, ne pose aucun problème d'extrapolation en soi. Néanmoins, le problème de rétention de gaz à l'échelle pilote et industrielle reste un point critique à étudier, ce que nous avons fait sur une installation pilote lors de la campagne de vendanges 2010.

**Partie V :**  
**Validation du procédé à l'échelle pilote**  
**en conditions industrielles**



Après avoir déterminé, en laboratoire, la meilleure configuration du procédé de vinification en continu, un test en conditions réelles doit être réalisé afin de valider ou non le procédé développé. Cet essai a été mené à la cave de Rabastens au cours de la campagne de vendanges de 2010 dans un pilote de 170 L.

## I. Matériel et méthodes

### I.1. Jus de raisin

L'essai pilote est réalisé sur du moût en phase liquide thermotraité et filtré, produit à Rabastens lors de la campagne 2010. Négrette, Gamay, et Duras constituent les cépages principaux de ce moût.

Un sulfitage systématique du raisin à  $5 \text{ g.hL}^{-1}$  est effectué au quai de réception. Et un ajout de  $225 \text{ mg.L}^{-1}$  d'azote sous forme  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a lieu afin de s'affranchir des éventuelles carences. Les caractéristiques moyennes du jus industriel sont présentées dans le Tableau 37.

Tableau 37 : Caractéristiques moyennes du jus de fermentation produit à Rabastens sur la campagne 2010

Sucres en $\text{g.L}^{-1}$	Alcool potentiel en (v/v)	Acide Malique en $\text{g.L}^{-1}$	pH	Acidité totale en $\text{gH}_2\text{SO}_4.\text{L}^{-1}$	Acidité volatile en $\text{gH}_2\text{SO}_4.\text{L}^{-1}$	SO <sub>2</sub> libre en $\text{mg.L}^{-1}$	SO <sub>2</sub> total en $\text{mg.L}^{-1}$
200	11,5	3	3,4	6	0	10	15

### I.2. Levures

Les levures utilisées dans cet essai sont les mêmes que précédemment. Les concentrations appliquées sont identiques aux essais laboratoires.

### I.3. Montage expérimental

Le pilote de 170 L (Figure 61) est fourni par la société Proenol qui dispose d'un réacteur correspondant à nos critères : diamètre de 40 cm, hauteur effective d'environ 120 cm soit un rapport H/D de 3.

Ce réacteur dispose d'une double enveloppe permettant le maintien en température. Dans notre cas, seul un branchement sur le réseau d'eau froide a pu être réalisé, le contrôle en température ne correspondra donc qu'à un refroidissement effectué de façon manuelle par ouverture et fermeture de la vanne du réseau d'eau froide.

Deux grilles, une en bas et une en haut, assurent le maintien de l'ensemble des billes dans le réacteur.

Une série de deux hublots disposés sur un côté du réacteur permet d'observer l'évolution du lit de billes ainsi que le bon fonctionnement du réacteur au niveau des dégagements de gaz.

En fonctionnement continu, l'alimentation est réalisée par le bas au moyen d'une pompe péristaltique série DS-M (Bombas Boyser, Espagne) fonctionnant avec un tube Norprene® A-60-F de diamètre interne 8 mm. Le jus est récupéré chaque jour de rentrée de raisin dans des bidons de 30, 60 et 120 L. Pour les week-ends, les jours sans raisin et la fin des vendanges, le jus est récupéré, stocké à 4°C et utilisé en fonction des besoins.

Le soutirage est réalisé par surverse.



Figure 61 : Photo du montage expérimental pilote (170 L)

A partir des essais laboratoire, nous avons calculé les temps de fermentation et débits théoriques extrapolés au pilote ainsi que la quantité de moût nécessaire sur l'ensemble de la campagne en considérant 4 semaines de fonctionnement continu. Les résultats sont donnés dans le Tableau 38.

Tableau 38 : Paramètres prévisionnels du fonctionnement continu du pilote (170 L)

Volume réacteur en L	170
Concentration en billes de <i>S.cerevisiae</i> / <i>Sch.pombe</i> en g.L <sup>-1</sup>	34/42
Volume du lit de billes en L	56,6
Volume de liquide en L	132,1
Vitesse consommation sucres phase rapide en g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	6,5
Temps de fermentation batch en h	35
Temps de séjour en h	30-40
Débit d'alimentation en L.h <sup>-1</sup>	3,75-5
Volume de moût total nécessaire sur la campagne en hL	40-50

#### I.4. Préparation des levures *S.cerevisiae* et *Sch.pombe* et démarrage du procédé continu

Compte tenu de l'inhibition de croissance observée lors d'un mélange *S.cerevisiae* et *Sch.pombe* (Yokotsuka et al. 1993), la préparation des billes de *S.cerevisiae* et *Sch.pombe* est faite séparément. Dans un premier temps, nous procédons à la réhydratation des billes *Sch.pombe* dans le réacteur en suivant le protocole classique (Partie III, paragraphe I.3.2). Puis une première phase d'acclimatation, c'est à dire une phase de batch de 48 h, est réalisée sur du jus de raisin. Les billes de *S.cerevisiae* sont ensuite réhydratées dans la solution de glucose dans un bidon de 30 L. Enfin, une fois cette étape terminée, les billes sont réunies dans le réacteur et une deuxième phase de batch de 48 h, permettant l'acclimatation des levures *S.cerevisiae*, est lancée.

Bien que la réalisation de toutes ces étapes soit relativement longue et lourde, nous avons choisi de maintenir exactement les mêmes conditions qu'en laboratoire afin d'éviter toute déviation possible dans la suite des essais. Une fois la deuxième phase d'acclimatation terminée, nous procédons à la 'véritable' phase de batch à la suite de laquelle l'alimentation continue est lancée.

#### I.5. Suivi de la double fermentation continue

Au cours de la double fermentation, nous avons suivi la température et mesuré la hauteur du lit de billes.

Les échantillons prélevés et préalablement filtrés, ont été analysés sur un analyseur œnologique (Bacchus Microdom) basé la spectrométrie moyen Infra Rouge :

- titre alcoolique volumétrique en % (v/v) ;
- sucres réducteurs et glucose/fructose en g.L<sup>-1</sup> ;
- acidité totale en gH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup> et acidité volatile en gH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.

L'acide malique et le glycérol sont mesurés, comme lors des précédents essais, par méthode enzymatique.

A chaque prélèvement, nous avons également dénombré la population de levures planctoniques.

Enfin des dégustations régulières ont été faites sur le vin produit afin de vérifier l'absence de défaut et détecter les possibles déviations liées au procédé.

### I.6. Analyse du profil aromatique

Les esters d'acétate (Acétate d'isoamyle, Butyrate d'éthyle, Hexanoate d'éthyle, Octanoate d'éthyle, Décanoate d'éthyle, Acétate d'hexyle et Acétate de phényléthyle), porteur des notes aromatiques du vin, ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse avec détecteur FID au CRAO en sous traitance.

## II. Déroulement des essais

Dans le Tableau 39 ci-dessous, apparaît le planning des essais tels qu'ils se sont déroulés pendant les vendanges 2010.

Tableau 39 : Planning de l'essai pilote sur les vendanges 2010

Semaine	Dates	Actions	Besoins en moût
36	du 06/09 au 12/09	- Installation pilote - 10/09 Réhydratation des billes de <i>Sch.pombe</i> - 10/09 Acclimatation des billes de <i>Sch.pombe</i>	170 L
37	du 13/09 au 19/09	- 13/09 Réhydratation des billes de <i>S.cerevisiae</i> - 13/09 Vidange du réacteur et acclimatation des billes <i>Sch.pombe</i> et <i>S.cerevisiae</i> sur moût - 15/09 Vidange du réacteur et début de la fermentation ( $\approx$ 30-50 h de batch théoriquement) - 17/09 Mise en fonctionnement continu ( $\approx$ 4 L/h soit $\approx$ 30 h de temps de séjour) Récupération du moût et stockage à 4°C	170 L 170 L A partir du 17/09
38 à 41	du 20/09 au 17/10	- Fonctionnement du continu ( $\approx$ 4 L/h soit $\approx$ 30 h de temps de séjour)	100 L par jour
42	du 18/10 au 19/10	- Arrêt continu	

### III. Résultats cinétiques

#### III.1 Analyse de la mise en route du réacteur

L'acclimatation de *Sch.pombe* a été réalisée au sein du réacteur, sur du jus thermotraité industriel. Au cours de cette étape, nous avons suivi la température, la concentration en sucres et la population dans la phase liquide (Tableau 40).

A la lecture du tableau ci-dessous, nous constatons qu'une fermentation alcoolique spontanée, causée par les levures indigènes de *S.cerevisiae* présentes, a eu lieu. Cela signifie donc que l'étape d'acclimatation des billes de *Sch.pombe* pour une bonne croissance donc en l'absence totale de *S.cerevisiae* a été un échec.

Cette étape, mise en place à l'échelle laboratoire, ne semble finalement pas réalisable facilement en conditions industrielles. Donc, à moins qu'il n'y ait un impact négatif sur la fermentation, une solution serait de réaliser cette phase d'acclimatation sur du concentré de jus de raisin ou même, de la supprimer complètement.

Tableau 40 : Suivi de la phase d'acclimatation des *Sch.pombe* lors du démarrage de l'essai pilote (150 L)

Temps d'acclimatation en heure	Température en °C	Sucres résiduels en g.L <sup>-1</sup>	Population <i>S.cerevisiae</i> dans la phase liquide en cellules.mL <sup>-1</sup>
0	23	200,9	-
17	19,9	159,8	9,38.10 <sup>5</sup>
40	23	109,6	4,66.10 <sup>7</sup>
47	21	93,62	2,97.10 <sup>7</sup>

Au niveau du réacteur, comme nous le souhaitions, une bonne fluidisation du lit a été observée. Par contre, nous avons également remarqué que le joint de la grille supérieure ne garantissait pas l'étanchéité, une partie des billes passent et restent en dessus de la grille comme le montre la Figure 62.



Figure 62 : Photo de la grille supérieure du pilote après la phase d'acclimatation des *Sch.pombe*

Pour *S.cerevisiae*, l'acclimatation des billes s'est faite en mélange avec les billes de *Sch.pombe* dans le réacteur. Les mêmes paramètres ont été suivis (Tableau 41).

D'après nos résultats, une bonne fermentation alcoolique a eu lieu. La vitesse de consommation des sucres lors de cette étape est sensiblement la même que celle obtenue lors des essais laboratoire, - 4,1 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> pour le pilote contre - 4,2 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> pour le 1<sup>er</sup> cycle batch.

De même, nous constatons une évolution de la population en *S.cerevisiae* dans la phase liquide identique. Dès les premières heures, la population dans la phase liquide augmente, et atteint déjà les  $10^7$  cellules.mL<sup>-1</sup> après seulement 17 h de culture.

Tableau 41 : Suivi de la phase d'acclimatation des *S.cerevisiae* lors du démarrage de l'essai pilote (170 L)

Temps de fermentation en heure	Température en °C	Sucres résiduels en g.L <sup>-1</sup>	Acide malique en g.L <sup>-1</sup>	Population <i>S.cerevisiae</i> dans la phase liquide en cellules.mL <sup>-1</sup>
0	20	204,4	-	-
17	13	132,1	-	$1,19.10^7$
25	20	106,2	-	$1,72.10^7$
41	19	22,3	0,3	$2,06.10^7$
50,5	19	7,8	0	$3,59.10^7$

On notera aussi que du fait de cette bonne fermentation, la formation de mousse a été importante. Compte tenu de l'effet de la mousse sur les billes, (les billes restent piégées dans la mousse et ne sont donc plus en contact avec le moût), nous avons ajouté dans les premières heures de fermentation un volume de 30 mL d'huile alimentaire comme antimousse soit 0,02 %.

Malgré de bonnes vitesses de fermentations alcoolique et maloalcoolique pendant l'acclimatation des billes, l'étape de batch prévue initialement a été réalisée afin de rester au plus près des conditions laboratoire. Cependant, nous noterons que pour la suite des essais, celle-ci n'est pas indispensable.

Cette étape batch (Tableau 42) a été réalisée sur un jus conservé quelques jours à 4°C. Comme pour l'acclimatation des *S.cerevisiae*, un volume de 30 mL d'huile alimentaire a été ajouté en début de fermentation pour limiter la formation de mousse, le débordement du réacteur et donc la perte de billes.

D'autre part, nous avons dû, après 40h de culture, procéder à un ajustement de volume par addition de jus frais afin de remonter le volume au niveau de la vanne de sortie. Ceci a également permis de remonter le taux d'alcool de fonctionnement du continu qui n'était que de 10 % (v/v) donc insuffisant pour un essai en continu représentatif.

D'un point de vue cinétique, la vitesse de consommation des sucres a été du même ordre que lors de l'acclimatation en culture mixte et lors des essais laboratoire, à savoir  $4 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  à une température variant de 16 à 20°C.

Au niveau de l'acide malique, la vitesse 'initiale' a été de l'ordre de  $0,1 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  comme en laboratoire.

Au total, la phase de batch après ajout de moût a duré 46 h soit 10 h de plus qu'en laboratoire, mais à des températures en moyenne inférieures à celles du laboratoire.

D'un point de vue organoleptique, le produit obtenu ne présentait pas de défaut. Mais il restait assez acide, agressif, évolué, alcoolique avec un nez 'levures' probablement du fait d'un temps de contact avec les billes un peu trop important en fin de fermentation.

Tableau 42 : Suivi de la phase batch de l'essai pilote (170 L) réalisés sur 34 g.L<sup>-1</sup> de billes de *S.cerevisiae* et 42 g.L<sup>-1</sup> de billes de *Sch.pombe*

Temps de fermentation en heure	Température en °C	Sucres résiduels en g.L <sup>-1</sup>	Acide malique en g.L <sup>-1</sup>	Population <i>S.cerevisiae</i> dans la phase liquide en cellules.mL <sup>-1</sup>
0	16	168,95	2,82	1,75.10 <sup>6</sup>
13,75	14	108,7	0,89	5,71.10 <sup>6</sup>
21,5	15,5	92	0,37	-
37,75	19	10,6	0	1,56.10 <sup>6</sup>
42,25	17	17	0,24	-
46,25	19	9,8	0,14	2,03.10 <sup>6</sup>

### III.2 Analyse du fonctionnement en continu

L'objectif de cette campagne a été de faire fonctionner le réacteur, en continu, de façon stable, avec du jus industriel pendant le plus longtemps possible.

Un fonctionnement stable du réacteur a pu être observé pendant un total de 28 jours (Figure 63).

Lors de la mise en route, nous nous sommes basés sur la vitesse de consommation des sucres dans la phase de batch (4 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) pour calculer le débit théorique (entre 4 et 5 L.h<sup>-1</sup>) et donc le taux de dilution théorique (0,025-0,03 h<sup>-1</sup>).

Après 3 jours de fonctionnement continu, un premier régime stable a été observé. Cependant, du fait d'un doute sur la qualité microbiologique de la matière première, nous avons coupé l'alimentation pendant 24 h, cassant ainsi le régime stationnaire qui était en train de s'établir. Cette coupure n'a duré finalement que 24 h et le continu a ensuite fonctionné quasi sans interruption (sauf arrêts ponctuels de quelques heures par colmatage de l'alimentation par des précipités d'acide tartrique) à l'exception d'un arrêt de 24 h par manque de matière première à mi-campagne.

En plus des contraintes au niveau de l'alimentation, un autre facteur a participé à la fluctuation du système : la température. En effet, aucun contrôle de température n'étant placé sur le réacteur, nous avons procédé manuellement à la prise des mesures et agi sur le refroidissement en fonction. D'autre part, lorsqu'un réchauffement du réacteur était nécessaire, aucune action corrective n'a pu être mise en œuvre faute de branchement sur l'eau chaude disponible.

Malgré les interruptions d'alimentation et les variations de température, nous constatons, d'après la Figure 63, que le régime stationnaire s'est établi rapidement à un taux de dilution de 0,035 h<sup>-1</sup> soit un temps de séjour de 28,5 h, avec une stabilisation des sucres réducteurs en sortie entre 6 et 9 g.L<sup>-1</sup> et en acide malique autour de 0,5 g.L<sup>-1</sup>.

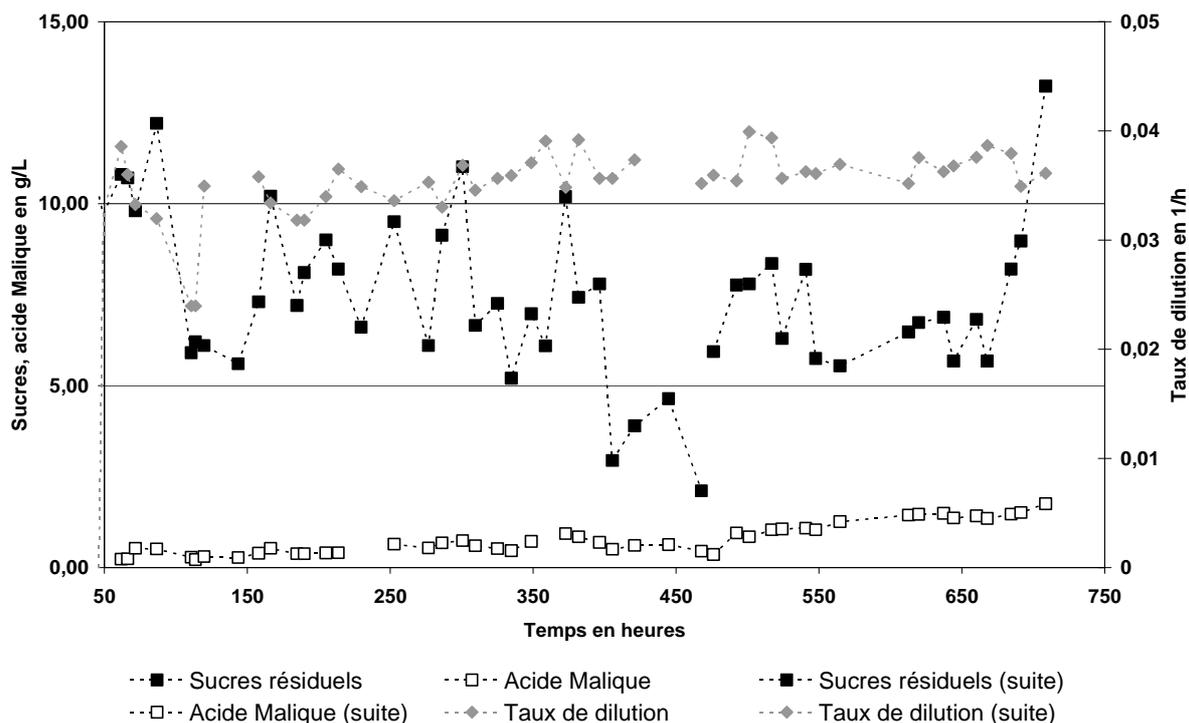


Figure 63 : Suivi du fonctionnement en continu du réacteur pilote (170 L) à  $34 \text{ g.L}^{-1}$  de billes de *S.cerevisiae* et  $42 \text{ g.L}^{-1}$  de billes de *Sch.pombe*

En termes de vitesse de consommation des sucres (Figure 64), une moyenne de  $7 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  est atteinte sur l'ensemble de l'essai, soit la même valeur qu'en laboratoire (entre  $4$  et  $6 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  pour sortir à  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de sucres résiduels) pour une population en phase liquide du même ordre de grandeur autour de  $10^7 \text{ cellules.mL}^{-1}$ . Enfin, mis à part quelques décrochages, conséquences des petits arrêts d'alimentation, une bonne stabilité a été observée jusqu'à la fin. Pour l'acide malique, la vitesse calculée par rapport à une concentration en entrée moyenne de  $4 \text{ g.L}^{-1}$ , reste relativement stable autour de  $0,08$ - $0,12 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Par contre, la concentration en acide malique en sortie n'est pas constante et une déviation est visible sur la fin de campagne. La concentration, qui était de  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  en moyenne pendant les premiers quinze jours, augmente progressivement jusqu'à atteindre  $1,5$  à  $2 \text{ g.L}^{-1}$  d'acide malique.

Une des explications de ce phénomène est que la concentration en acide malique dans le moût est plus faible vers la fin de la campagne, ce qui engendrerait un ralentissement des cinétiques de dégradation comme observé par Taillandier et al. en 1990. Mais par manque de données, nous ne pourrions pas valider cette hypothèse.

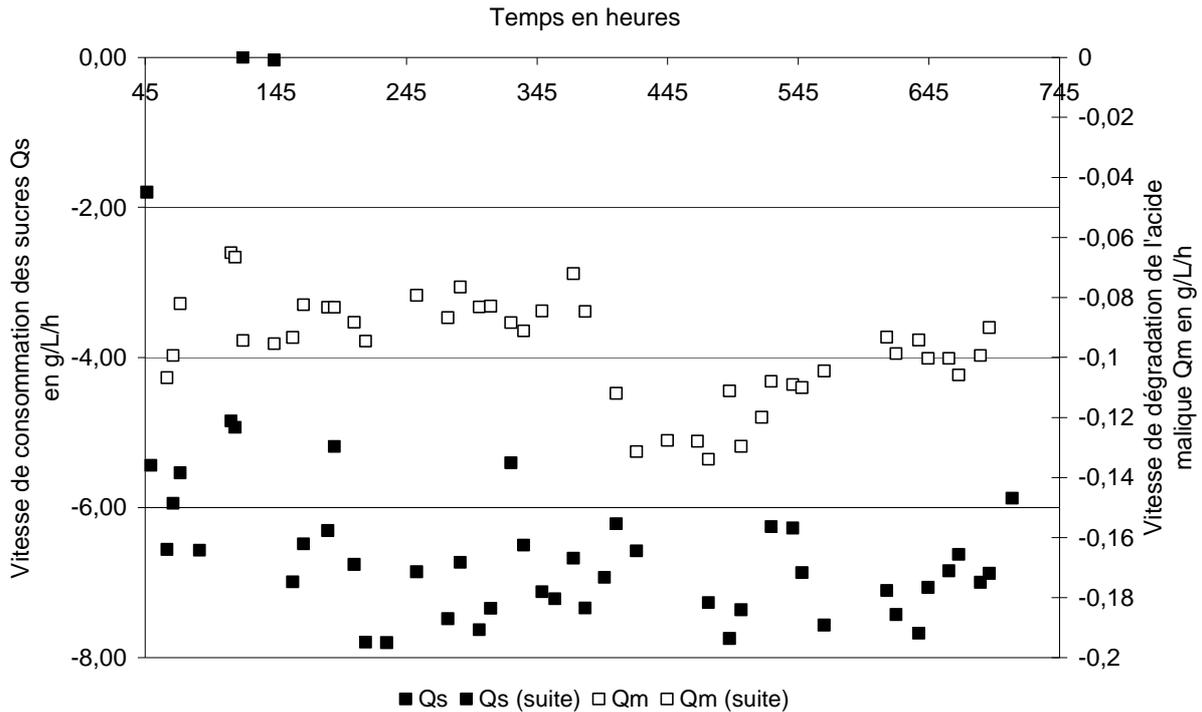


Figure 64 : Vitesses de fermentations alcoolique et maloalcoolique au cours du fonctionnement continu en réacteur pilote (170 L) à  $34 \text{ g.L}^{-1}$  de billes de *S.cerevisiae* et  $42 \text{ g.L}^{-1}$  de billes de *Sch.pombe*

Au niveau des caractéristiques du vin produit (Figure 65), nous retrouvons un niveau d'éthanol moyen aux alentours de 11 % (v/v). Le dosage du glycérol montre une production constante autour de  $4,7 \text{ g.L}^{-1}$ .

L'acidité totale varie autour de  $3 \text{ g H}_2\text{SO}_4.\text{L}^{-1}$ . Cette valeur, faible par rapport à la matière première (acidité totale entre  $4,5$  et  $7 \text{ g H}_2\text{SO}_4.\text{L}^{-1}$ ), vient du fait que le jus utilisé dans la phase de batch a été conservé à  $4^\circ\text{C}$  pendant 24 h, ce qui a engendré une précipitation partielle de l'acide tartrique et donc participé à la diminution de l'acidité totale. De plus, il est à noter que environ 33 % du jus utilisé a suivi le même chemin.

Enfin, le dernier paramètre, l'acidité volatile reste stable tout au long du continu avec une valeur moyenne de  $0,1 \text{ gH}_2\text{SO}_4.\text{L}^{-1}$  ce qui montre bien qu'aucune déviation métabolique n'a eu lieu, ceci ayant été confirmé par une dégustation.

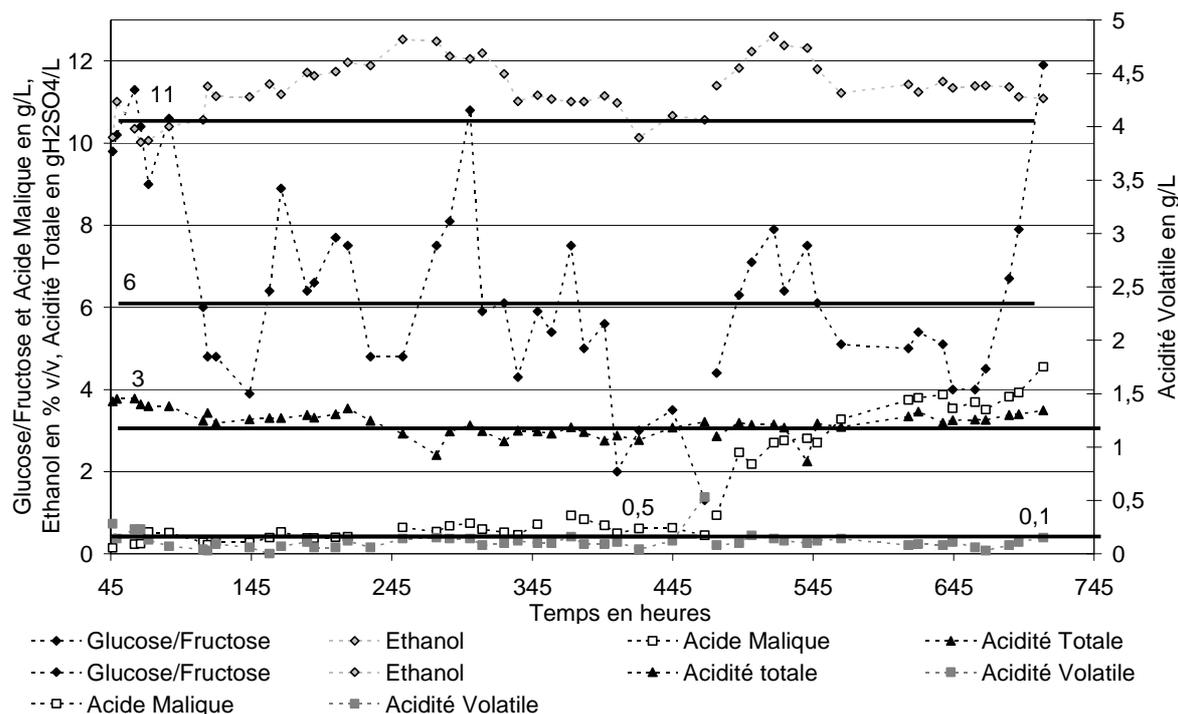


Figure 65 : Evolution des substrats et produits de fermentation au cours du fonctionnement continu en réacteur pilote (170 L) à  $34 \text{ g.L}^{-1}$  de billes de *S.cerevisiae* et  $42 \text{ g.L}^{-1}$  de billes de *Sch.pombe*

Si nous effectuons un bilan matière sur l'ensemble de la production (Tableau 43), nous nous rendons compte que 47,6 % du sucre sert à la production d'éthanol, 0,2 % à la production de biomasse et 2,5 % à la production du glycérol, valeurs identiques aux essais laboratoire. Si nous considérons le rendement  $Y_{\text{CO}_2\text{E}}$  de 1,0 g de  $\text{CO}_2/\text{g}$  d'éthanol obtenu en laboratoire, environ 47,6 % du sucre partent dans la production de  $\text{CO}_2$ . Le bilan carbone boucle donc à 97,9 %. Ainsi, en comparant les essais laboratoire et pilote, nous n'observons aucune déviation du déroulement des fermentations que cela soit au niveau des produits ou au niveau des vitesses.

Tableau 43 : Rendements et bilan matière calculés sur l'ensemble de la production pilote (170 L)

$Y_{\text{ES}}$ en %	47,6
$Y_{\text{XS}}$ en %	0,2
$Y_{\text{GS}}$ en %	2,5
$Y_{\text{CO}_2\text{S}}$ en %	47,6
Bilan matière en %	97,9

### III.3 Evolution du lit au cours du fonctionnement continu

Malgré les étapes d'acclimatation précédant le fonctionnement continu, les billes ont tendance à grossir. Cette augmentation de taille (Figure 66) a lieu principalement lors des 10 à 15 premiers jours de fonctionnement conformément à ce que nous avons déjà remarqué en laboratoire.

Cette augmentation de la taille des billes entraîne une diminution du volume de liquide d'environ 10 % soit une diminution du temps de séjour d'environ 3 h.

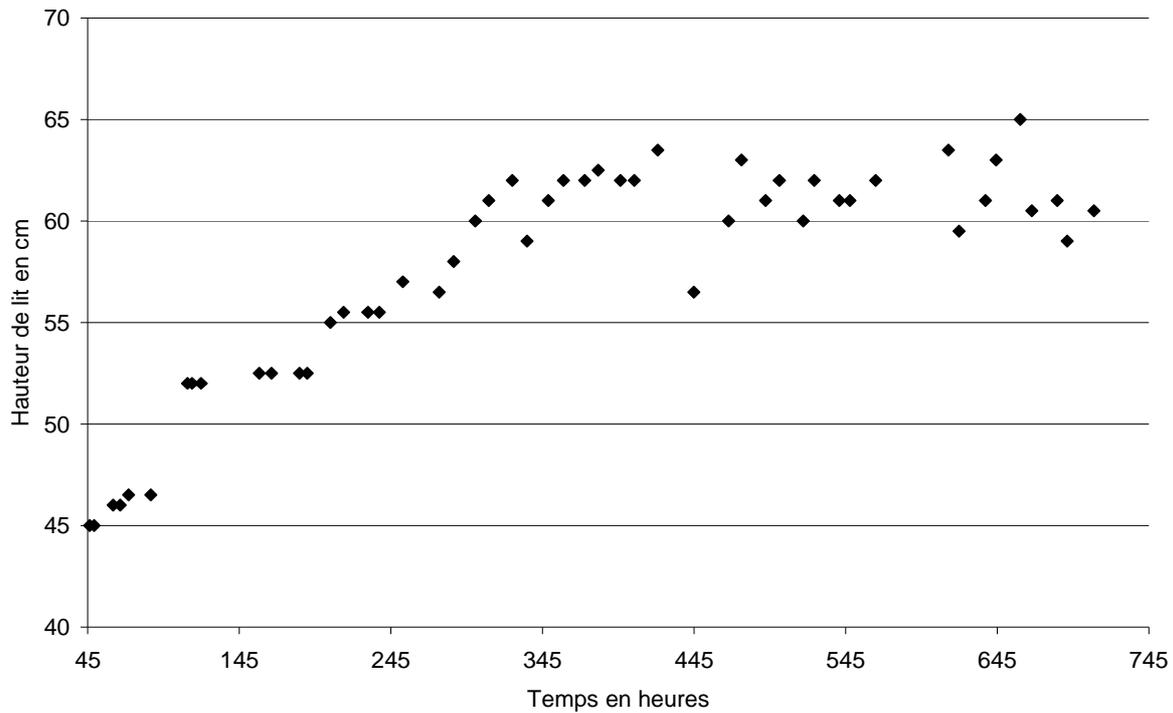


Figure 66 : Evolution de la hauteur du lit de billes au repos au cours de l'essai pilote

### III.4 Rétention de CO<sub>2</sub> et fluidisation spontanée

Au cours de ces essais, nous craignons d'observer des problèmes de rétention de gaz au sein du lit. En effet, en régime stationnaire, nous pouvons considérer une production de CO<sub>2</sub> de l'ordre de 2,3 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> soit 1,2 L.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> ( $Q_{CO_2} = Q_{EtOH} * M_{CO_2} / M_{EtOH}$ ) avec 1,4 g.L<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub> dissous dans le vin à 20 °C (Figure 67).

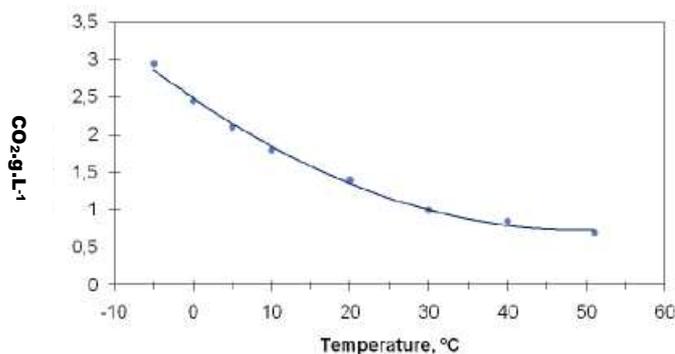


Figure 67 : Solubilité du CO<sub>2</sub> dans un vin de table sec en fonction de la température (Boulton et al. 1996)

Finalement, malgré le changement d'échelle, aucun problème n'a été détecté. Si nous considérons la pression en base du lit de billes, nous constatons que celle-ci n'est pas énorme puisqu'elle est de 1,089 bar. Elle est donc probablement insuffisante pour créer des problèmes et les billes sont mises en suspension régulièrement par fluidisation par le CO<sub>2</sub> produit.

Si nous réfléchissons maintenant à l'extrapolation industrielle (par exemple H\*10), la pression en base du lit de billes sera de l'ordre de 1,9 bars soit presque double par rapport au pilote. A cette pression, la solubilité du CO<sub>2</sub> serait de l'ordre de 3 g.L<sup>-1</sup> (Figure 68). En considérant les mêmes performances cinétiques, le débit de gaz produit devrait rester inchangé. La part de gaz dissous sera donc toujours négligeable et le débit de gaz suffisant pour prévenir la rétention de gaz au sein du lit. Bien évidemment, il serait intéressant de vérifier cette théorie par l'expérience.

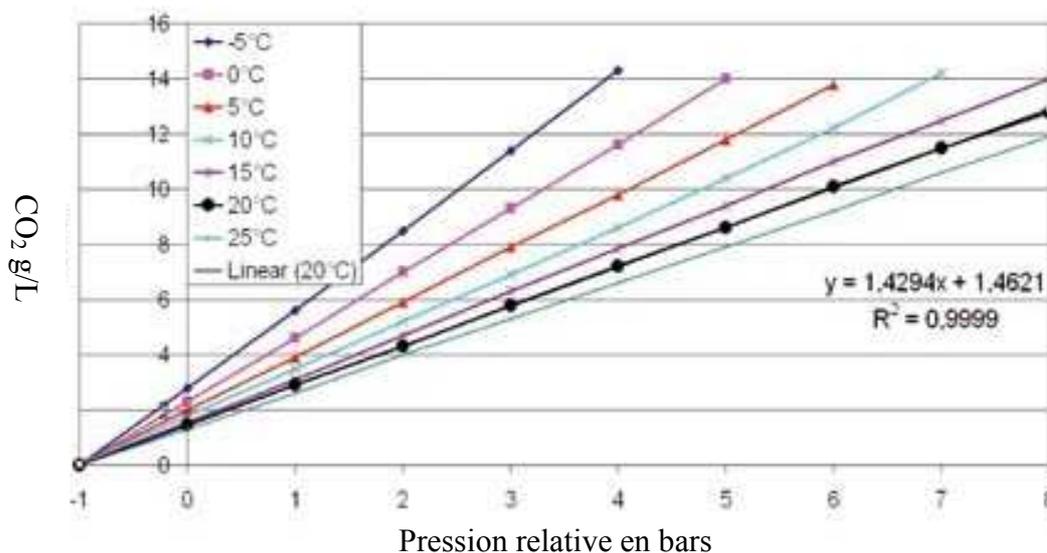


Figure 68 : Solubilité du CO<sub>2</sub> selon la température et la pression  
Source : Inoxview, la lettre Inoxpa secteur oenologique

### III.5 Analyse du profil aromatique

Parmi les prélèvements réalisés en cours de campagne, trois d'entre eux ont fait l'objet d'une analyse du profil aromatique (Tableau 44). A titre informatif, les profils obtenus sur les vins produits à la cave sont également présentés (Tableau 45).

Tableau 44 : Profil aromatique des vins produits en continu lors de l'essai pilote (170 L) en 2010

Molécule en $\mu\text{g.L}^{-1}$	Produits Pilote			
	Echantillon A	Echantillon B	Echantillon C	Moyenne
Acétate d'isoamyle	4690	4564	3594	4283 $\pm$ 600
Butyrate d'éthyle	< 400	< 400	< 400	< 400
Hexanoate d'éthyle	708	659	831	733 $\pm$ 89
Octanoate d'éthyle	922	1017	1014	984 $\pm$ 54
Décanoate d'éthyle	443	629	439	504 $\pm$ 109
Acétate d'hexyle	90	125	97	104 $\pm$ 19
Acétate de phényléthyle	324	373	640	446 $\pm$ 170

Tableau 45 : Profil aromatique d'exemples de vins produits à la cave de Rabastens en 2010

Molécule en $\mu\text{g.L}^{-1}$	Produits Cave		
	Vin témoin 1	Vin témoin 2	Moyenne
Acetate d'isoamyle	6061	9323	7692 $\pm$ 2307
Butyrate d'éthyle	< 400	< 400	< 400
Hexanoate d'éthyle	1130	1092	1111 $\pm$ 27
Octanoate d'éthyle	1542	1459	1501 $\pm$ 59
Décanoate d'éthyle	1298	901	1100 $\pm$ 281
Acétate d'hexyle	137	177	157 $\pm$ 28
Acétate de phényléthyle	262	331	297 $\pm$ 41

Compte tenu de l'utilisation d'une souche différente de la notre dans la production des vins de Rabastens, une comparaison formelle n'est pas envisageable. Néanmoins, nous voyons à la lecture de ces tableaux que les profils obtenus sont relativement proches des vins témoins produits à la cave tout en étant plus pauvres (entre 25 et 50 % en fonction de la molécule considérée).

D'autre part, un point important à noter ici est l'obtention de profils relativement stables pour les trois échantillons 'pilote' qui ont été prélevés à différents moments de la campagne. En effet, la variabilité globale est de l'ordre de 15 %. La mise en œuvre d'une production continue permettrait donc effectivement d'obtenir un vin de qualité plus ou moins constante tout au long de la campagne.

### III.6 Bilan de l'essai pilote

En conclusion sur ces résultats, l'essai pilote mené à Rabastens a été un franc succès. Le pilote a fonctionné durant 28 jours sans interruption majeure. Les résultats obtenus en laboratoire ont été confirmés au stade pilote (Tableau 46 et Tableau 47).

Tableau 46 : Récapitulatif des paramètres moyens de fonctionnement continu obtenus sur la campagne 2010 à l'échelle pilote (170 L)

	Valeur moyenne $\pm$ Ecart type
Température °C	18,9 $\pm$ 2,11
Débit d'alimentation L.h <sup>-1</sup>	4,336 $\pm$ 0,329
Taux de dilution h <sup>-1</sup>	0,035 $\pm$ 0,003
Temps de séjour h	28,6 $\pm$ 3,2

Tableau 47 : Récapitulatif des caractéristiques moyennes du produit obtenues sur la campagne 2010 à l'échelle pilote (170 L)

	Valeur moyenne $\pm$ Ecart type
Concentration en sucres réducteurs en g.L <sup>-1</sup>	7,436 $\pm$ 2,208
Vitesse de consommation des sucres en g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	-6,836 $\pm$ 0,684
Concentration en acide malique en g.L <sup>-1</sup>	0,763 $\pm$ 0,429
Vitesse de dégradation de l'acide malique en g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	-0,097 $\pm$ 0,017
Concentration en éthanol en % (v/v)	11,387 $\pm$ 0,648
Acidité totale en gH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .L <sup>-1</sup>	3,178 $\pm$ 0,303
Acidité Volatile en gH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .L <sup>-1</sup>	0,111 $\pm$ 0,076

### IV. Perspectives d'industrialisation

La cave de Rabastens produit annuellement 40 000 hL de vin de pays suivant le schéma de vinification présenté. La réception de la vendange se répartit en moyenne sur 28 jours. Il est donc nécessaire de dimensionner une installation permettant de vinifier en continu un débit de 60 hL.h<sup>-1</sup>. En considérant, un temps de séjour moyen de 28,5 h, nous obtenons donc un volume de liquide dans la cuve de 1 680 hL. La quantité totale de billes sera donc de 13,4 t. Il

nous faudra donc une cuve de 2 130 hL incluant les volumes de liquide et de billes et 10 % de volume mort. Cela implique aussi un coût brut en billes de l'ordre de 16,8 €.hL<sup>-1</sup>.

La quantité de billes nécessaire à l'échelle industrielle et le coût qui en résulte sont tous les deux importants. Il serait donc intéressant de chercher à optimiser le procédé en travaillant sur les concentrations en billes et sur la configuration du réacteur en passant par exemple à une configuration de réacteur multi-étagée.



**Partie VI :**  
**Analyse procédé du fonctionnement de**  
**la configuration retenue**



Dans la partie précédente, nous avons constaté que le réacteur à lit fixe vertical était le plus efficace en termes de cinétique. Pour avancer dans la compréhension du fonctionnement de ce réacteur et afin d'envisager au mieux ce comportement en fonction du changement des conditions opératoires (changement d'échelle ou changement de la concentration en billes), une première étape consiste à modéliser ce réacteur avec des modèles simples. Afin de faire un rapprochement avec un cas idéal, des calculs ont été effectués en envisageant soit un réacteur ayant un comportement de type réacteur agité soit un réacteur ayant un comportement de type piston. Puis nous avons ensuite effectué une analyse de la distribution des temps de séjour à partir de laquelle nous avons déterminé un modèle représentatif du fonctionnement de notre réacteur.

## **I. Simulation dans le cas d'un fonctionnement idéal.**

D'une manière générale, les réacteurs à lits fixes verticaux présentent un fonctionnement idéal de type piston. Mais, du fait même du phénomène de fluidisation intermittente observé, il n'est pas inconcevable d'avoir en fin de compte un milieu 'parfaitement homogène'.

A partir des cinétiques obtenues en batch, nous avons modélisé l'évolution de la vitesse en fonction de la concentration en sucres résiduels, afin de calculer ensuite les temps de séjour suivant deux types de fonctionnement idéal : le fonctionnement en réacteur agité continu (RAC) et le fonctionnement en réacteur piston. Bien évidemment, compte tenu des approximations dans l'évaluation des vitesses, les temps de séjour calculés représentent plus un ordre de grandeur qu'une valeur quantitative.

### **I.1 Modélisation de la vitesse en fonction de la concentration en sucres résiduels**

Nous avons dans un premier temps cherché à exprimer les cinétiques batch comme une fonction de la concentration en sucres. Pour se faire, nous avons considéré l'ensemble des données obtenues en batch, une fois les cinétiques de fermentation stabilisées. Nous avons donc obtenu une tendance moyenne de la vitesse de fermentation en fonction de la concentration en sucres résiduels, comme cela est montré sur la Figure 69.

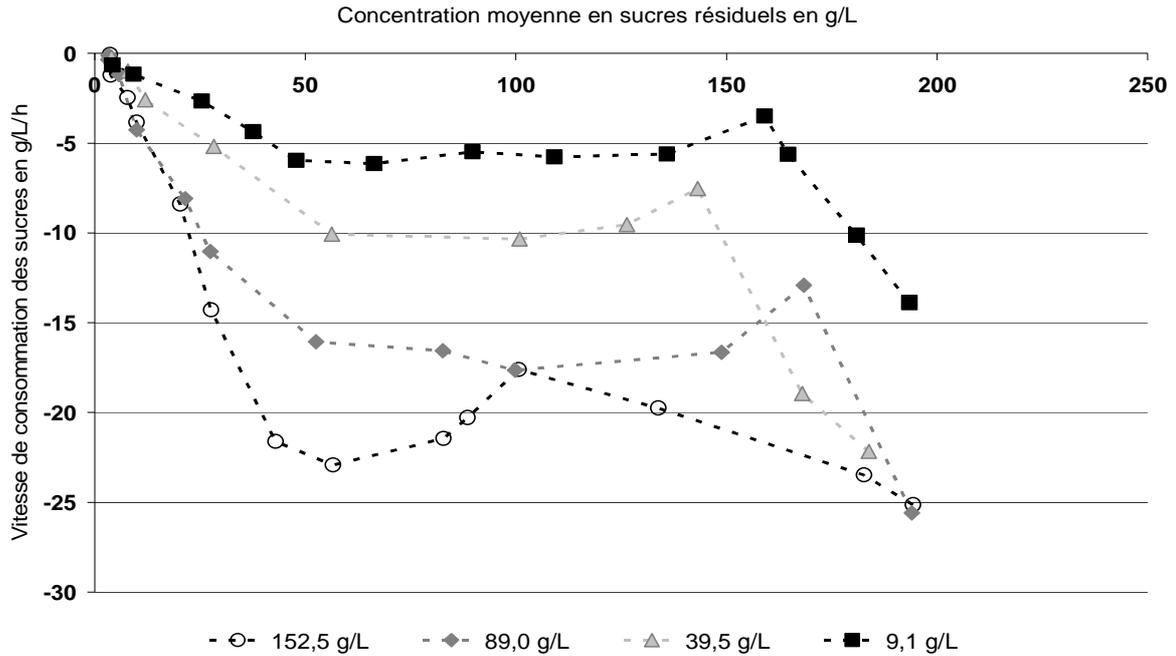


Figure 69 : Vitesses moyennes expérimentales de la consommation des sucres en fonction de la concentration en sucres résiduels pour les différentes concentrations en billes de *S.cerevisiae*, d’après les cinétiques batch stabilisées

D’après Figure 69, représentant l’évolution de la vitesse en fonction de la concentration en sucres résiduels, nous pouvons, entre 210 et 10 g.L<sup>-1</sup> de sucres résiduels, distinguer deux zones de vitesse différente. La diminution de la concentration en sucres par diffusion dans la matrice d’alginate n’est bien entendu pas considérée.

Ainsi, la première zone, définie entre 210 et 50 g.L<sup>-1</sup> de sucres résiduels, présente une vitesse globalement constante, alors que la deuxième définie entre 50 et 10 g.L<sup>-1</sup> de sucres montre une vitesse décroissante linéaire.

Les vitesses correspondantes à chaque concentration en billes sont les suivantes (Tableau 48) :

Tableau 48 : Expression des vitesses de consommation de sucres en fonction de la concentration en sucres réducteurs pour différentes concentrations en billes de *S.cerevisiae* obtenues à partir des essais batch

Concentration de billes en g.L <sup>-1</sup> de liquide	Vitesse zone 1 en g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	Vitesse zone 2 en fonction de la concentration en sucres résiduels x en g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>
152,5	22	-0,4336 x - 0,5497
89,0	17	-0,3793 x - 0,3379
39,5	10	-0,1802 x + 0,0015
9,1	5	-0,1192 x + 0,0072

Une remarque est que les modèles cinétiques considérés à partir des données batch, même si ils contiennent quelques approximations expérimentales et calculatoires représentent assez bien les cinétiques obtenues en batch. La Figure 70 illustre l’exemple obtenu à la concentration en billes de 39,5 g.L<sup>-1</sup>.

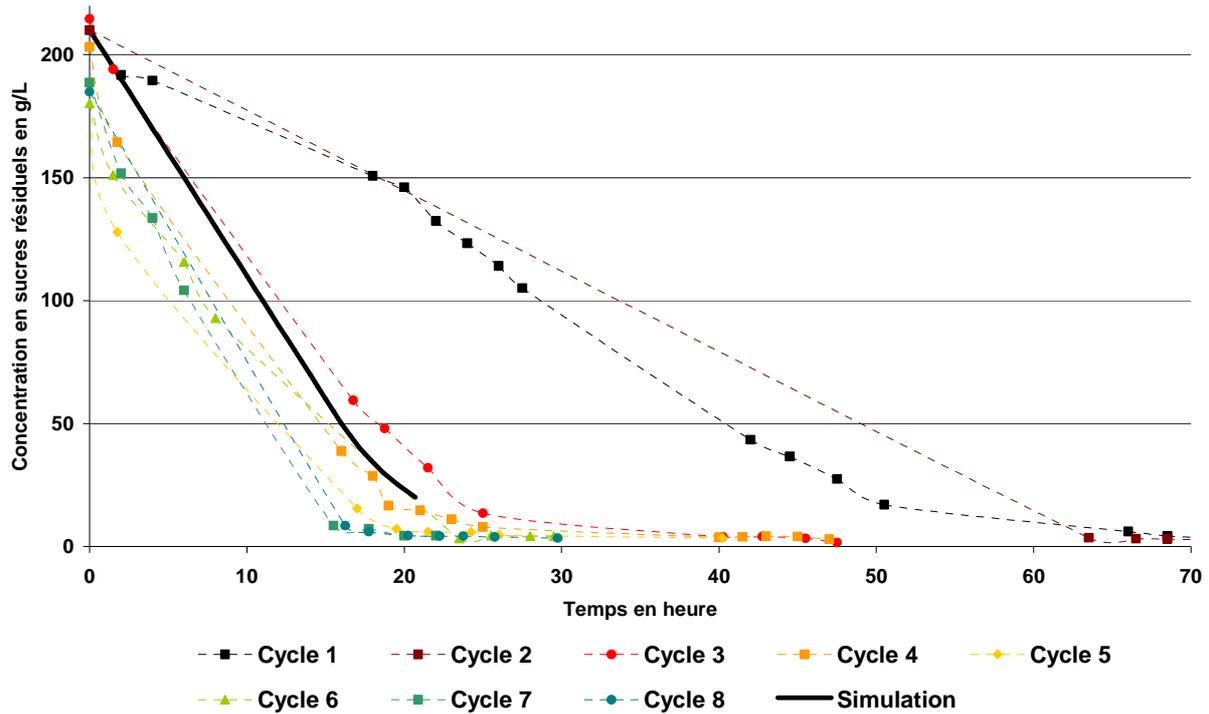


Figure 70 : Comparaison du modèle cinétique et des cinétiques expérimentales obtenues en batch correspondantes pour une concentration en billes de 39,5 g.L<sup>-1</sup> de *S.cerevisiae*

## I.2 Rapprochement avec un fonctionnement idéal

### I.2.1 Modèle RAC

A partir du modèle défini ci-avant, nous avons calculé les temps de séjours théoriques correspondants à un fonctionnement de type réacteur agité. Dans ce type de fonctionnement, la concentration en sucres est la même dans tout le réacteur et identique à celle en sortie c'est-à-dire 10 g.L<sup>-1</sup>. La vitesse de réaction est donc la vitesse obtenue en batch à cette concentration en sucres. Dans le Tableau 49 ci-dessous sont indiquées les valeurs calculées à partir des modèles, pour chaque concentration testée.

Tableau 49 : Vitesse de consommation des sucres à 10 g.L<sup>-1</sup> de sucres résiduels pour les différentes concentrations en billes de *S.cerevisiae* obtenues en batch

Concentration de billes en g.L <sup>-1</sup> de liquide	r <sub>S</sub> Vitesse de consommation des sucres à 10 g.L <sup>-1</sup> de sucres réducteurs en g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>
152,5	-4,9
89,0	-4,1
39,5	-1,8
9,1	-1,2

En effectuant un bilan sur le sucre, nous avons donc :

$$V \cdot \frac{dS}{dt} = Q \cdot (S_0 - S) + V \cdot r_s \quad (17)$$

En régime permanent,  $V \cdot \frac{dS}{dt} = Q \cdot (S_0 - S) + V \cdot r_s = 0$  soit  $r_s = -D \cdot (S_0 - S)$  avec  $D = \frac{Q}{V}$

Les temps de séjour calculés en fonctionnement RAC pour les différentes concentrations en billes sont donnés dans le Tableau 50.

Tableau 50 : Temps de séjour calculés en considérant un fonctionnement en réacteur continu, de type RAC pour les différentes concentrations en billes de *S.cerevisiae*

Concentration de billes en g.L <sup>-1</sup> de liquide	Temps de séjour calculés en h
152,5	41
89,0	49
39,5	111
9,1	167

La valeur calculée pour une concentration en billes de 39,5 g.L<sup>-1</sup> de liquide en faisant l'hypothèse d'un fonctionnement RAC est largement supérieure à la valeur expérimentale (temps de séjour de 35 h). Cela signifie donc que malgré la fluidisation, le réacteur n'est pas parfaitement homogène ; le modèle RAC n'est pas représentatif du fonctionnement de notre réacteur.

### I.2.2 Modèle piston

Dans le cas d'un fonctionnement piston, les vitesses fonction de la concentration en sucres varient tout le long de la colonne. Celles-ci doivent donc être intégrées sur la hauteur du réacteur, nous donnant les temps de séjour (Tableau 51).

Pour l'intégration, nous considérons des tranches de RAC représentant la consommation de 5 g.L<sup>-1</sup> de sucres chacune.

Ainsi, pour chaque tranche il vient d'après (18) :

$$D = -\frac{(S_i - S_{i+1})}{r_{S_{i+1}}} \quad (18)$$

Tableau 51 : Temps de séjour calculés en considérant un fonctionnement en réacteur continu, de type piston pour les différentes concentrations en billes de *S.cerevisiae*

Concentration de billes en g.L <sup>-1</sup> de liquide	Temps de séjour calculés en h
152,5	10,4
89,0	13,1
39,5	23,9
9,1	44,3

Comme nous le notons ici, la valeur calculée est inférieure à celle obtenue en laboratoire, le modèle piston ne correspond donc pas non plus au fonctionnement de notre procédé.

### I.3 Conclusion

Dans le Tableau 52 ci-dessous est présenté l'ensemble des temps de fermentation expérimentaux et calculés en considérant une concentration initiale en sucres moyenne de 200 g.L<sup>-1</sup>.

Tableau 52 : Synthèse des temps de séjour expérimentaux (batch et continu) et théoriques (réacteur continu fonctionnant suivant les modèles RAC et piston) obtenus pour différentes concentrations en billes de *S.cerevisiae*

<b>Concentration de billes en g.L<sup>-1</sup> de liquide</b>	Temps moyen de fermentation en batch après stabilisation en h	Temps de séjour expérimental en h	Temps de séjour calculés en fonctionnement RAC en h	Temps de séjour calculés en fonctionnement piston en h
<b>152,5</b>	12	-	41	10,4
<b>89,0</b>	16	-	49	13,1
<b>39,5</b>	22	35	111	23,9
<b>9,1</b>	45	-	167	44,3

Comme nous le constatons, l'hypothèse RAC n'est pas la plus à même de décrire le fonctionnement hydrodynamique de notre réacteur. En effet, un fonctionnement RAC a tendance à maximiser les temps de séjour. Dans le cas du piston, les résultats calculés sont plus proches de la réalité. Pour l'essai à 39,5 g.L<sup>-1</sup>, le temps de fermentation en batch est légèrement inférieur au temps de séjour calculé. Il s'agit là d'une approximation provenant de la 'moyennation' de la concentration initiale en sucre.

Afin de vérifier si notre réacteur fonctionne effectivement comme un piston et donc que les résultats ne sont pas une coïncidence, nous avons décidé d'étudier la distribution des temps de séjour.

## II. Etude de la distribution des temps de séjour

L'objectif est ici de caractériser le réacteur d'un point de vue hydrodynamique. Par le calcul, il semble que le fonctionnement piston soit un modèle valide. Cependant, du fait de l'utilisation de vitesses évaluées expérimentalement et donc avec une certaine marge d'erreur, il nous faut vérifier ceci en étudiant la distribution des temps de séjour dans un petit pilote de 10 L.

## II.1 Montage expérimental

Le montage comporte un réacteur et une pompe. Les caractéristiques du réacteur sont données dans le Tableau 53. L'utilisation d'un réacteur encore différent a été nécessaire afin de prélever des échantillons de volume important en un temps suffisamment réduit.

Tableau 53 : Paramètres caractéristiques du réacteur utilisé pour l'évaluation de la distribution de temps de séjour en laboratoire (10 L)

Volume utile en L	9,87
H Hauteur en cm	56,6
D Diamètre interne en cm	14,9
H/D	3,8

L'alimentation est assurée par une pompe Masterflex modèle Easy Load L/S muni d'une tête de pompe 7013. Le soutirage quant à lui est réalisé par surverse.

Au cours de cet essai, le réacteur est maintenu à température ambiante ( $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ). L'ensemble des résultats présentés ci-après sont extrapolés et donnés pour une température de fonctionnement de  $20^{\circ}\text{C}$ .

Tout comme lors des précédents essais, nous procédons dans un premier temps à la réhydratation des billes. Puis celles-ci sont transférées dans le réacteur avec du concentré de jus de raisin rouge (CJRR) dilué à environ  $200\text{-}210 \text{ g.L}^{-1}$  de sucres, ajusté en acide malique à  $5 \text{ g.L}^{-1}$  et sulfite à  $5 \text{ g.hL}^{-1}$ . La mise en fonctionnement continu s'effectue une fois les concentrations en sucres et acide malique cibles atteintes. Pour le suivi, les mêmes techniques d'analyses sont utilisées. Les données initiales correspondant à ce montage sont données dans le Tableau 54.

Tableau 54 : Données initiales du montage expérimental lit fixe vertical

Volume utile total en L	9,87
Volume du lit de billes en L	1,91
Porosité du lit de billes	0,33
Volume de liquide en L	8,59

L'étude des temps de séjour est réalisée par l'application d'un pulse considéré comme immédiat en entrée. Celui-ci consiste à envoyer environ 150 mL de CJRR chargé à saturation en NaCl (environ  $300 \text{ g.L}^{-1}$ ). Un suivi de la conductivité nous permet ensuite d'évaluer la distribution des temps de séjour. Cette analyse sera évidemment réalisée une fois le procédé stabilisé en fonctionnement continu.

## II.2 Suivi cinétique

Le taux de dilution appliqué ici est de l'ordre de  $0,03 \text{ h}^{-1}$  soit environ 35 h.

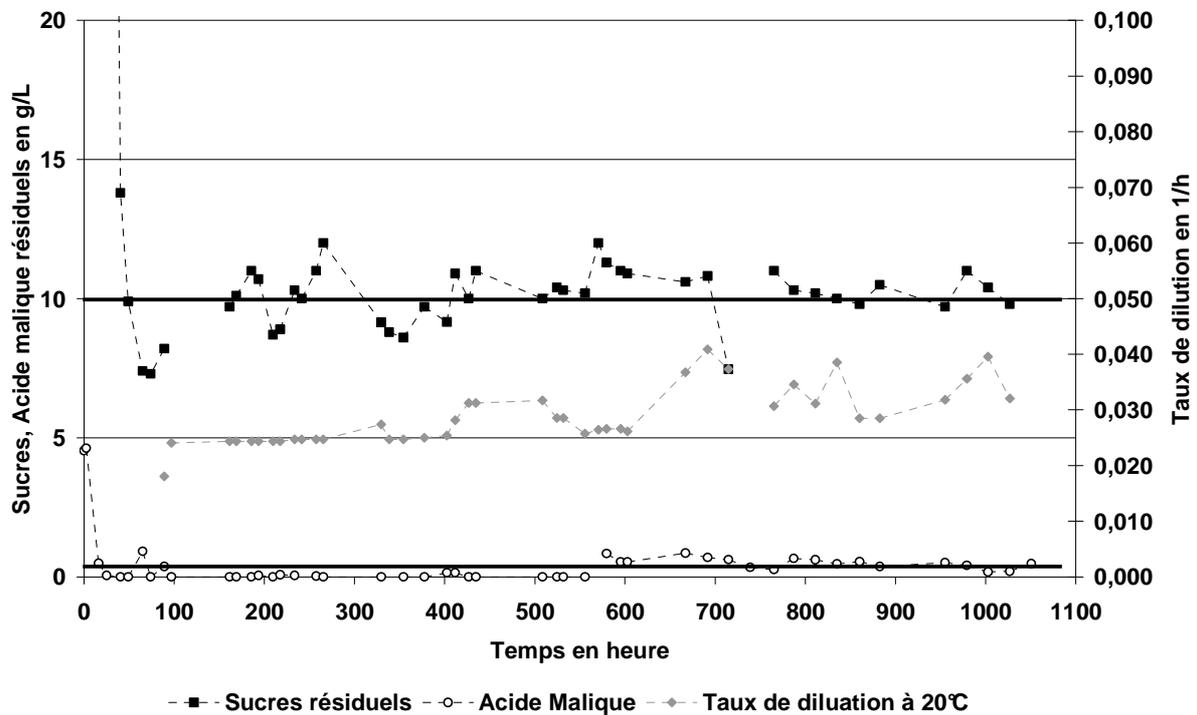


Figure 71 : Suivi cinétique en fonctionnement continu du réacteur laboratoire (10 L) utilisé pour l'analyse de la distribution de temps de séjour

Comme le montre le graphique ci-dessus (Figure 71), un fonctionnement relativement stable a été atteint avec ce taux de dilution. La concentration en sucres résiduels fluctue légèrement autour de  $10 \text{ g.L}^{-1}$  et celle en acide malique reste inférieure à  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ . De légères déviations peuvent être notées, mais celles-ci s'expliquent par une variation de la température et non une perturbation dans le fonctionnement.

Par contre, nous notons une différence importante entre le temps de séjour obtenu précédemment en colonne de 1 L (22 h) et celui obtenu ici (35 h). Une des explications très probable mais non vérifiée est la concentration en éthanol dans le milieu. En effet, lors de l'essai à 1 L, nous comptons une consommation de sucres de  $190 \text{ g.L}^{-1}$  alors qu'ici elle est plutôt de l'ordre de  $200\text{-}210 \text{ g.L}^{-1}$  du fait d'une concentration en entrée un peu plus élevée. Ceci induit un écart de 1-1,5 % (v/v) dans la concentration en éthanol de fonctionnement ce qui explique le ralentissement observé.

Malgré cette légère différence et compte tenu de la stabilité du système, la distribution des temps de séjour peut être entreprise.

## II.3 Etude de la distribution des temps de séjour

Le graphique ci-dessous (Figure 72) montre l'évolution de la conductivité mesurée en sortie du réacteur après injection d'un pulse de NaCl.

Les mesures de conductivité ont été réalisées de façon régulière sur une période de 70 h, les données suivantes sont extrapolées en considérant une décroissance linéaire pour permettre les calculs.

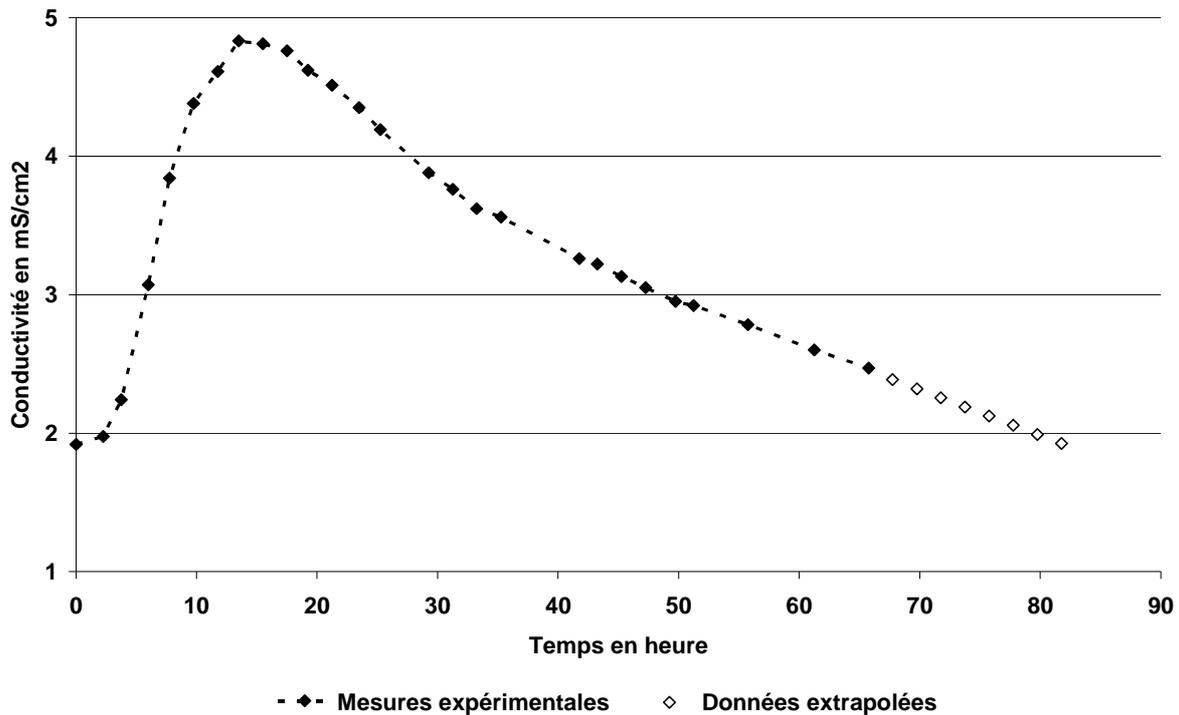


Figure 72 : Suivi de la conductivité après injection d'un pulse de NaCl pour l'analyse de distribution de temps de séjour dans le réacteur laboratoire (10 L)

A partir de ces suivis de conductivité (Figure 72), nous commençons par tracer la fonction  $E(t)$ , distribution des temps de séjour.

Comme le débit est uniforme, celle-ci s'exprime comme :

$$E(t) = \frac{\chi(t)}{\int_0^{+\infty} \chi(t) dt} \quad (19)$$

Nous calculons ensuite le temps de séjour moyen  $\bar{t}$  et l'écart type de la distribution  $\sigma$  définis par :

$$\bar{t} = \int_0^{+\infty} tE(t)dt \quad (20) \quad \text{et} \quad \sigma = \sqrt{\int_0^{+\infty} (t - \bar{t})^2 E(t)dt} \quad (21)$$

puis, en adimensionnel :

$$\theta_i = \frac{t_i}{\bar{t}} \quad (22) \quad \text{et} \quad E(\theta_i) = \bar{t} E_i \quad (23)$$

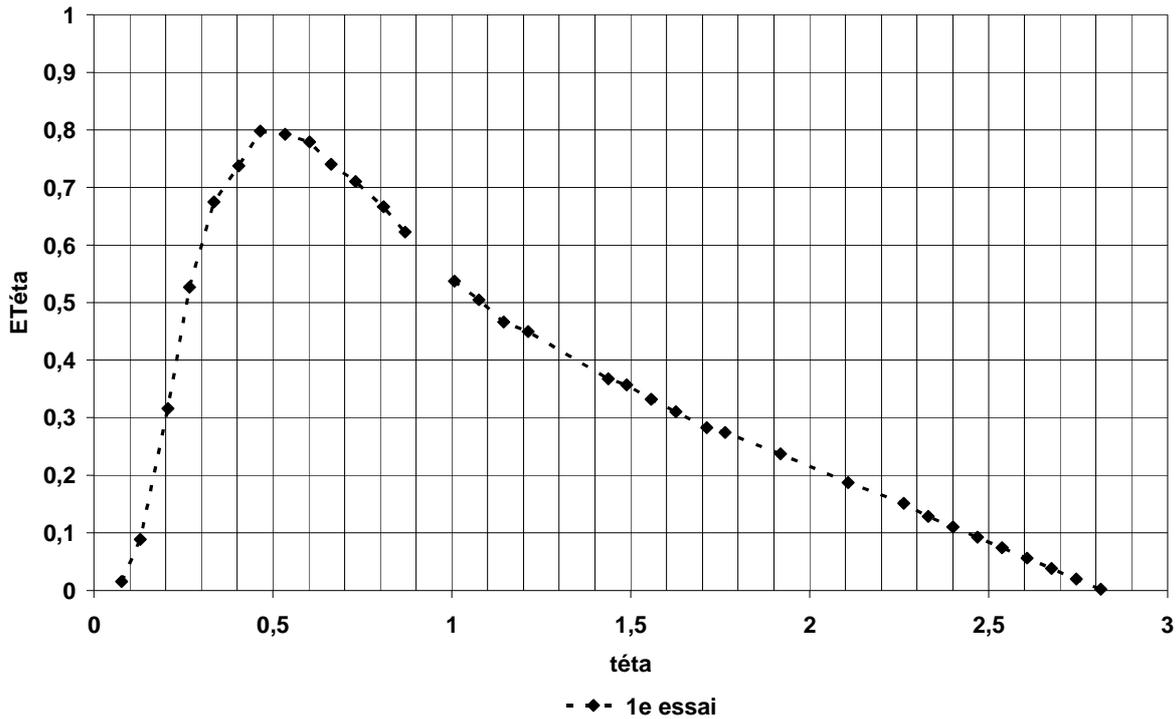


Figure 73 : Distribution E(Téta) en fonction de Téta obtenue à partir du suivi de conductivité après injection d'un pulse dans le réacteur laboratoire (10 L)

Tableau 55 : Comparaison du temps de séjour moyen calculé avec la distribution des temps de séjour et du temps de séjour réel obtenu en réacteur laboratoire (10 L)

Temps de séjour moyen en h	29,06
Temps de séjour réel* en h	35
Ecart type de la DTS	15,24

\* Pour rappel, le temps de séjour réel est égal à :

$$\tau = \frac{V_{\text{liquide}}}{Q} \quad (24)$$

D'après la distribution des temps de séjour obtenue présentée sur la Figure 73, il semble que le modèle hydrodynamique de fonctionnement de notre procédé soit un peu plus complexe que le modèle piston. En effet, la distribution correspond mieux soit à un fonctionnement suivant le modèle piston dispersé soit à un fonctionnement suivant le modèle des RAC en série (Levenspiel 1999).

Dans chacun des cas, à partir des données expérimentales, nous avons calculé les paramètres du modèle.

Pour le modèle du piston dispersé, nous avons considéré des conditions limites fermé-fermé (c'est-à-dire sans recirculation aucune). Dans ce cas là, il est possible de calculer le coefficient de dispersion en utilisant la formule suivante :

$$\sigma^2_{\theta} = \frac{\sigma^2}{t} = 2\left(\frac{D}{uL}\right) - 2\left(\frac{D}{uL}\right)^2 \left[1 - e^{-uL/D}\right] \quad (25)$$

et par suite le nombre de Peclet défini par :

$$Pe = \frac{uL}{D} \quad (26)$$

Tableau 56 : Coefficient de dispersion et nombre de Peclet calculés en considérant un modèle hydrodynamique du réacteur laboratoire (10 L) de type piston dispersé

Coefficient de dispersion D	$3,7 \cdot 10^{-5}$
Nombre de Peclet	6,10

Néanmoins, il est impossible d'obtenir une expression analytique pour la distribution E. Seule une comparaison avec les courbes disponibles dans la littérature nous informe qu'il existe une certaine similitude entre le modèle et l'expérience mais que celui-ci n'est pas le plus adapté pour décrire notre procédé (Figure 74).

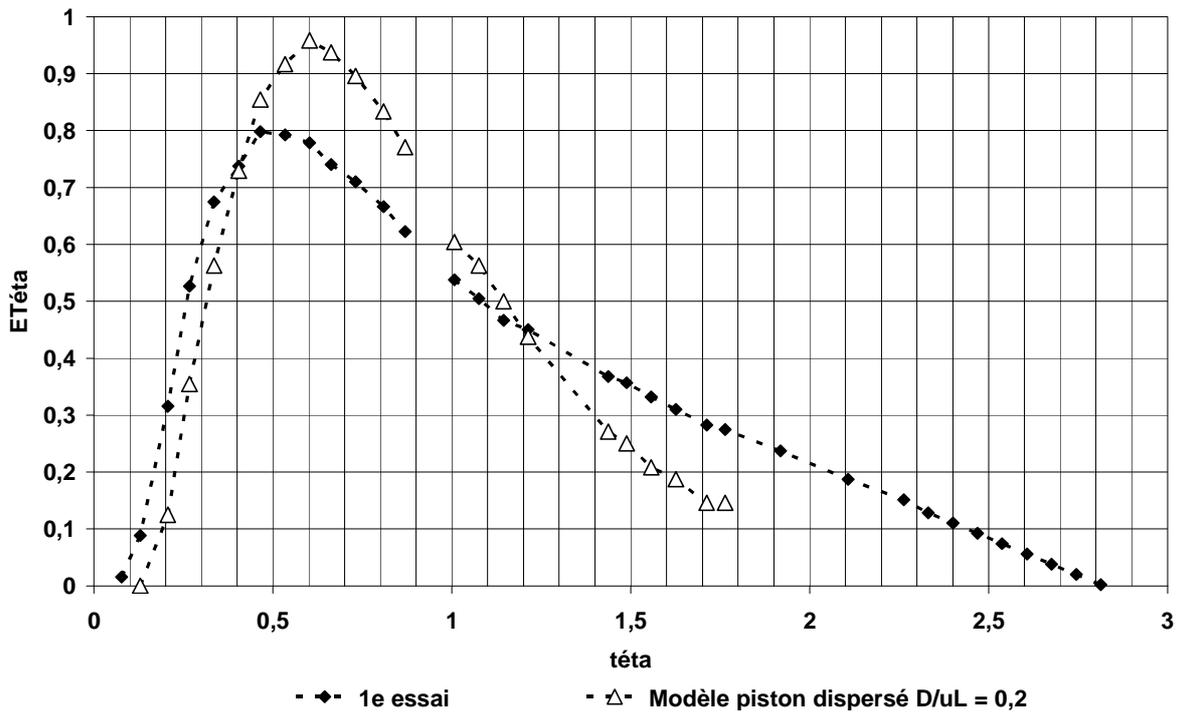


Figure 74 : Comparaison de la distribution de temps séjour réelle avec celle du modèle piston dispersé à  $Pe^{-1} = 0,2$

Dans le cas d'une association de RAC, nous commençons par identifier le nombre N de RAC à l'aide des corrélations de MacMullin et Weber 1935 :

$$\sigma^2 = \frac{\overline{t^2}}{N} \quad (27)$$

$$E_{T\acute{e}ta} = N \frac{(NT\acute{e}ta)^{N-1}}{(N-1)!} \exp(-NT\acute{e}ta) \quad (28)$$

Tableau 57 : Nombre N de RAC en série calculé d'après la distribution de temps de séjour obtenue en réacteur laboratoire (10 L)

Nombre de RAC N	3,64
-----------------	------

A partir de l'équation (28), nous traçons la courbe modèle pour N = 2 et 3.

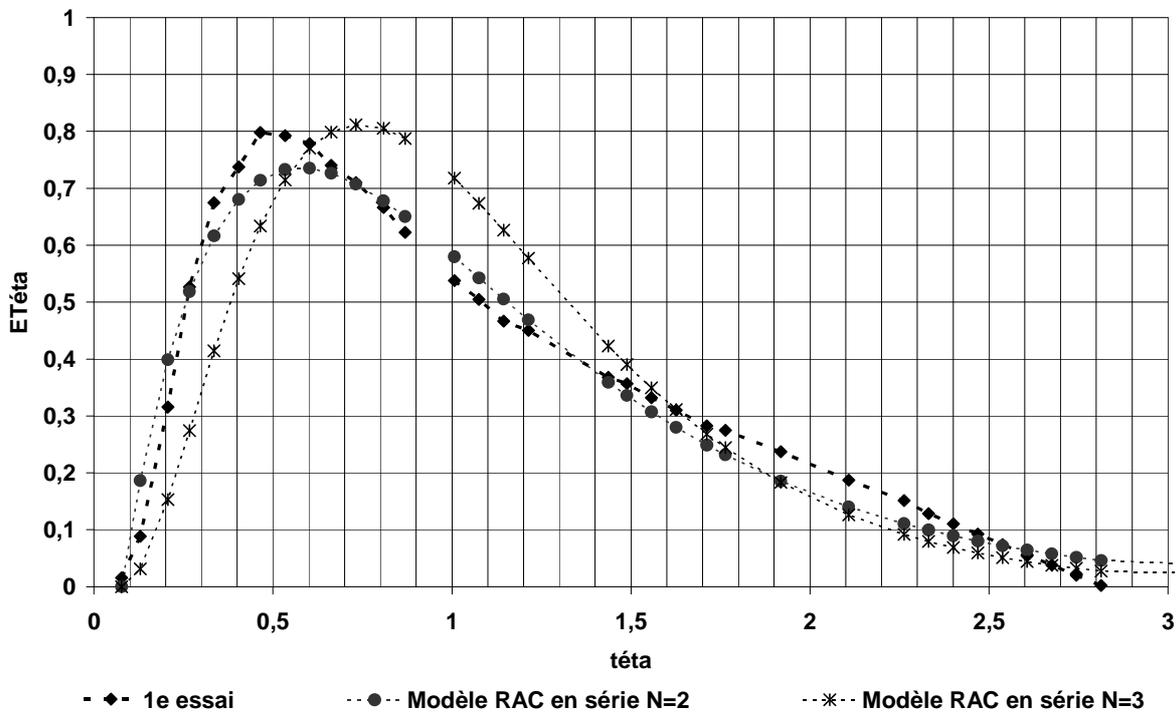


Figure 75 : Comparaison de la distribution de temps de séjour réelle avec celle des modèles RAC en série à N = 2 et N = 3

En observant le graphique ci-dessus, il apparaît que notre distribution de temps de séjour est proche du modèle des RAC en série mais ne correspond pas parfaitement.

Ainsi, des modèles piston dispersé et association de RAC, aucun des deux ne convient parfaitement. Malgré tout, le modèle le plus proche reste le RAC en série à 2 réacteurs, et il est possible que la différence entre modèle et expérience vienne du fait de considérer deux RAC de même volume et non pas de volumes différents. Nous avons donc choisi de réaliser la démarche inverse. En supposant un modèle constitué de 2 RAC de volumes différents, nous avons calculé la distribution E correspondante. Puis nous avons évalué l'évolution de la concentration en sucres tout au long du réacteur suivant ce modèle.

Le calcul de E est réalisé comme il suit. Dans un premier temps, nous écrivons le bilan transitoire dans le réacteur de rang k de la cascade à J réacteurs en série :

$$Q_{c_{k-1}} = Q_{c_k} + V_k \frac{dc_k}{dt} \quad (29)$$

ce qui correspond à la fonction de transfert suivante :

$$\frac{\overline{c_k}}{c_{k-1}} = g(s) = [1 + \tau_k s]^{-1} \quad (30).$$

Dans notre cas nous avons donc :

$$Q_{c_0} = Q_{c_1} + V_1 \frac{dc_1}{dt} \quad (31) \quad \text{et} \quad Q_{c_1} = Q_{c_2} + V_2 \frac{dc_2}{dt} \quad (32)$$

ce qui donne en fonction de transfert sur toute la cascade :

$$\frac{\overline{c_2}}{c_0} = G(s) = [1 + \tau_1 s]^{-1} [1 + \tau_2 s]^{-1} = A[1 + \tau_2 s]^{-1} + B[1 + \tau_1 s]^{-1} \quad (33).$$

Puis en repassant dans le domaine du temps réel, nous obtenons la distribution de temps de séjour E :

$$E(t) = \frac{A}{\tau_1} \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) + \frac{B}{\tau_2} \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) \quad (34).$$

Le graphique ci-dessous donne les évolutions des distributions E en fonction du temps, calculées pour différents rapports de volume de deux RAC en série ainsi que les données expérimentales. Afin de ne pas introduire de biais, nous n'avons considéré ici que les données mesurées jusqu'à 70 h puis ajusté les valeurs d'intégrales des modèles à la valeur d'intégrale obtenue sur la série expérimentale.

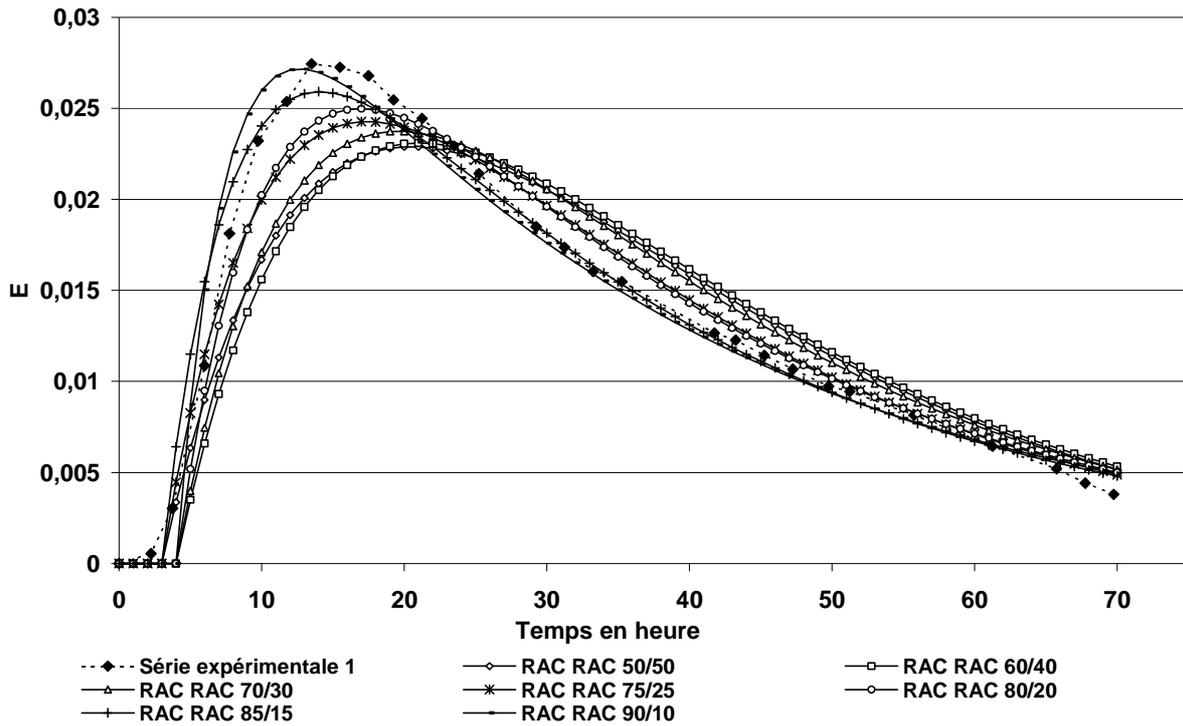


Figure 76 : Evolution de la distribution de temps de séjour  $E(t)$  suivant les différents rapports de volumes dans un modèle deux RAC en série de volumes différents.

A partir des modèles présentés ci-dessus, nous avons ensuite calculé les profils de concentration en sucres au sein des différents réacteurs (Figure 77).

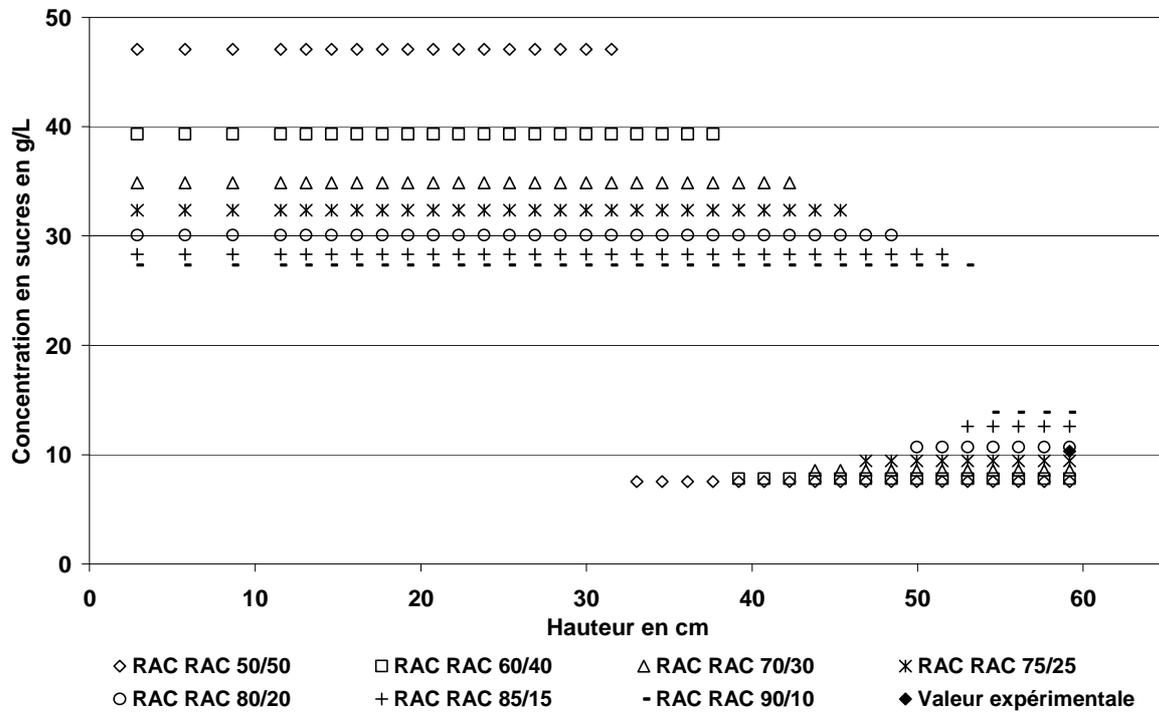


Figure 77 : Profils théoriques de la concentration en sucres suivant la hauteur de colonne en fonction de la répartition des volumes de deux RAC en série

Tableau 58 : Valeurs des concentrations en sucres calculées en sortie de réacteur en fonction de la répartition des volumes de deux RAC en série

Configuration RAC RAC	50/50	60/40	70/30	75/25	80/20	85/15	90/10
Concentration en sucres en sortie en g.L <sup>-1</sup>	7,54	7,81	8,57	9,43	10,68	12,59	13,87

D'après la Figure 76, il semblerait que le modèle décrivant au mieux le fonctionnement hydrodynamique de notre réacteur soit le modèle RAC RAC 85/15.

Et d'après la Figure 77, présentant l'évolution de la concentration en sucres en fonction de la hauteur de colonne, il semblerait que l'option la plus cohérente soit le RAC RAC à 80/20. En effet, suivant cette option, la concentration calculée en sortie est de 10,6 g.L<sup>-1</sup> et la valeur expérimentale moyenne est de 10,7 g.L<sup>-1</sup>.

Si nous nous intéressons maintenant à la représentation de ces volumes dans notre réacteur, il se peut que ces volumes représentent respectivement une zone de fluidisation et une zone supérieure exempte de billes.

Pour compléter la validation du modèle, nous avons regardé la concentration en sucres à différentes hauteurs de colonne. Cinq piquages ont été réalisés à l'aide de tubulure de diamètre interne 1 mm, d'aiguilles et de seringues, disposées en paroi du réacteur à différentes hauteurs.

La Figure 78 montre les différentes concentrations en sucres obtenues pour les différentes hauteurs.

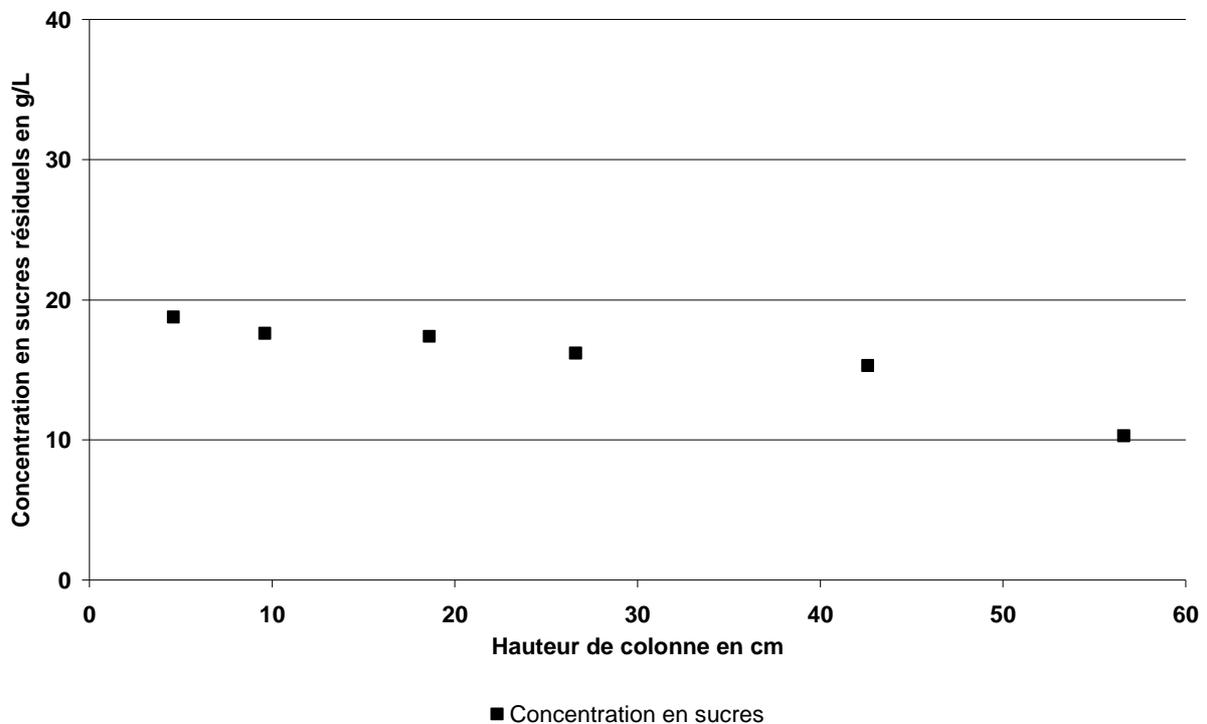


Figure 78 : Evolution de la concentration expérimentale en sucres suivant la hauteur du réacteur laboratoire (10 L)

D'après la Figure 78, aucune conclusion ne s'impose. En effet, d'après les points expérimentaux, il semblerait que nous ayons effectivement une sorte de compartimentation au sein du réacteur, comme nous l'avons proposé ci-avant. Néanmoins, les concentrations obtenues dans le 1<sup>e</sup> compartiment sont bien inférieures à celles que nous avons calculé en considérant une compartimentation 80 / 20. Malheureusement, il faut bien noter que les prélèvements ont été réalisés en bord de réacteur ; un effet de bord peut exister ce qui fausserait les concentrations mesurées. Pour une validation rigoureuse, il faudrait donc réaliser sur le réacteur de véritables piquages à différentes hauteurs et prêter attention aux volumes de fluidisation.

### **III. Conclusion**

Du fait de l'existence même d'un phénomène de fluidisation intermittente, le réacteur inspiré du lit fixe ne présente pas un comportement classique. En effet, nous avons montré en effectuant des simulations de temps de séjour en modèles classiques type réacteur agité et réacteur piston, que le temps de séjour réel est un temps intermédiaire ce qui traduirait donc un comportement hydrodynamique également intermédiaire.

Grâce à une analyse de la distribution de temps de séjour par injection d'un pulse, nous avons mis en évidence un comportement de type RAC en série à 2 réacteurs. Nous avons ensuite affiné ce modèle en travaillant sur les volumes de chacun de ces réacteurs et montré une répartition de l'ordre de 80 % pour le premier compartiment et 20 % pour le deuxième. Dans ces cas là, nous pouvons supposer que le premier volume correspondrait au volume de fluidisation. Cependant, les mesures réalisées in-situ à différentes hauteurs ne correspondent pas vraiment. Afin de confirmer toute notre analyse, il serait intéressant de renouveler l'expérience en réalisant des prélèvements à différentes hauteurs au centre du réacteur pour avoir des mesures représentatives.



**Partie VII :**  
**Optimisation du procédé**



Suite aux essais menés à l'échelle pilote, il est apparu que bien que stable, le procédé mis au point nécessitait une quantité de billes importante qui représenterait un coût non négligeable. En plus de la notion de quantité de billes et de coût, il nous faut également tenir compte des autres impératifs industriels existant tels que le volume et le nombre de cuves. Il est donc nécessaire de travailler à l'optimisation du procédé. Ce chapitre vise l'amélioration de ce procédé selon deux directions.

Nous avons cherché, dans un premier temps, à agir sur la concentration en billes. En effet, d'après l'analyse des activités spécifiques la concentration de  $39,5 \text{ g.L}^{-1}$  semble donner de meilleurs résultats que celle de  $152,5 \text{ g.L}^{-1}$ , nous n'avons pas étudié en détail les cinétiques pour des concentrations encore plus faibles.

Par la suite, nous avons modifié la configuration du procédé en passant à une configuration à deux étages. En effet, comme nous l'avons montré précédemment, notre procédé semble présenter un fonctionnement de type RAC en série à deux réacteurs avec un 1<sup>e</sup> fonctionnant à  $30\text{-}40 \text{ g.L}^{-1}$  de sucres résiduels et un 2<sup>e</sup> à  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de sucres. Or nous avons noté dans les analyses des fermentations batch, qu'un ralentissement avait déjà lieu autour de  $40\text{-}50 \text{ g.L}^{-1}$  de sucres. Le fait de passer en bi-étagé devrait donc nous permettre de gagner quelques heures sur le temps de séjour.

Comme chaque expérience en continu se doit de durer plusieurs semaines afin de pouvoir être validée, toutes les options ne peuvent pas être testées en laboratoire faute de temps. Afin de prioriser les expériences intéressantes pour la réduction du coût en billes, nous avons dans un premier temps effectué des simulations simples. Nous avons choisi d'utiliser les modèles simples type RAC et piston, nos résultats expérimentaux étant intermédiaires à ces modèles. Ensuite, en fonction des résultats obtenus, nous avons réalisé quelques essais qui nous ont permis de vérifier en laboratoire, les résultats de la simulation.

## **I. Simulation dans le cas d'un fonctionnement idéal RAC ou piston**

Dans cette partie sont présentés les résultats de calculs théoriques obtenus pour différentes concentrations en billes en configuration mono-étagée ou bi-étagée en fonctionnement type RAC ou piston.

La simulation a été réalisée à partir des cinétiques de fermentation alcoolique batch en suivant la même démarche que précédemment. La désacidification, en termes de cinétique, n'a pas été prise en compte dans la simulation. Néanmoins, les quantités de billes et coûts annoncés tiennent compte des billes de *Sch.pombe*.

### **I.1 Optimisation en réacteur mono-étagé**

Sur la Figure 79 sont représentés les résultats de la simulation suivant les modèles RAC et piston (Equations 17 et 18 respectivement), en configuration mono-étagée.

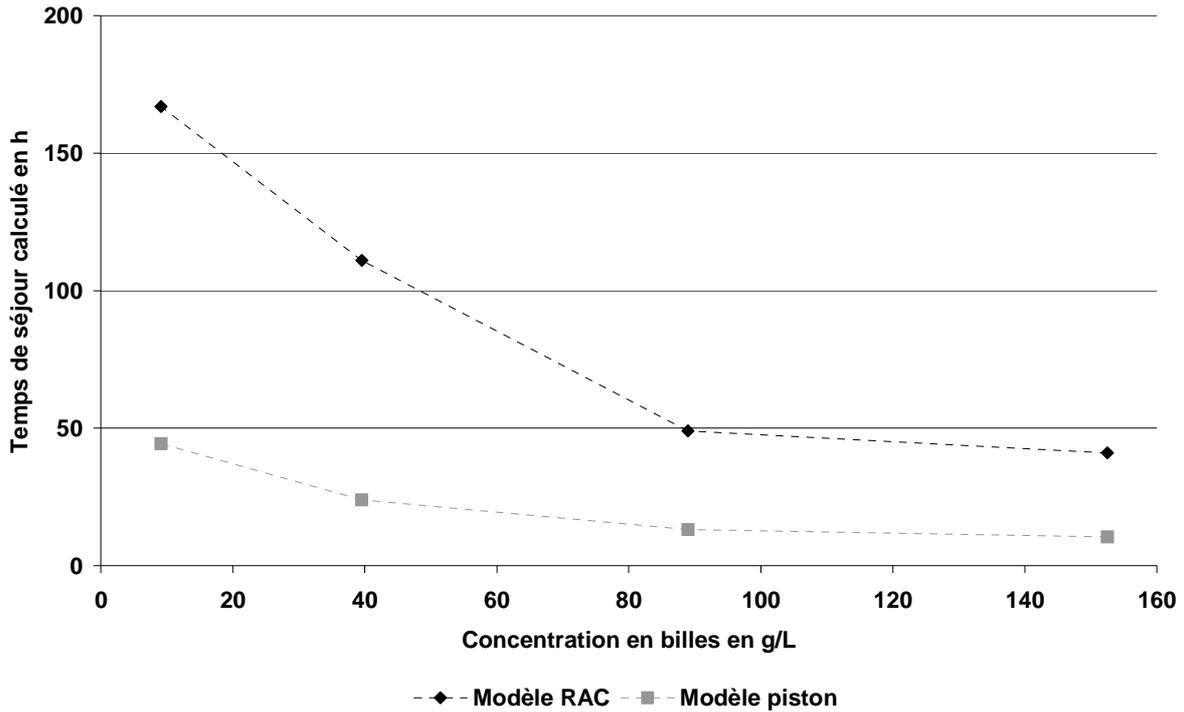


Figure 79 : Evolution des temps de séjour calculés suivant les modèles RAC et piston en fonction des concentrations en billes de *S.cerevisiae* et *Sch.pombe*

En toute logique, plus la concentration en billes est importante, plus le temps de séjour est réduit. Cependant, en accord avec nos précédentes observations, la loi n'est pas linéaire. Travailler à forte concentration en billes engendrerait alors un gaspillage de billes.

Afin de visualiser ceci, nous avons calculé le coût des billes en  $\text{€} \cdot \text{hL}^{-1}$  pour une production de 40 000 hL répartie sur 28 jours soit un débit d'environ  $60 \text{ hL} \cdot \text{h}^{-1}$ . Pour se faire, à partir des temps de séjour et en considérant un débit de production de  $60 \text{ hL} \cdot \text{h}^{-1}$ , nous avons calculé le volume de liquide. Puis, nous en avons déduit la quantité de billes nécessaires, ce qui nous a ensuite permis le calcul du volume de billes, du volume utile de réacteur (Equation 35) et du coût en billes.

Les résultats sont donnés dans le Tableau 59.

Tableau 59 : Coûts en billes et volumes utiles calculés suivant les modèles RAC et piston en fonction des concentrations en billes de *S.cerevisiae* et *Sch.pombe*

Concentration de billes en $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de liquide <i>S.cerevisiae</i> / <i>Sch.pombe</i>	Coût en billes en $\text{€} \cdot \text{hL}^{-1}$		Volume utile en hL	
	RAC	Piston	RAC	Piston
152,5-152,5	93	24	3842	975
89-89	65	17	3894	1041
39,5-39,5	65	14	7591	1634
9,1-9,1	23	6	10282	2728

Finalement, nous constatons que plus la concentration en billes sera réduite plus leur coût et donc quantité sera réduit. Mais cela implique également d'utiliser des cuves de plus gros volumes qui sont plus délicates à maîtriser.

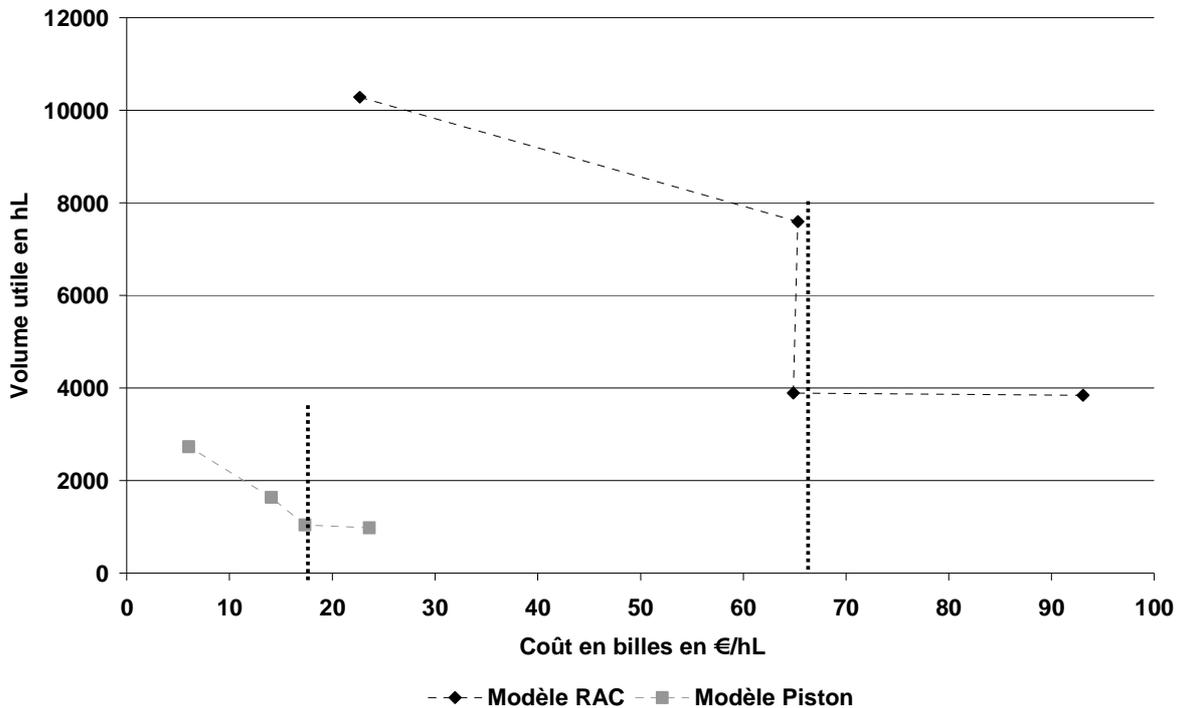


Figure 80 : Evolution théorique du volume utile du réacteur en fonction du coût en billes en considérant les modèles RAC et piston

En traçant le volume de cuve en fonction du coût en billes (Figure 80), une cassure apparaît dans les courbes entre 89 et 152,5 g.L<sup>-1</sup>. Cette cassure illustre bien le fait qu'au-delà d'une certaine concentration en billes, une augmentation de celle-ci ne permettra plus de réduire le volume de cuve. Cela nous permet donc déjà d'éliminer la concentration à 152,5 g.L<sup>-1</sup>.

Si nous regardons ce même graphique d'un point de vue industriel, nous constatons que malgré l'augmentation du volume de cuve, la réduction de la concentration en billes est des plus intéressantes puisqu'elle permettrait de diviser par 2 à 3 le coût en billes en passant de 39,5 à 9,1 g.L<sup>-1</sup> par exemple.

Un essai à 9,1-9,1 g.L<sup>-1</sup> sera donc réalisé en laboratoire afin de valider les résultats de la simulation.

## I.2 Optimisation en réacteur bi-étagé

L'autre piste d'étude pour l'optimisation du procédé consiste à modifier la configuration du réacteur en passant sur deux étages. Pour ce faire, nous avons choisi de faire la distinction entre les deux étages pour une concentration en sucres de 40-50 g.L<sup>-1</sup> de sucres, valeur à partir de laquelle la vitesse de fermentation diminue (Figure 69). Ainsi, dans la première colonne la concentration en sucres passera de 210 à 40 g.L<sup>-1</sup> et dans la deuxième de 40 à 10 g.L<sup>-1</sup>.

Bien évidemment, ceci n'est intéressant que si le fonctionnement de notre réacteur n'est pas totalement piston ou si des combinaisons de concentration en billes sont réalisées.

## I.2.1 Simulation en RAC

Dans un premier temps, nous avons effectué les calculs en considérant un fonctionnement RAC pour une configuration bi-étagée à même concentration dans les deux étages (Tableau 60). La démarche utilisée a été la même que celle décrite précédemment.

Tableau 60 : Coûts en billes et volumes utiles calculés en fonction des concentrations en billes de *S.cerevisiae* et *Sch.pombe* en configuration bi-étagée suivant le modèle RAC

Concentration de billes en g.L <sup>-1</sup> de liquide <i>S.cerevisiae</i> / <i>Sch.pombe</i>	Coût en billes en €.hL <sup>-1</sup>		Volume utile global en hL	
	Mono	Bi	Mono	Bi
<b>152,5-152,5</b>	93	36	3842	1475
<b>89-89</b>	65	24	3894	1464
<b>39,5-39,5</b>	65	24	7591	2776
<b>9,1-9,1</b>	23	8	10282	3750

Les résultats de la simulation présentés dans le Tableau 60 montrent une diminution importante du coût par le changement de configuration. Le passage en configuration bi-étagée devrait permettre a priori de diviser par deux le coût en billes.

Le volume global du procédé serait lui aussi bien impacté par le changement de configuration puisqu'il pourrait être diminué de 50 à 70 % en fonction des concentrations.

Dans un deuxième temps, nous avons effectué les calculs en considérant des concentrations en billes différentes dans les deux étages. En effet, lors des premiers essais en batch, nous avons noté que les vitesses de consommation des sucres en fin de fermentation étaient très faibles et n'étaient finalement que peu impactées par la concentration en billes. L'utilisation d'une faible concentration dans le second étage permettrait donc d'optimiser davantage le procédé.

Dans les tableaux ci-dessous (Tableau 61 ; Tableau 62) sont présentés les résultats de la simulation pour toutes les combinaisons possibles en termes de coût en billes en €.hL<sup>-1</sup> et de volume utile sur l'ensemble du procédé.

Tableau 61 : Coûts en billes en €/hL calculés en fonction des concentrations en billes de *S.cerevisiae* et *Sch.pombe* en configuration bi-étagée suivant le modèle RAC

2 <sup>e</sup> étage	1 <sup>e</sup> étage			
Concentration de billes en g.L <sup>-1</sup> de liquide <i>S.cerevisiae</i> / <i>Sch.pombe</i>	152,5-152,5	89-89	39,5-39,5	9,1-9,1
152,5-152,5	36	29	28	19
89-89	31	24	24	15
39,5-39,5	32	25	24	15
9,1-9,1	25	18	17	8

Tableau 62 : Volumes utiles en hL calculés en fonction des concentrations en billes de *S.cerevisiae* et *Sch.pombe* en configuration bi-étagée suivant le modèle RAC

2 <sup>e</sup> étage	1 <sup>e</sup> étage			
Concentration de billes en g.L <sup>-1</sup> de liquide <i>S.cerevisiae</i> / <i>Sch.pombe</i>	152,5-152,5	89-89	39,5-39,5	9,1-9,1
152,5-152,5	1475	1457	2206	2776
89-89	1483	1465	2214	2784
39,5-39,5	2046	2027	2776	3347
9,1-9,1	2449	2430	3179	3750

A la lecture de ces deux tableaux, travailler à des concentrations en billes différentes suivant les étages peut permettre de réduire encore le coût en billes. C'est notamment le cas si nous choisissons de ne travailler qu'à 9,1 g.L<sup>-1</sup> de billes dans le deuxième étage puisque nous arriverions à le réduire de 6 à 10 €.hL<sup>-1</sup> en fonction de la concentration de référence. Ceci est également vrai en réduisant la concentration en billes dans le premier étage à 9,1 g.L<sup>-1</sup> de billes. Néanmoins, dans les deux cas, cela implique aussi des volumes de cuves plus importants.

Comme cela a été mentionné auparavant, notre procédé présenterait un fonctionnement compris entre le RAC et le piston. Avant de choisir les options que nous réaliserons en laboratoire, nous avons suivi cette même démarche de calcul en considérant cette fois ci le modèle piston.

## I.2.2 Simulation en piston

Les résultats de la simulation en piston sont présentés dans le Tableau 63 et le Tableau 64.

Tableau 63 : Coûts en billes en €/hL calculés en fonction des concentrations en billes de *S.cerevisiae* et *Sch.pombe* en configuration bi-étagée suivant le modèle piston

2 <sup>e</sup> étage	1 <sup>e</sup> étage			
Concentration de billes en g.L <sup>-1</sup> de liquide <i>S.cerevisiae</i> / <i>Sch.pombe</i>	152,5-152,5	89-89	39,5-39,5	9,1-9,1
152,5-152,5	26	21	18	12
89-89	23	19	16	10
39,5-39,5	23	19	16	10
9,1-9,1	20	15	12	6

Tableau 64 : Volumes utiles en hL calculés en fonction des concentrations en billes de *S.cerevisiae* et *Sch.pombe* en configuration bi-étagée suivant le modèle piston

2 <sup>e</sup> étage	1 <sup>e</sup> étage			
Concentration de billes en g.L <sup>-1</sup> de liquide <i>S.cerevisiae</i> / <i>Sch.pombe</i>	152,5-152,5	89-89	39,5-39,5	9,1-9,1
152,5-152,5	1058	1124	1518	2434
89-89	1055	1121	1515	2431
39,5-39,5	1346	1412	1806	2722
9,1-9,1	1563	1629	2023	2939

En considérant le modèle piston, les résultats de la simulation sont plus optimistes mais moins dispersés qu'en modèle RAC. Ainsi la réduction de la concentration à 9,1 g.L<sup>-1</sup> dans le deuxième étage nous permettrait de réduire le coût en billes de 3 à 6 €.hL<sup>-1</sup> ce qui est plus faible que dans le cas du modèle RAC. Néanmoins, il ne faut pas oublier que le modèle RAC est très pessimiste par rapport à la réalité.

D'après tous ces résultats, et compte tenu des contraintes industrielles, nous avons choisi de tester en laboratoire les configurations suivantes :

- mono-étagée à 9,1-9,1 g.L<sup>-1</sup> de billes ;
- bi-étagée à 39,5-39,5 / 9,1-9,1 g.L<sup>-1</sup> de billes ;
- bi-étagée à 9,1-9,1 / 9,1-9,1 g.L<sup>-1</sup> de billes.

## II. Résultats expérimentaux

### II.1 Optimisation en réacteur mono-étagé

Pour l'option mono-étagée, le montage expérimental est le même que celui présenté en partie IV, c'est à dire en utilisant une colonne laboratoire de 1 L. Le rapport *S.cerevisiae* / *Sch.pombe* lui reste identique, seule la concentration fait l'objet de modification (Tableau 65).

Tableau 65 : Temps de séjour attendus en fonctionnement type RAC et type piston, en fonction des concentrations en billes de *S.cerevisiae* et *Sch.pombe*

Concentration de billes en g.L <sup>-1</sup> de liquide <i>S.cerevisiae</i> / <i>Sch.pombe</i>	Temps de séjour attendu en h	
	RAC	Piston
9,1-9,1	167	47
20,0-20,0	≈140	≈35
39,5-39,5	111	26

Les résultats des 3 expérimentations continues sont présentés dans le Tableau 66 et Tableau 67.

Tableau 66 : Résultats des expériences à l'échelle laboratoire pour un fonctionnement en continu en réacteur mono-étagé à différentes concentrations en billes de *S.cerevisiae* et *Sch.pombe*

Concentration de billes en g.L <sup>-1</sup> de liquide <i>S.cerevisiae</i> / <i>Sch.pombe</i>	Temps de séjour en h	Sucres résiduels en g.L <sup>-1</sup>	Acide malique résiduels en g.L <sup>-1</sup>	Acide malique consommé en g.L <sup>-1</sup>	Durée de l'essai en h
9,1-9,1	85	10	0,5-1	3	600
20,0-20,0	70	9-10	0,5	3,5	200
39,5-39,5	33	6-10	0,1	4	300

Tableau 67 : Suite des résultats des expériences à l'échelle laboratoire pour un fonctionnement en continu en réacteur mono-étagé à différentes concentrations en billes de *S.cerevisiae* et *Sch.pombe*

Concentration de billes en g.L <sup>-1</sup> de liquide <i>S.cerevisiae</i> / <i>Sch.pombe</i>	Coût en billes en € .hL <sup>-1</sup> réel	Coût en billes en € .hL <sup>-1</sup> théorique		Volume utile en hL réel	Volume utile en hL théorique	
		RAC	Piston		RAC	Piston
9,1-9,1	12	23	6	5275	10282	2939
20,0-20,0	21	-	-	4520	-	-
39,5-39,5	20	65	16	2275	7591	1806

Nous retrouvons bien le comportement intermédiaire de notre procédé, bien que tout de même plus proche du modèle piston.

Il apparaît donc possible de réduire de manière significative la quantité de billes en réduisant la concentration en billes, au détriment du volume de cuve mais qui reste tout de même dans un ordre de grandeur raisonnable.

## II.2 Optimisation en réacteur bi-étagé

### II.2.1 Montage expérimental

Dans le cas du bi-étagé, deux colonnes sont utilisées. Leurs caractéristiques sont présentées dans le tableau ci-dessous (Tableau 68).

Tableau 68 : Paramètres descriptifs des deux colonnes utilisées dans le montage laboratoire bi-étagé

Colonne	1 <sup>e</sup> étage	2 <sup>e</sup> étage
Volume colonne en L	3,04	2,15
H Hauteur colonne en cm	50	50
D Diamètre interne en cm	8,8	7,4
H/D colonne	5,7	6,8

En fonction des résultats de la simulation, les volumes dans les 1 et 2<sup>e</sup> étages seront différents. N'ayant à notre disposition que les colonnes mentionnées ci-dessus, nous serons donc obligés d'adapter le rapport H/D pour respecter les contraintes cinétiques.

Pour l'alimentation et le soutirage de chacune des colonnes, une pompe péristaltique Gilson Minipuls 3 est utilisée, avec des tubes 2 stops orange de diamètre interne 0,89 mm assurant un débit de l'ordre de 100 mL.h<sup>-1</sup>. L'alimentation se fait en 1<sup>e</sup> colonne, par un tuyau plongeant au fond de la colonne, un soutirage intermédiaire en haut de la 1<sup>e</sup> colonne permet l'alimentation par le bas de la 2<sup>e</sup> colonne et enfin le soutirage final se fait en haut de 2<sup>e</sup> colonne par un tuyau en surface du liquide (Figure 81).

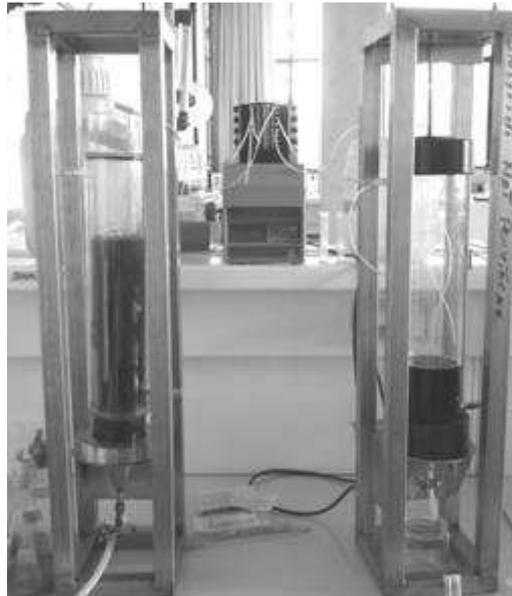


Figure 81 : Photo du montage expérimental du procédé bi-étagé à l'échelle laboratoire

## II.2.2 Résultats

Compte tenu des résultats de la simulation présentés ci-avant, nous avons choisi de tester en premier lieu l'option bi-étagée à 39,5-39,5 / 9,1-9,1 g.L<sup>-1</sup> de billes.

Toujours d'après la simulation, nous avons calculé les volumes utiles de réacteur et débits d'alimentation nécessaires dans chacune de colonne afin de respecter 40 g.L<sup>-1</sup> de sucres résiduels en sortie de 1<sup>e</sup> colonne et 10 g.L<sup>-1</sup> en sortie de 2<sup>e</sup> (Tableau 69) en fixant arbitrairement le rapport H/D du 1<sup>e</sup> étage à 2,75.

Tableau 69 : Volumes et débits d'alimentation calculés suivant les modèles RAC et piston, pour un fonctionnement bi-étagé à 39,5-39,5 et 9,1-9,1 g.L<sup>-1</sup> de *S.cerevisiae*/*Sch.pombe* dans les 1<sup>e</sup> et 2<sup>e</sup> étages respectivement

Modèle	Etage	Concentration de billes en g.L <sup>-1</sup> de liquide <i>S.cerevisiae</i> / <i>Sch.pombe</i>	Temps de séjour théorique en h	H/D	Volume utile en mL	Débit d'alimentation en mL.h <sup>-1</sup>
Piston	1 <sup>e</sup>	39,5-39,5	17	2,75	1472	75
	2 <sup>e</sup>	9,1-9,1	13	3,5	1125	83
RAC	1 <sup>e</sup>	39,5-39,5	24	2,75	1472	53
	2 <sup>e</sup>	9,1-9,1	25	4,8	1533	59

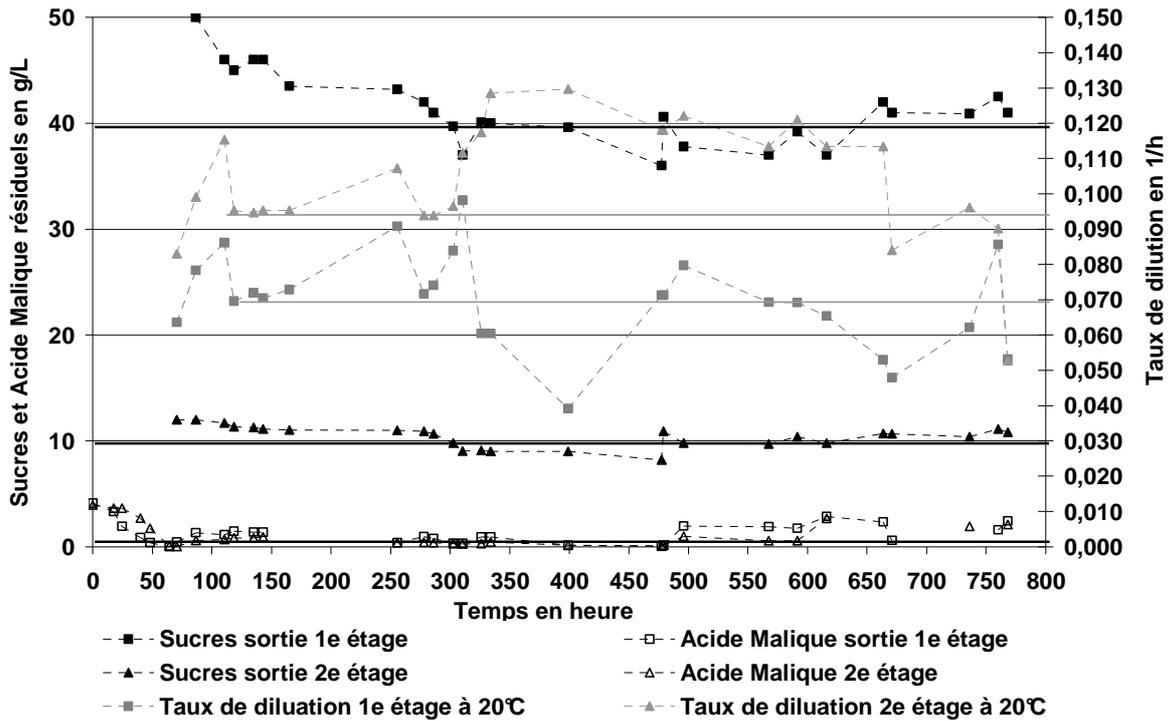


Figure 82 : Suivi cinétique du réacteur bi-étagé à 39,5-39,5 et 9,1-9,1 g.L<sup>-1</sup> de *S.cerevisiae* et *Sch.pombe* dans les 1<sup>e</sup> et 2<sup>e</sup> étages respectivement, en fonctionnement continu en laboratoire

Comme le montre la Figure 82, un fonctionnement relativement stable a été atteint avec le débit d'alimentation fixé.

Les concentrations en sucres résiduels fluctuent légèrement autour de 40 et 10 g.L<sup>-1</sup> pour le 1<sup>e</sup> et 2<sup>e</sup> étage respectivement. Celles en acide malique restent en moyenne comprises entre 0,5 et 1 g.L<sup>-1</sup> pour le 1<sup>e</sup> étage et de l'ordre de 0,5 g.L<sup>-1</sup> pour le 2<sup>e</sup> étage.

De légères déviations peuvent être notées au niveau de l'acide malique, notamment en fin d'expérience où la concentration en sortie atteint presque 2 g.L<sup>-1</sup> d'acide malique. Cette déviation, déjà observée lors de l'essai pilote à Rabastens reste à ce jour inexplicée. Peut-être s'agit-il là d'un épuisement des *Sch.pombe* qui travaillent en continu à fort taux d'éthanol et faible quantité de sucres. Si tel est le cas, concentrer l'ensemble de la population dans le 1<sup>e</sup> étage pour limiter cette déviation peut être une solution intéressante.

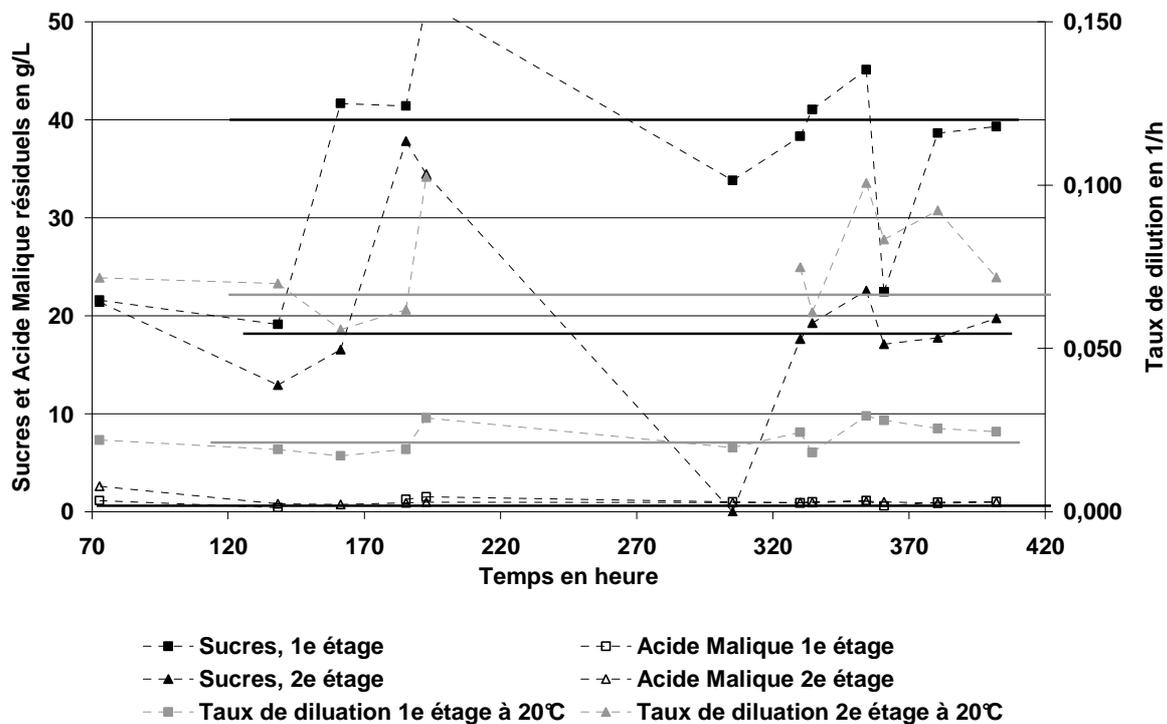
Enfin, au niveau des performances de ce nouveau système, il s'avère que nous gagnons quelques heures sur le temps de séjour : un total d'environ 25 h sur l'ensemble des 2 étages est obtenu contre 35 h environ sur du mono-étagé. Cette amélioration dans le temps de séjour permettrait de réduire le coût en billes à 11,3 €.hL<sup>-1</sup> soit une réduction presque de moitié par rapport au mono-étagé.

Comme nous venons de le voir, le bi-étagé est intéressant pour réduire les coûts. Néanmoins, il semble que l'activité des *Sch.pombe* dans le 2<sup>e</sup> étage ne soit pas optimale probablement du fait d'un temps de séjour trop court pour le degré d'éthanol en présence. Nous avons donc envisagé de regrouper l'ensemble des billes de *Sch.pombe* dans le 1<sup>e</sup> étage. Ceci a été testé dans le cadre d'un nouvel essai à 9,1 g.L<sup>-1</sup> dans chacun des étages soit finalement la combinaison suivante : 9,1/18,2 g.L<sup>-1</sup> *S.cerevisiae* / *Sch.pombe* + 9,1 g.L<sup>-1</sup> *S.cerevisiae*.

D'après les résultats des temps de séjours théoriques, les volumes utiles de réacteur et débits d'alimentation nécessaires ont été calculés (Tableau 70).

Tableau 70 : Volumes et débits d'alimentation calculés suivant les modèles RAC et piston, pour un fonctionnement bi-étagé à 9,1-18,2 et 9,1-0 g.L<sup>-1</sup> de *S.cerevisiae*/*Sch.pombe* dans les 1<sup>e</sup> et 2<sup>e</sup> étages respectivement

Modèle	Etage	Concentration de billes en g.L <sup>-1</sup> de liquide <i>S.cerevisiae</i> / <i>Sch.pombe</i>	Temps de séjour théorique en h	H/D	Volume utile	Débit d'alimentation en mL.h <sup>-1</sup>
Piston	1 <sup>e</sup>	9,1-18,2	34	2,75	1472	41
	2 <sup>e</sup>	9,1	13	1,8	562	43
RAC	1 <sup>e</sup>	9,1-18,2	35	2,75	1472	39
	2 <sup>e</sup>	9,1	25	3,3	1051	41



D'après la Figure 83, le fonctionnement n'a pas été des plus stables du fait des difficultés à maintenir les débits et surtout du fait des fluctuations de température particulièrement pendant les 250 premières heures.

Les concentrations en sucres résiduels stables obtenues tournent autour de 40 g.L<sup>-1</sup> pour le 1<sup>e</sup> étage et 17 g.L<sup>-1</sup> pour le 2<sup>e</sup> pour un temps de séjour de l'ordre de 40 h et 12h respectivement.

Celles en acide malique restent de l'ordre de 1 g.L<sup>-1</sup> pour l'ensemble du procédé.

Nous constatons donc immédiatement que cet essai ne correspond pas à ce que nous attendions.

D'après le modèle piston, nous prévoyions un temps de séjour de 34 plus 10 h soit 44 h de temps de séjour et des concentrations en sucres de 40 et 10 g.L<sup>-1</sup> en sortie de chacun des étages. Le deuxième étage est donc ici en défaut. Pour réduire la concentration en sucres à 10 g.L<sup>-1</sup>, il aurait fallu augmenter le temps de séjour d'environ 4 à 5 h. Dans ce cas là, le coût du procédé aurait été d'environ 9 €.hL<sup>-1</sup> et non plus 6 €.hL<sup>-1</sup> comme nous l'avons envisagé.

D'autre part, le 1<sup>e</sup> étage est également en défaut du point de vue de l'acide malique. En considérant les vitesses mesurées dans cet essai, il aurait fallu augmenter le temps de séjour dans le 1<sup>e</sup> étage de 10 h. Dans ce cas là, la concentration en sucres en sortie de 1<sup>e</sup> colonne aurait été de l'ordre de 10-15 g.L<sup>-1</sup>, donc plus besoin d'un 2<sup>e</sup> étage.

### III. Conclusion

Malgré des résultats de simulations intéressants et prometteurs, l'expérience n'a pas montré la possibilité de réduire la quantité de billes et donc le coût autant que prévu. En effet, alors que la simulation laissait espérer des coûts en billes de l'ordre de 6 €.hL<sup>-1</sup>, nous n'avons obtenu qu'une réduction conduisant à 11 €.hL<sup>-1</sup>. Cette importante différence vient essentiellement du fait que la contrainte de désacidification fixée n'a pas été prise en compte dans la simulation. Et nous avons constaté qu'en réduisant la quantité de billes, nous réduisons également la quantité d'acide malique dégradé qui est devenue en configuration bi-étagée insuffisante.

Malgré tout, si nous arrivons à transférer à plus grande échelle le procédé en configuration bi-étagée définie ici, les gains réalisés ne seront pas négligeables. En effet, nous avons montré ici la possibilité de réaliser les deux fermentations en même temps et en une seule journée alors que le procédé classique demande plusieurs jours pour la fermentation alcoolique uniquement et plusieurs semaines voire mois pour la fermentation malolactique.

D'autre part, un autre facteur permettant d'optimiser le besoin en billes est le temps de fonctionnement. Nous nous sommes consacrés dans cette partie à l'optimisation du procédé en calculant les coûts sur un temps de campagne de 28 jours. Si nous doublions ce temps, le coût en billes en serait lui réduit de moitié, ce qui le rendrait d'autant plus abordable pour les industriels.

Compte tenu de ces observations, nous avons poursuivi l'étude par un transfert à l'échelle industriel afin de valider la faisabilité technique du procédé.

**Partie VIII :**  
**Transfert industriel du procédé**



Le transfert industriel à un procédé de plus d'une centaine d'hectolitres a pour objectifs de vérifier à cette échelle :

- la fluidisation intermittente du lit de billes et le bon dégagement du gaz carbonique,
- la conservation des cinétiques de fermentations testées aux échelles laboratoire et pilote,
- la qualité constante et satisfaisante du vin produit.

Pour ce faire et compte tenu de diverses contraintes industrielles (fabrication du réacteur, installation sur site industrielle), nous avons choisi de transférer le procédé mono-étagé à 39,5 g.L<sup>-1</sup> de *S.cerevisiae* et *Sch.pombe*. Ainsi, nous obtiendrons les informations relatives à la faisabilité industrielle du point de vue hydrodynamique à la plus grande concentration en billes possible dans les différentes options proposées dans le chapitre précédant (mono-étagé ou bi-étagé à 9,1 g.L<sup>-1</sup> ou 39,5 g.L<sup>-1</sup> de chaque souche).

## I. Matériel et méthodes

### I.1. Jus de raisin

L'essai industriel est réalisé sur du jus thermotraité et filtré produit à Rabastens lors de la campagne 2011. Négrette, Gamay, et Duras constituent les cépages principaux de ce moût.

Un sulfitage systématique du raisin à 5 g.hL<sup>-1</sup> est effectué au quai de réception. Un deuxième sulfitage 1 g.hL<sup>-1</sup> est réalisé sur le jus refroidi afin de limiter les développements bactériens contaminants lors du stockage du jus permettant l'alimentation en continu les nuits et les week-ends.

Les caractéristiques moyennes du jus industriel utilisé tout au long de la campagne, sont présentées dans le tableau ci-dessous:

Tableau 71 : Caractéristiques moyennes du jus de fermentation produit à Rabastens en 2011

Sucres en g.L <sup>-1</sup>	Alcool potentiel en % (v/v)	Acide Malique en g.L <sup>-1</sup>	pH	Acidité totale en gH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .L <sup>-1</sup>	Acidité en volatile en gH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .L <sup>-1</sup>	Azote en assimilable en mg. L <sup>-1</sup>
210	12	2-4	3,7	5	0	300-350

Les jus obtenus en 2011 présentait un potentiel alcoolique en moyenne plus élevé qu'en 2010, notamment sur les 15 derniers jours de campagne où une différence de 0,5 % (v/v) a été relevée.

## I.2. Levures

Les levures utilisées dans cet essai sont les mêmes que précédemment. Les concentrations appliquées sont identiques aux essais laboratoires et pilote.

## I.3. Montage expérimental

Le pilote de 120 hL (Figure 84) a été fabriqué par la société PERA selon nos critères : diamètre de 1,7 m, hauteur effective d'environ 5,25 m soit un rapport H/D de 3. Il est à noter que le volume mort de 10 % initialement prévu n'a pas été respecté. En effet, une ouverture pour éviter les montées en pression dans la cuve, a été réalisée dans ce volume là. Ceci posera des problèmes de débordement lors de la fermentation en phase batch et lors des phénomènes de fluidisation.

Pour le maintien en température, le réacteur est équipé d'une double enveloppe. Dans notre cas, seul un branchement sur le réseau d'eau froide est réalisé, le contrôle en température ne correspondra qu'à un refroidissement effectué de façon manuelle par ouverture et fermeture de la vanne du réseau d'eau froide. Trois sondes de température réparties sur la hauteur du réacteur permettent le contrôle de celle-ci.

Une grille en haut de cuve permet, en théorie, le maintien de l'ensemble des billes dans le réacteur.

Une crépine en base de l'alimentation du réacteur permet d'éviter un retour des billes dans la pompe d'alimentation

Une série de hublots disposés sur un côté du réacteur permet l'observation du lit de billes et donc son comportement vis-à-vis du gaz produit.

La porte, située au dessus d'un volume d'environ 1,7 m<sup>3</sup> correspondant au volume des billes sèches, permet le chargement de celles-ci en début de campagne.

En fonctionnement continu, l'alimentation est réalisée par le bas au moyen d'une pompe Liverani EP Mini ¾". Le montage d'un variateur de vitesse nous permet, en théorie, de faire varier le débit de 1,5 à 16,2 hL.h<sup>-1</sup>. Le jus sera récupéré chaque jour de rentrée de raisin dans un ou deux garde-vins de 50 hL selon les besoins. Chaque garde vin est équipé d'un drapeau branché sur le réseau d'eau froide afin de refroidir le jus au maximum et de limiter les départs en fermentation.

Le soutirage est réalisé par surverse. Le vin tombe dans un bac tampon de 5 hL équipé d'une pompe Liverani contrôlée par deux capteurs de niveau permettant l'envoi du vin dans une cuve de stockage.

A partir des essais pilote présenté dans le chapitre V, nous avons calculé les temps de fermentation et débits théoriques extrapolés au réacteur industriel ainsi que la quantité de jus nécessaire sur l'ensemble de la campagne en considérant 4 semaines de fonctionnement continu.



Figure 84 : Photo du réacteur industriel (120 hL) de vinification continue

Tableau 72 : Paramètres prévisionnels du fonctionnement continu du réacteur industriel (120 hL)

Volume réacteur en hL	123
Concentration en billes de <i>S.cerevisiae</i> / <i>Sch.pombe</i> en g.L <sup>-1</sup>	40/40
Volume du lit de billes en hL	21,7
Volume de liquide en hL	109
Vitesse consommation sucres phase rapide g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	6
Temps de séjour en h	33
Débit d'alimentation en hL.h <sup>-1</sup>	3,7

#### I.4. Préparation des levures et démarrage du procédé

D'après des essais complémentaires réalisés en laboratoire, l'étape de réhydratation qu'elle soit réalisée en culture pure ou mixte, dans de l'eau, de l'eau à 40 g.L<sup>-1</sup> de glucose ou du concentré de jus de raisin dilué, n'a pas d'effet sur la cinétique de fermentation.

Après avoir chargé le réacteur de billes (Figure 85), en mélange *S.cerevisiae* et *Sch.pombe*, nous avons donc réalisé l'étape de réhydratation dans de l'eau à température ambiante puisque dans l'impossibilité de la chauffer.

L'étape de réhydratation dure entre 4 et 5 h. Au cours de cette étape, la température ne devra pas dépasser 37°C. Et en fin de réhydratation, un refroidissement devra être réalisé pour que l'écart de température entre les billes et le moût ne dépasse pas 10°C.



Figure 85 : Photos illustrant le chargement des billes de *S.cerevisiae* et *Sch.pombe* dans la cuve industrielle (120 hL) pour la phase de réhydratation

Une fois la réhydratation terminée, l'eau est vidangée par le système d'alimentation puis le réacteur est rempli par la canne de surverse avec une pompe à haut débit. Compte tenu de la formation importante de mousse lors de la phase batch, le vrai plein du réacteur sera réalisé lors du lancement de la phase continu.

## I.5. Suivi de la fermentation continue industrielle

Au cours de la fermentation, nous avons mesuré et réglé la température.

Les échantillons ont été analysés sur le même analyseur œnologique (Bacchus Microdom) utilisé lors des essais pilote en 2010 (Chapitre V). Sont effectuées les mesures suivantes :

- titre alcoolique volumétrique en % (v/v) ;
- sucres réducteurs et glucose/fructose en  $\text{g.L}^{-1}$  ;
- acidité totale en  $\text{gH}_2\text{SO}_4.\text{L}^{-1}$  et acidité volatile en  $\text{gH}_2\text{SO}_4.\text{L}^{-1}$  ;
- acide malique en  $\text{g.L}^{-1}$ .

Le glycérol a été mesuré par méthode enzymatique.

Nous avons également dénombré la population de levures planctoniques sur quelques échantillons.

Enfin des dégustations régulières ont été faites sur le vin produit.

## II. Résultats cinétiques

### II.1 Analyse de l'étape de réhydratation

Après avoir chargé le réacteur de billes, nous avons procédé à l'étape de réhydratation dans de l'eau.

Celle-ci a montré une activité des levures par des dégagements gazeux réguliers.

Après 4-5 h, nous avons procédé à la vidange de la cuve par la canne d'alimentation.

Il faut noter que l'eau de la réhydratation a été complètement rejetée. Nous constatons donc bien qu'une étape aussi anodine à l'échelle laboratoire prend des proportions très importantes à l'échelle industrielle et demande finalement des ajustements. Pour la suite, nous conseillons l'utilisation de CJRR propre dilué à environ  $40 \text{ g.L}^{-1}$ . Une fois l'étape de réhydratation terminée, ce jus dilué sera complété par du moût industriel jusqu'à remplissage du réacteur pour le démarrage de la phase batch.

### II.2 Analyse de la phase batch

Après vidange de la solution de réhydratation, nous avons procédé au remplissage du réacteur via la canne de surverse afin d'être plus rapide (diamètre en 70 au lieu de 20 par la canne d'alimentation pour le continu).

Compte tenu de l'absence de volume mort, nous n'avons pas complètement rempli le réacteur pour limiter les débordements. Néanmoins, dès le départ en fermentation, ceux-ci ont été visibles (Figure 86). Et contrairement à l'essai pilote (Chapitre V), nous n'avons pas pu rajouter d'antimousse faute d'accès en haut de cuve.

Il est également à noter que la perte de jus a également été accompagnée d'une perte de billes, démontrant que la maille de la grille n'était pas suffisamment fine pour permettre le maintien des microorganismes immobilisés en place. Des ajustements seront donc à prévoir à ce niveau là également.



Figure 86 : Photos illustrant les débordements visibles en cours de fermentation à l'échelle industrielle (120 hL)

Au niveau cinétique, nous avons constaté une cinétique légèrement plus lente par rapport aux résultats obtenus à 20°C en laboratoire. Cependant, à l'échelle industrielle, la régulation en température n'a pas été aussi précise qu'en laboratoire. Elle a connu des variations entre 16 et 20°C ce qui pourrait expliquer ce ralentissement. Ceci explique également la différence importante dans l'acidité totale mesurée en début et fin de fermentation. En effet, les 'faibles' températures ainsi que la présence d'éthanol ont provoqué une précipitation partielle de l'acide tartrique faisant ainsi chuter l'acidité (Tableau 73).

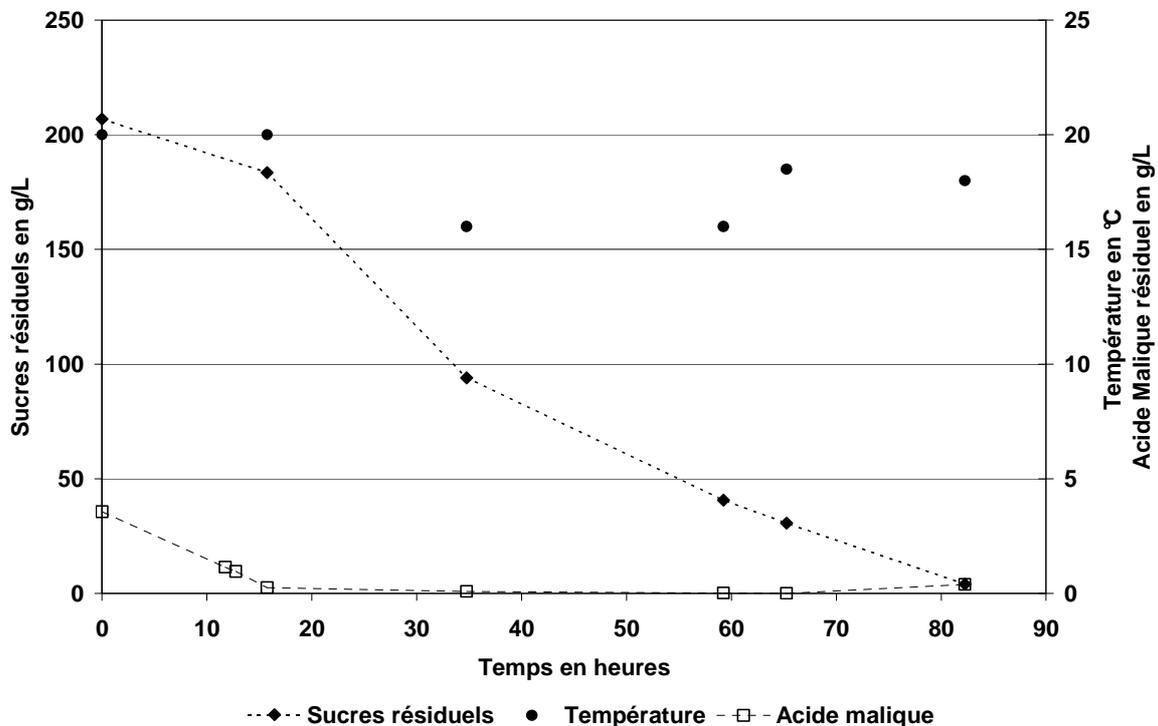


Figure 87 : Suivi de la phase batch des essais industriels (120 hL) réalisés sur 39,5 g.L<sup>-1</sup> de billes de *S.cerevisiae* et 39,5 g.L<sup>-1</sup> de billes de *Sch.pombe*

Après un peu plus de 3 jours de fermentation, nous avons atteint les concentrations en sucres et acide malique cibles : 4 et 0,5 g.L<sup>-1</sup> respectivement. Les analyses du vin obtenu sont données dans le Tableau 73.

Au cours du dénombrement de la population levurienne (2.10<sup>6</sup> cellules.mL<sup>-1</sup>), nous avons observé une présence importante de bactéries. Cette contamination provenant très probablement du réacteur lui-même (nettoyage difficile par manque d'accessibilité) pourrait expliquer le niveau d'acidité volatile un peu élevé mesuré en fin de batch.

Tableau 73 : Caractéristiques du vin obtenu en fin de phase batch à l'échelle industrielle (120 hL) réalisés sur 39,5 g.L<sup>-1</sup> de billes de *S.cerevisiae* et 39,5 g.L<sup>-1</sup> de billes de *Sch.pombe*

Sucres réducteurs en g.L <sup>-1</sup>	Glucose / Fructose en g.L <sup>-1</sup>	Ethanol en % (v/v)	Acide malique en g.L <sup>-1</sup>	Acidité totale en g H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .L <sup>-1</sup>	Acidité volatile en gH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .L <sup>-1</sup>	Population <i>S.cerevisiae</i> dans la phase liquide en cellules.mL <sup>-1</sup>
4,6	1,8	11,75	0,5	3,79	0,56	2.10 <sup>6</sup>

Enfin, au niveau de l'hydrodynamique, une fluidisation intermittente et spontanée du lit a été observée comme lors des essais laboratoire et pilote précédent.

### II.3 Analyse du fonctionnement en continu

Contrairement à l'essai pilote réalisé en 2010 (Chapitre V), l'essai industriel de 2011 a été plus difficile à mettre en œuvre et à stabiliser. Plusieurs dysfonctionnements ont eu lieu et l'état stationnaire n'a pas pu être véritablement atteint du fait de problèmes d'alimentation. En effet, la conduite d'alimentation étant très fine (diamètre de 2 cm) et la conservation du moût d'alimentation se faisant à froid, nous avons constaté après plusieurs jours de fonctionnement, un bouchage de cette conduite par dépôt de précipité tartrique. Ceci a entraîné régulièrement des surchauffes de la pompe et un arrêt de celle-ci. Ce problème ayant été détecté en milieu de campagne, nous avons pu rétablir un débit relativement stable sur quelques jours, avant que la pompe ne tombe en panne. Durant les quelques jours nécessaires à la réception d'une nouvelle pompe permettant de travailler avec des débits suffisamment bas, nous avons maintenu le fonctionnement continu avec une pompe provisoire.

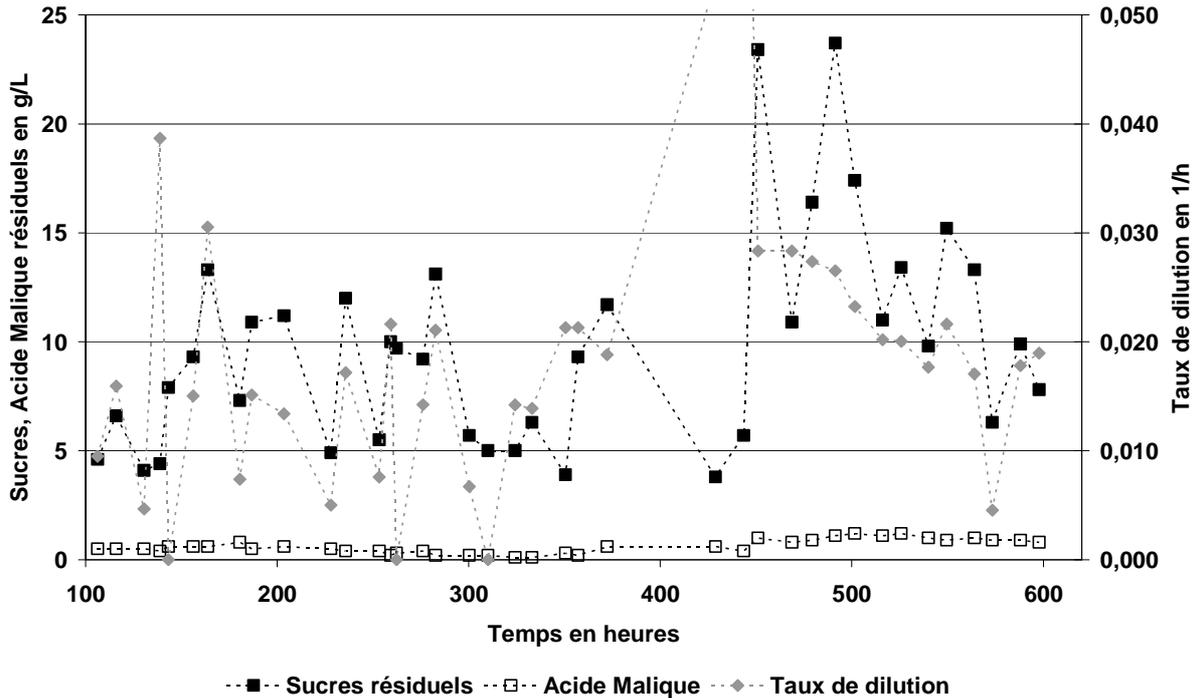


Figure 88 : Suivi du fonctionnement continu du réacteur industriel (120 hL) pendant la campagne 2011 (39,5 g.L<sup>-1</sup> de billes de *S.cerevisiae* et 39,5 g.L<sup>-1</sup> de billes de *Sch.pombe*)

Comme nous le voyons sur la Figure 88, deux zones au fonctionnement différent se distinguent : la première jusqu'à environ 350 h de fonctionnement et la seconde à partir de 450 h de fonctionnement. Les résultats obtenus pour chacune des zones sont donnés dans le Tableau 74. Les résultats du pilote discutés dans le chapitre V, sont également présentés à titre comparatif.

Tableau 74 : Paramètres moyens obtenus lors du fonctionnement continu pour l'essai industriel (120 hL, 2011) et l'essai pilote (170 L, 2010)

Paramètres moyens	Phase 1	Phase 2	Pilote
Taux de dilution en h <sup>-1</sup>	0,016	0,022	0,035
Temps de séjour en h	78,3	56,2	28,6
Température en °C	20,4	20,2	18,9
Sucres résiduels en g.L <sup>-1</sup>	7,9	12,9	7,4
Acide Malique en g.L <sup>-1</sup>	0,3	0,9	0,8
Population en phase liquide en cellules.mL <sup>-1</sup>	≈ 10 <sup>7</sup>	≈ 10 <sup>7</sup>	≈ 10 <sup>7</sup>

A la lecture des résultats, il est très clair que le changement d'échelle a eu un impact sur les performances du réacteur. En effet, pour atteindre les mêmes concentrations en sucres en sortie, le temps de séjour à échelle industrielle est plus que doublé par rapport à l'échelle pilote. Ainsi donc, pour une double fermentation continue à grande échelle 'finie' (suivant nos critères), un peu plus de 3 jours sont nécessaires.

Si le temps de séjour est réduit à 56 h, comme réalisé en fin de campagne, les valeurs cibles en sucres et en acide malique sont dépassées, légèrement dans le cas du sucre, plus largement pour l'acide malique. La grande différence que nous retrouvons sur l'acide malique s'explique non seulement par une diminution du temps de séjour mais également par une diminution de la vitesse de dégradation de l'acide malique (Figure 89), résultant très probablement d'une diminution de la concentration en acide malique dans le moût. En effet, comme indiqué par Taillandier (1990), plus la concentration en acide malique de départ est importante, plus la vitesse de dégradation sera forte.

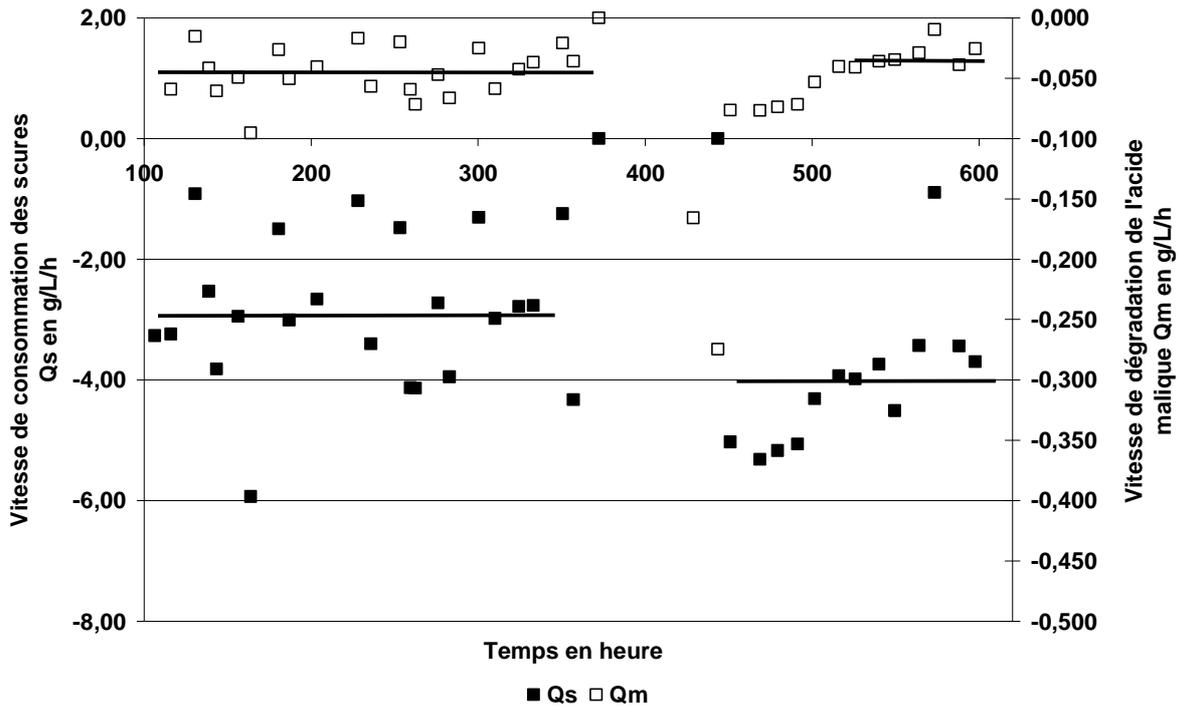


Figure 89 : Vitesses de fermentation alcoolique et maloalcoolique obtenues au cours du fonctionnement continu du réacteur industriel (120 hL, 39,5 g.L<sup>-1</sup> de billes de *S.cerevisiae* et 39,5 g.L<sup>-1</sup> de billes de *Sch.pombe*)

Au niveau des caractéristiques (Figure 90), le vin produit présente un taux d'alcool moyen de 11,6 % (v/v). Le dosage du glycérol montre une production constante de l'ordre de 4 g.L<sup>-1</sup>. Bien que la matière première présente une acidité totale assez élevée (de l'ordre de 5 g.H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>), l'acidité totale du vin est assez faible (autour de 3 g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>). Cette différence, relativement importante, vient essentiellement du fait que le moût servant à alimenter le réacteur est systématiquement refroidi et conservé à froid. Enfin, au niveau de l'acidité volatile, des valeurs plus élevées qu'en pilote ont été mesurées (valeurs moyennes de 0,4 contre 0,1 gH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>). Plusieurs faits permettent d'expliquer ces valeurs. Tout d'abord, des bactéries ont été observées dans le vin en sortie en début de campagne, indiquant clairement une contamination bactérienne partielle. De plus, nous avons également constaté que les sucres résiduels avaient tendance à fausser l'analyse de l'acidité volatile, la valeur mesurée est en fait légèrement surévaluée (entre 0,1 et 0,2 g.L<sup>-1</sup>).

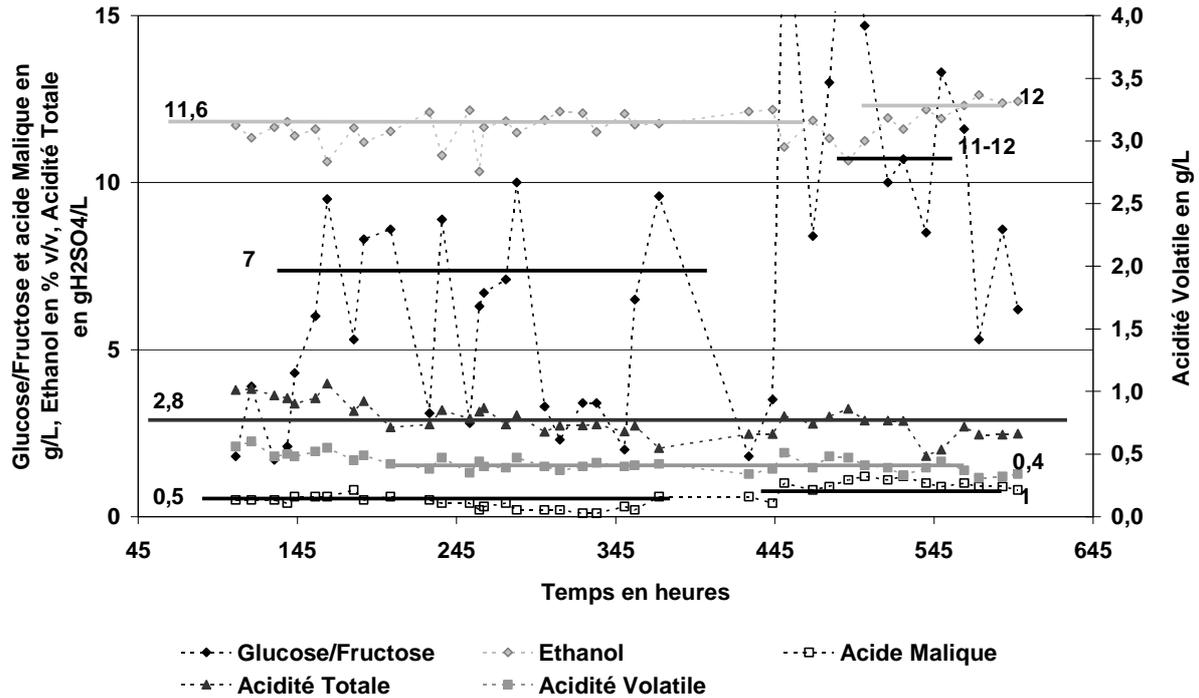


Figure 90 : Evolution des substrats et produits de fermentation au cours du fonctionnement en continu du réacteur industriel (120 hL, 39,5 g.L<sup>-1</sup> de billes de *S.cerevisiae* et 39,5 g.L<sup>-1</sup> de billes de *Sch.pombe*)

Comme cela a été précédemment fait sur les essais laboratoire et pilote, nous avons calculé le bilan matière et les rendements produits sur l'ensemble de la production (Tableau 75). Comme nous le constatons, le fait de changer d'échelle n'a pas d'impact sur la répartition du flux de sucres. Les mêmes rendements sont obtenus quelle que soit l'échelle considérée.

Tableau 75 : Rendements et bilan matière calculés sur l'ensemble de la production à l'échelle industrielle (120 hL)

Y <sub>ES</sub> en %	47,8
Y <sub>XS</sub> en %	0,3
Y <sub>GS</sub> en %	1,9
Y <sub>CO2S</sub> en %	47,8
<b>Bilan matière en %</b>	<b>97,8</b>

## II.4 Analyse du profil aromatique

Le vin produit en continu a fait l'objet de dégustation quotidienne afin de vérifier la qualité organoleptique du produit. Des échantillons ont été régulièrement prélevés et centrifugés en

laboratoire pour de futures dégustations par un jury expert composé de 9 personnes (Echantillons 1, 2 et 3 ; Figure 91). De plus, en fin de campagne, du vin a été mis de côté dans une cuve de 110 hL pour que celui-ci suive le même parcours que le vin produit à Rabastens, notamment pour la fin de fermentation et l'étape de centrifugation industrielle (Echantillon 4). Le produit de cette cuve a également fait l'objet de dégustation par un jury expert et a été comparé avec un assemblage contenant 20 % de vin produit en continu et 80 % de vin produit classiquement en batch en levures libres (Echantillon 5 ; Figure 92).

Les échantillons prélevés en cours de campagne et centrifugés en laboratoire (Figure 91) présentent un défaut liés aux développements de *Brettanomyces* supposés provenant très probablement d'une mauvaise conservation des échantillons. Malgré cela, nous observons que indépendamment de la date de prélèvement, les profils sont très similaires. Seuls les critères d'intensité végétal, maturité du fruit et structure tannique, directement liés à la matière première (cépage, maturité) sont différents. Comme cela avait été supposé, il apparaît donc que la vinification continue permet d'obtenir des vins aux profils très semblables.

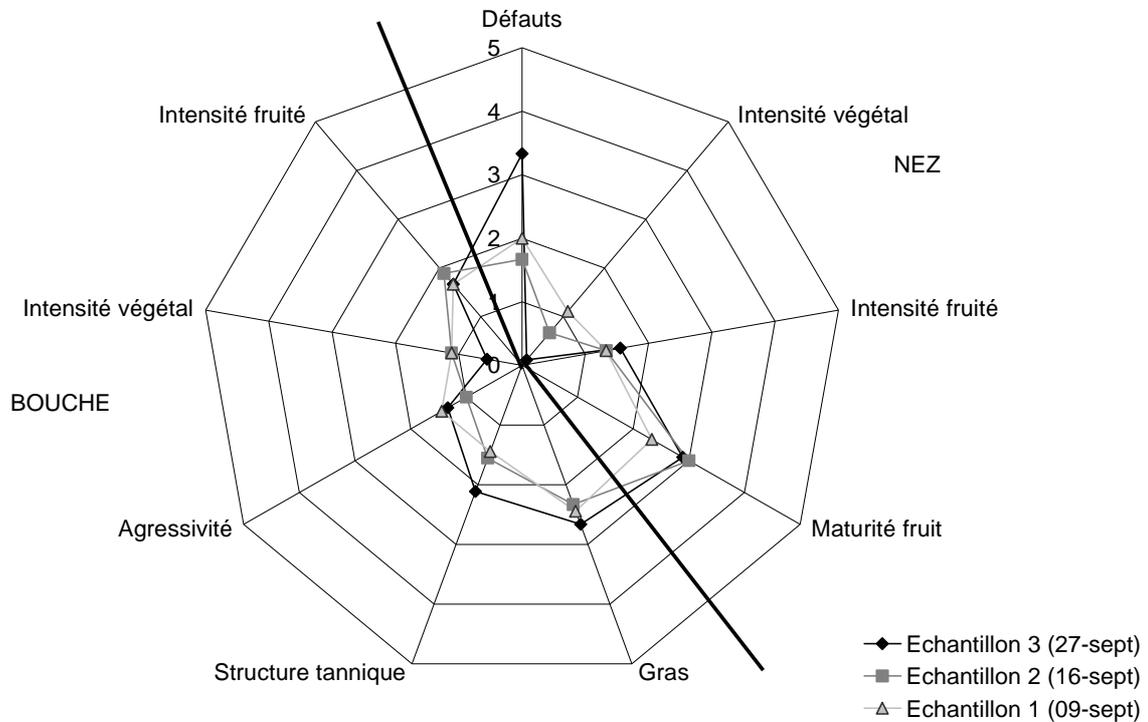


Figure 91 : Présentation du profil sensoriel des vins produits en continu à l'échelle industrielle (120 hL) et traités par centrifugation laboratoire

Pour la deuxième série de dégustation, vins centrifugés industriellement (Figure 92), les produits sont globalement très semblables. Seuls quelques critères diffèrent : la maturité et la structure tannique liée à la matière première (cépage, maturité) et l'agressivité très probablement liée à l'acidité résultant de l'acide malique résiduel ( $1 \text{ g.L}^{-1}$  pour l'échantillon 5 contre  $1,3 \text{ g.L}^{-1}$  pour l'échantillon 4).

Le procédé n'a donc d'impact ni négatif ni positif sur la qualité organoleptique du vin produit. Seule l'utilisation d'une souche de levures plus ou moins aromatique permettra de jouer sur le côté fruité du produit.

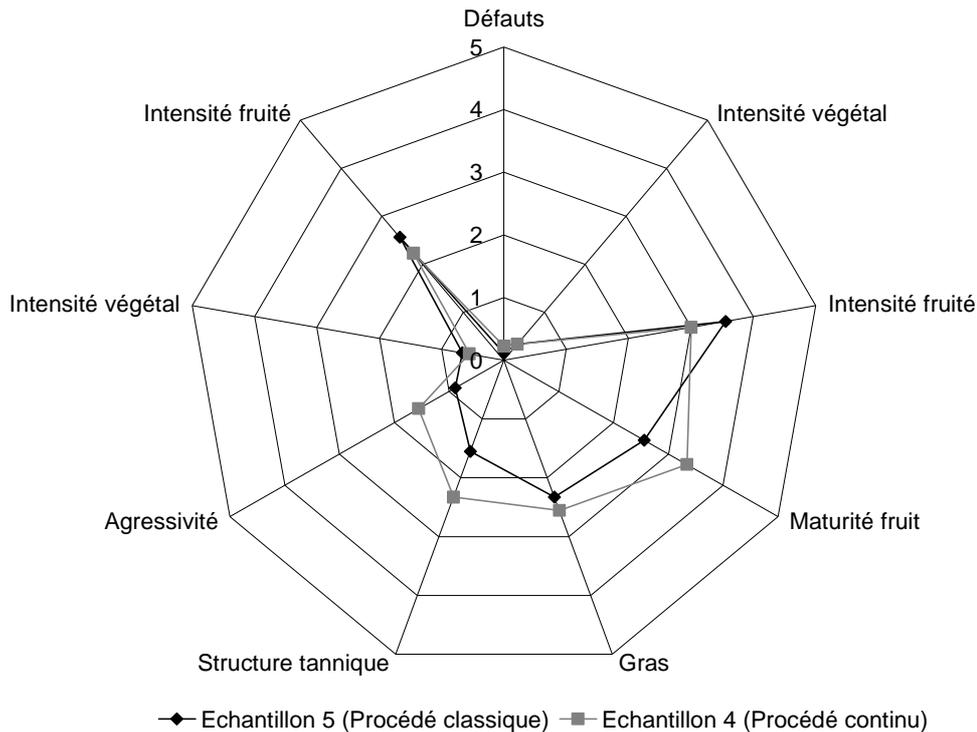


Figure 92 : Présentation du profil sensoriel du vin produit en continu et traité à l'échelle industrielle (120 hL) et comparaison avec un assemblage produit en cave

## II.5 Bilan de l'essai industriel

Malgré quelques dysfonctionnements, les essais industriels ont donné des résultats encourageants, tant sur les plans hydrodynamique qu'organoleptique. La seule ombre au tableau est la perte d'efficacité que nous avons noté dans le changement d'échelle.

Bien que cette perte d'efficacité soit des plus courantes lors des transferts industriels en fermentation, nous avons cherché une explication.

Nous avons notamment constaté qu'il existait un écart assez important dans les taux d'alcool des vins produits en 2010 et ceux produits en 2011, lié au taux de sucres initial. En effet, si nous prenons les données du Tableau 74, nous notons une différence moyenne de 0,5 % (v/v) entre l'essai pilote et l'essai industriel zone 2. Ceci correspond donc à un écart de  $8 \text{ g.L}^{-1}$  de sucres, écart que nous retrouvons également au niveau de la matière première. Comme nous travaillons autour de  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de sucres résiduels, c'est-à-dire dans la zone de fort ralentissement des vitesses, il est fort possible que cette différence engendre une vitesse de fermentation plus lente et donc un temps de séjour plus important.

Si cette explication est avérée (nouvel essai expérimental), il faudra en tenir compte et y faire très attention lors d'éventuelles installations dans les pays où les taux de sucres sont différents.

Mais il y aurait aussi une autre explication qui viendrait de l'hydrodynamique du réacteur. En effet, lorsque nous avons étudié la distribution des temps de séjour à l'échelle laboratoire, il est apparu une compartimentation probable du réacteur avec une zone de fluidisation et une zone exempte de billes. Or, lors de l'essai industriel, nous avons pu observer des pertes de billes par le haut régulière et importante traduisant donc une zone de fluidisation couvrant l'ensemble du réacteur et non plus une partie comme en laboratoire. Cette observation peut

s'expliquer directement par le changement d'échelle. La hauteur de liquide au-dessus du lit étant plus importante, le gaz produit en pied de cuve acquiert au fur et à mesure de son dégagement une vitesse plus importante qu'en laboratoire, sa vitesse limite, et provoque une fluidisation également plus forte. De ce fait, nous nous retrouvons non plus dans un modèle d'association de RAC mais dans un modèle RAC unique, ce qui signifie un travail à plus faible vitesse de fermentation. Ceci pourrait donc expliquer la perte d'efficacité constatée. Si cette dernière hypothèse est avérée, il nous faudra soit imposer une compartimentation en travaillant en configuration bi-étagée comme nous l'avons précédemment proposé, soit travailler à plus faible concentration en billes pour tenter de retrouver une compartimentation naturelle et intéressante au sein du réacteur.

Tableau 76 : Récapitulatif des paramètres moyens de fonctionnement obtenus sur les campagnes 2011 (120 hL) et 2010 (170 L)

	Valeur moyenne Essai industriel zone 1 ( $\pm$ Ecart type)	Valeur moyenne Essai industriel zone 2 ( $\pm$ Ecart type)	Valeur moyenne Essai pilote $\pm$ Ecart type
Température °C	20,4 $\pm$ 2,5	20,2 $\pm$ 1,3	18,9 $\pm$ 2,1
Débit d'alimentation L.h <sup>-1</sup>	144	201	4,336 $\pm$ 0,329
Taux de dilution h <sup>-1</sup>	0,016	0,022	0,035 $\pm$ 0,003
Temps de séjour h	78,3	56,2	28,6 $\pm$ 3,2

Tableau 77 : Récapitulatif des caractéristiques moyennes du produit obtenues sur les campagnes 2011 (120 hL) et 2010 (170 L)

	Valeur moyenne Essai industriel zone 1 ( $\pm$ Ecart type)	Valeur moyenne Essai industriel zone 2 ( $\pm$ Ecart type)	Valeur moyenne Essai pilote $\pm$ Ecart type
Concentration en sucres réducteurs en $\text{g.L}^{-1}$	$7,9 \pm 3,02$	$12,93 \pm 4,77$	$7,436 \pm 2,208$
Vitesse de consommation des sucres en $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$	-2,88	-3,96	$-6,836 \pm 0,684$
Concentration en acide malique en $\text{g.L}^{-1}$	$0,32 \pm 0,26$	$0,93 \pm 0,16$	$0,763 \pm 0,429$
Vitesse de dégradation de l'acide malique en $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$	-0,05	-0,04	$-0,097 \pm 0,017$
Concentration en éthanol en % (v/v)	$11,55 \pm 0,49$	$11,87 \pm 0,58$	$11,39 \pm 0,65$
Acidité totale en $\text{gH}_2\text{SO}_4.\text{L}^{-1}$	$3,18 \pm 0,43$	$2,63 \pm 0,41$	$3,178 \pm 0,303$
Acidité Volatile en $\text{gH}_2\text{SO}_4.\text{L}^{-1}$	$0,45 \pm 0,07$	$0,39 \pm 0,06$	$0,111 \pm 0,076$

### III. Faisabilité d'industrialisation

En conclusion, cet essai industriel en réacteur de 120 hL a été un petit succès. En effet, même si la mise en route et la stabilisation du fonctionnement du procédé n'a pas été complète, nous en avons validé la faisabilité industrielle. Le même phénomène de pseudo fluidisation a eu lieu sans qu'aucune rétention de gaz ne soit notée. D'autre part, nous avons enfin confirmé l'absence d'impact négatif du procédé sur la qualité organoleptique du vin. Malheureusement, ce transfert industriel montre également des pertes de performances au cours du changement d'échelle ; le temps de séjour pour une fermentation continue n'est plus d'une journée mais de 3 jours. Des hypothèses permettant d'expliquer cette perte de performances ont été émises mais des essais supplémentaires sont nécessaires afin de les valider et d'envisager une véritable mise en œuvre industrielle.

## **Conclusion**



Dans un souci d'augmentation de la productivité et de standardisation des produits, nous assistons à un important développement de nouveaux outils technologiques pour l'industrie du vin. C'est d'ailleurs la mission principale que se sont fixés les différents partenaires du projet VINNEO, qui ont réalisé que pour une meilleure compétitivité au niveau du marché mondial, il était nécessaire de se poser et prendre le temps de travailler à l'amélioration des techniques et produits de vinification.

Parmi les objectifs de ce projet, se trouve le développement d'un réacteur de vinification continue. Celui-ci permettrait, en plus d'augmenter la productivité, d'obtenir des vins de qualité plus homogène tout au long de la campagne de vinification. C'est dans ce but là, que nous avons travaillé à la conception d'un tel procédé, en utilisant des levures immobilisées. En effet, les levures immobilisées constituent une des rares solutions qui permettent la rétention de la biomasse au sein du réacteur et donc la mise en œuvre de procédé de fermentation en continu.

Dans un premier temps, nous avons étudié le comportement des levures *S.cerevisiae* immobilisées, commercialisées par la société Proenol. Cette étude plutôt fondamentale, nous a permis de confirmer dans un premier temps, que l'immobilisation des levures n'avait d'impact ni sur l'activité spécifique de celles-ci ni sur leur métabolisme. Nous avons également mis en évidence l'existence d'une concentration optimale en billes qui n'était pas la plus haute. En effet, du fait de la répartition des levures au sein de la bille, nous aurions pu penser qu'une certaine limitation du transfert de matière aurait lieu et qu'en augmentant la concentration en billes, les vitesses de fermentation seraient augmentées. Or, nous avons constaté le phénomène inverse ; la présence d'une trop forte population de levures engendrerait une compétition nutritive face au substrat ce qui limiterait leur activité. Au cours de ces essais, nous avons également observé une libération des cellules dans la phase liquide qui a donné lieu à une accélération des cinétiques de fermentation au cours des divers recyclages de billes.

Afin de réunir fermentation alcoolique et dégradation de l'acide malique en une seule et même étape, nous nous sommes ensuite intéressés à la faisabilité d'une culture mixte en utilisant des billes de *S.cerevisiae* et des billes de *Sch.pombe* également commercialisées par la société Proenol. Des premiers essais en cultures pures de *Sch.pombe* ont montré que les observations faites sur les levures *S.cerevisiae* étaient également valables pour les levures *Sch.pombe*. Néanmoins, lors des essais en cultures mixtes, nous avons constaté que ce n'était plus le cas : les levures *S.cerevisiae* auraient un effet inhibiteur sur la croissance des levures *Sch.pombe* mais pas d'effet sur l'activité désacidifiante de celles-ci. Ainsi, les cinétiques de dégradation d'acide malique en cultures mixtes n'évoluent pas avec le recyclage.

Grâce à tous ces essais, nous avons défini une concentration et un ratio de deux catégories en billes adaptés permettant la réalisation d'une double fermentation en a priori une quarantaine

d'heures. Ceci représenterait donc des gains de temps important puisque classiquement, les fermentations alcoolique et malolactique, au niveau industriel, durent respectivement plusieurs jours et plusieurs semaines.

La deuxième partie de notre travail a ensuite été de concevoir un réacteur permettant de réaliser la double fermentation en continu. La problématique principale ici a été de définir une configuration permettant de limiter les risques de problèmes d'ordre hydrodynamique propres aux systèmes tri-phasiques à production de gaz intrinsèque et non contrôlée. Trois configurations différentes ont été testées : le lit fluidisé recirculé, le lit fixe vertical et le lit fixe horizontal. Et de ces trois, nous avons finalement retenu la configuration la plus simple, le lit fixe vertical. En effet, la fluidisation aurait engendré à l'échelle industrielle un coût trop important et le lit horizontal a montré une faible efficacité par rapport à son homologue vertical. Ainsi donc, nous avons obtenu à l'échelle laboratoire, un procédé permettant une production continue de vin à  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de sucres résiduels et  $0-0,5 \text{ g.L}^{-1}$  d'acide malique en environ une journée de temps de séjour. Cependant, nous avons également observé un phénomène de fluidisation intermittente du lit de billes provoquée par le gaz produit par la fermentation. Bien que n'ayant engendré aucun problème majeur tant sur le plan hydrodynamique que sur le plan cinétique, il nous a fallu vérifier la faisabilité du procédé à plus grande échelle.

Un essai pilote a donc été réalisé au cours de la campagne de vendange 2010 dans un réacteur de 1,5 hL sur le site industriel de Rabastens. Grâce à cet essai, nous avons pu confirmer l'intérêt d'une double fermentation continue puisque nous avons obtenu un vin à  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de sucres résiduels et  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  d'acide malique résiduel en moins de un jour de fermentation, et ceci sur une période d'au moins 6 semaines. Néanmoins, vers la fin de campagne, nous avons noté une certaine déviation au niveau de la concentration en acide malique démontrant une baisse de la vitesse de désacidification des *Sch.pombe*. Bien que non démontrée, nous avons émis l'hypothèse suivante : en fin de campagne, la concentration en acide malique dans le moût étant plus faible, les vitesses de désacidification sont partiellement diminuées et il devient difficile d'épuiser complètement l'acide malique avec le temps de séjour imposé. Malgré cela, les vins obtenus ont été analytiquement très proches des produits laboratoire et organoleptiquement corrects par rapport au vin témoin produit par la cave de Rabastens. Enfin, tout au long de cet essai, nous avons de nouveau observé le phénomène de fluidisation intermittente remarqué en laboratoire, mais aucune rétention de gaz n'a eu lieu. Tout ceci a fait que les essais à l'échelle pilote ont été un vrai succès.

Néanmoins, dans les conditions de l'essai pilote, il est apparu que le besoin en billes pour une production industrielle était important. Nous avons donc cherché à réduire ce besoin en travaillant à l'optimisation du fonctionnement de notre réacteur.

Pour ce faire, nous avons cherché à modéliser et comprendre le fonctionnement hydrodynamique du réacteur continu. En effet, du fait même de la fluidisation, nous n'avons pas un comportement identifiable aux modèles classiques type réacteur agité et réacteur

piston, mais plutôt un comportement intermédiaire. Après une analyse de distribution de temps de séjour, réalisée en mesurant la conductivité du vin en sortie après injection d'un pulse de NaCl, nous avons constaté que notre réacteur avait un comportement semblable à deux réacteurs agités en série, mais de volumes différents. Ainsi, il semblerait que nous ayons un premier réacteur mélangé dans la zone de fluidisation des billes, fonctionnant à 30-40 g.L<sup>-1</sup> de sucres résiduels et un deuxième réacteur mélangé en tête de colonne, où les turbulences sont moins importantes, fonctionnant à 10 g.L<sup>-1</sup> de sucres résiduels.

Compte tenu de ce résultat, nous avons testé une configuration bi-étagée de notre procédé. Dans ce cas là, le premier étage fonctionnerait à la vitesse correspondant à 40 g.L<sup>-1</sup> de sucres résiduels et le deuxième étage aurait une compartimentation et donc deux vitesses. Nous avons également vérifié l'impact de la concentration en billes sur le fonctionnement du procédé, en configuration mono-étagée et en configuration bi-étagée. D'après une série de simulations numériques utilisant les modèles classiques du RAC et du réacteur piston et quelques expérimentations, il est apparu possible de réduire le temps de séjour à seulement une journée en travaillant en configuration bi-étagée. Ceci impliquerait un gain sur la quantité de billes nécessaire non négligeable puisque celle-ci serait pratiquement divisée par deux.

Compte tenu des gains espérés par une configuration bi-étagée, nous avons réalisé un transfert industriel lors de la campagne de vendanges 2011. Pour des raisons logistiques et financières, la configuration choisie pour ces essais a été la même que lors de l'essai pilote, l'objectif étant de valider le procédé au niveau hydrodynamique, cinétique et organoleptique sur une cuve de 120 hL.

Contrairement à l'essai 2010, l'essai 2011 a été plus délicat à mettre en œuvre. En effet, de petits dysfonctionnements ne nous ont pas permis d'obtenir une franche stabilisation du procédé. Néanmoins, nous avons tout de même observé une bonne fluidisation des billes et obtenu un temps de séjour de l'ordre de 3 jours pour produire un vin à moins de 10 g.L<sup>-1</sup> de sucres résiduels et 0,5 g.L<sup>-1</sup> d'acide malique résiduel. De plus, la réalisation de dégustation par un jury expert indique que le vin produit par fermentation continue est très proche du témoin, sans défaut ni différence majeure ; le procédé continu n'a donc pas d'impact sur la qualité organoleptique du produit.

Mais, en termes cinétiques, les résultats restent moins bons que ceux espérés après l'essai pilote de 2010. Notre hypothèse est que le changement d'échelle engendre une modification du comportement hydrodynamique du réacteur. Du fait d'une hauteur de colonne bien plus importante, la zone de fluidisation serait bien plus grande voire même unique. Nous aurions donc à grand échelle un réacteur se comportant comme un RAC et non comme deux, les vitesses de fermentations seraient donc plus faibles, ce qui expliquerait les pertes de performance constatées entre l'échelle pilote et l'échelle industrielle. Cela confirme également l'intérêt de travailler sur la compartimentation du procédé en deux étages.

Ainsi, cette étude nous aura permis de montrer la faisabilité technique d'un procédé continu réunissant fermentations alcoolique et maloalcoolique à l'échelle laboratoire, pilote et industrielle. Et bien que les essais à l'échelle industrielle n'aient pas atteint les performances

obtenus en laboratoire et en pilote, notre compréhension du système nous permet d'espérer des performances très semblables, notamment en envisageant une modification du procédé en une configuration bi-étagée.

Quoiqu'il en soit, en comparaison avec un procédé classique, le procédé continu de double fermentation du jus de raisin développé ici permet un gain de production de plusieurs jours voire semaines puisque nous produisons un vin, considéré comme fini pour certaines applications, en seulement 3 jours.

Les perspectives d'industrialisation de cette nouvelle technologie sont donc bien réelles puisque l'augmentation de productivité, la suppression des temps morts et l'homogénéisation de la production sont autant de points positifs intéressants fortement les caves viticoles. Cependant, avant de poursuivre cette démarche d'industrialisation, des études complémentaires sont nécessaires.

En effet, bien que très prometteuse, la configuration bi-étagée a montré quelques faiblesses au niveau de la dégradation de l'acide malique. Pour améliorer ce fait, deux expériences sont à réaliser : réunir toutes les billes de *Sch.pombe* dans le 1<sup>e</sup> étage ou augmenter la concentration en billes de *Sch.pombe* toujours dans ce 1<sup>e</sup> étage. Une fois le procédé défini à l'échelle laboratoire, un essai industriel devra ensuite être mené afin de valider cette configuration.

D'autre part, nous avons pu constater au cours de cette étude, que le coût en billes était relativement important. La matrice d'alginate des billes en est le facteur prépondérant. Modifier cette matrice soit par des alginates de qualité moindre, soit par une autre matrice (gel de Silice), soit encore en adsorbant les levures sur des supports autorisés par la législation (copeaux de chêne...) est donc un point essentiel pour rendre cette nouvelle technologie plus compétitive.

Enfin d'un point de vue organoleptique, le vin produit ici présente des profils relativement pauvres par rapport au témoin du fait de l'utilisation de souches de levures différentes dans les deux cas. Ces profils pourraient donc être améliorés en utilisant une souche de levures *S.cerevisiae* différente sélectionnée pour obtenir le profil organoleptique souhaité. Plus largement, il est également envisageable de travailler à la modulation du profil aromatique en utilisant des souches différentes.

D'un point de vue plus fondamental, il est important de poursuivre et d'approfondir l'étude cinétique des levures immobilisées. En effet, dans notre travail, beaucoup d'hypothèses ont été émises notamment au niveau des changements cinétiques comme celui lié à l'inhibition par l'éthanol, et des mécanismes associés impliquant ce catalyseur. La compréhension de ces phénomènes sera utile pour appréhender le comportement des levures immobilisées sur une nouvelle matrice ou avec une technique d'immobilisation différente.

D'autre part, il est intéressant de poursuivre sur la thématique originale du système triphasique où le gaz est produit. A ce jour et à notre connaissance, cette thématique reste mal connue. Ainsi, comprendre plus en détail le fonctionnement du réacteur permettrait d'expliquer les écarts obtenus entre les temps de séjour idéaux et expérimentaux et de valider les hypothèses d'écarts de fonctionnement entre les échelles laboratoire, pilote et industrielle.

## **Références**



Réussir l'avenir de la viticulture de France, propositions présentées par Bernard Pomel, préfet, chargé de la coordination nationale des comités de bassin viticole pour la mise en œuvre d'un plan national de restructuration, mars 2006.

La France tombe au 3<sup>e</sup> rang des exportateurs de vin en volume, Le Nouvel Observateur, 8 avril 2009.

Inoxview, the Inoxpa Newsletter, August 2009.

Axelsson A (1988) Experimental studies of immobilized yeast, packed-bed reactors with reduced CO<sub>2</sub> entrapment. *Appl Biochem Biotech* 18:91-109.

Bakoyianis V, Kanellaki M, Kalliafas A, Koutinas A.A. (1992) Low temperature wine-making by immobilized cells on mineral kissiris. *J Agric Food Chem* 40:1293-1296.

Bakoyianis V, Kana K, Kalliafas A, Koutinas AA (1993) Low-temperature continuous wine-making by kissiris-supported biocatalyst: Volatile byproducts. *J Agric Food Chem* 41:465-468.

Bakoyianis V, Koutinas AA, Agelopoulos K, Kanellaki M (1997) Comparative study of kissiris, gamma-alumina, and calcium alginate as supports of cells for batch and continuous wine-making at low temperatures. *J Agric Food Chem* 45:12:4884-4888.

Balli D, Flari V, Sakellarakis E, Schoina V, Iconomopoulou M, Bekatorou A, Kanellaki M (2003) Effect of yeast cell immobilization and temperature on glycerol content in alcoholic fermentation with respect to wine making. *Process Biochem* 39:499-506.

Bardi E, Koutinas AA (1994) Immobilization of yeast on delignified cellulosic material for room temperature and low-temperature wine making. *J Agric and Food Chem* 42:221-226.

Bardi E, Koutinas AA, Psarianos C, Kanellaki M (1997) Volatile by-products formed in low temperature wine-making using immobilized yeast cells. *Process Biochem* 32:579-584.

Benard P, Bourzeix M, Flanzky C (1980) La vinification avec chauffage de la vendange, résultats de 10 années d'expérimentation. Edition INRA.

Bettmann H and Rehm HJ (1984) Degradation of phenol by polymer entrapped microorganisms. *Appl Microbial Biotechnol* 20:285-290.

Bony M, Bidart F, Camarasa C, Ansanay V, Dulau L, Barre P, Dequin S (1997) Metabolic analysis of *S. cerevisiae* strains engineered for malolactic fermentation. *FEBS Letters* 410:452-456.

Boulet JC, Escudier JL (1998) "Vinifications en rouge" dans Œnologie, fondements scientifiques et technologiques. Lavoisier 797-805.

Boulton RB, Singleton VL, Bisson LF (1996) Principles and practices of winemaking. Springer 1<sup>st</sup> edition.

- Bucke C (1986) "Techniques for Cell Immobilization" dans Process Engineering Aspects of Immobilized Cell Systems. Institute of Chemical Engineers.
- Busova K, Magyar I, Janky F (1994) Effect of immobilized yeasts on the quality of bottlefermented sparkling wine. *Acta Aliment* 23:9–23.
- Casey GP, Ingledew WMM (1986) Ethanol tolerance in yeasts. *Crit Rev Microb* 13:3:219-280.
- Ciani M (1995) Continuous deacidification of wine by immobilized *Schizosaccharomyces pombe* cells – Evaluation of malic acid degradation rate and analytical profiles. *J Appl Bact* 79:6:631-634.
- Ciesarová Z, Šmogrovičová D, Dömény Z (1996) Enhancement of yeast ethanol tolerance by calcium and magnesium. *Folia Microbiol* 43(1):55-58.
- Ciesarová Z, Dömény Z, Šmogrovičová D, Pátková J, Šturdík E (1998) Comparison of ethanol tolerance of free and immobilized *Saccharomyces uvarum* yeasts. *Folia Microbiol* 43(1):55-58.
- Daugulis AJ, Swaine DE (1987) Examination of substrate and product inhibition kinetics on the production of ethanol by suspended and immobilized cell reactors. *Biotechnol Bioeng* 29:639-645.
- Desseigne JM, Grenier P (1998) “Diversification et optimisation des traitements” dans Œnologie, fondements scientifiques et technologiques thermiques. Lavoisier 1229-1232.
- Domeny Z, Smogrovicova D, Sturdik E (1998) Continuous fermentation processes in beer production using immobilized yeast. *Chemicke Listy* 29 :9 :722-728.
- Doran PM and Bailey JE (1986) Effects of immobilization on growth, fermentation properties, and macromolecular composition of *Saccharomyces cerevisiae* attached to gelatine. *Biotechnol Bioeng* 28:73-87.
- Dragone G, Mussatto SI, Almeida e Silva JB (2007) High gravity brewing by continuous process using immobilised yeast: Effect of wort original gravity on fermentation performance. *J Inst Brew* 113:4:391-398.
- Drichoutis P, Nerantzis ET, Liouni M (2007) Continuous production of wine in a tower fermentor using entrapped yeast cells in double layer alginate – chitosan beads. *e-journal of Science and Technology* 3:2:51-60.
- Ergun S (1952) Fluid flow through packed columns. *Chem Eng Prog* 48:2:89-94
- Galazzo JL, Bailey JE (1990) Growing *Saccharomyces cerevisiae* in calcium-alginate beads induces cell alterations which accelerate glucose conversion to ethanol. *Biotechnol Bioeng* 36:417-426.
- Gòdia F, Casas C, Solà C (1985) Alcoholic fermentation by immobilized yeast cells. *J Chem Tech Biotechnol* 35B:139-144.
- Gòdia F, Casas C, Castellano B, Solà C (1987) Immobilized cells: behaviour of carrageenan entrapped yeast during continuous ethanol fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 26:342-346.
- Gòdia F, Solà C (1995) Fluidized bed bioreactors. *Biotechnol Progress* 11:5:479-497.

- Göksungur Y, Zorlu N (2001) Production of Ethanol from Beet Molasses by Ca-Alginate Immobilized Yeast Cells in a Packed-Bed Bioreactor. *Turk J Biol* 25:265-275.
- Hannoun BJM, Stephanopoulos G (1986) Diffusion coefficients of glucose and ethanol in cell-free and cell-occupied calcium alginate membranes. *Biotechnol Bioeng* 28:829-835.
- Hilge-Rotmann B, Rehm HJ (1990) Comparison of fermentation properties and specific enzyme activities of free and calcium-alginate-entrapped *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 33:54-58.
- Jirků V, Masák J and Ěejková A (2000) Yeast cell attachment: a tool modulating wall composition and resistance to 5-bromo-6-azauracil. *Enzyme Microb Technol* 26:808-811.
- Karel SF, Libicki SB, Robertson CR (1985) The immobilization of whole cells: engineering principles. *Chem Eng Science* 40:8:1321-1354.
- Kolot FB (1980) New trends in yeast technology immobilized cells. *Process Biochem* 10:2-8.
- Kourkoutas Y., Komaitis M, Koutinas A.A., Kanellaki M., (2001), Wine production using yeast immobilized on apple pieces at low and room temperature, *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 49, 1417-1425.
- Kourkoutas Y, Bekatourou A, Banat IM, Marchant R, Koutinas AA (2004) Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production : a review. *Food Microbiol* 21:377-397.
- Lange H, Bavouzet JM, Taillandier P, Delorme C (1993) Systematic error and comparison of four methods for assessing the viability of *Saccharomyces cerevisiae* suspension. *Biotechnol Tech* 7:223-228.
- Lebeau T, Jouenne T, Junter GA (1998) Diffusion of sugars and alcohols through composite membrane structures immobilising viable yeast cells. *Enzyme Microb Technol* 22:434-438.
- Lee TH, Ahn JC, Ryu DDY (1983) Performance of an immobilized yeast reactor system for ethanol production. *Enz Microb Tech* 5:1: 41-45.
- Levenspiel O. (1999) *Chemical reaction engineering*. Wiley, 3<sup>rd</sup> edition.
- Lonvaud A, Renouf V, Strehaiano P (2010) *Microbiologie du vin: bases fondamentales et applications*. Lavoisier.
- Mallouchos A, Komaitis M, Koutinas AA, Kanellaki M (2003) Wine fermentations by immobilized and free cells at different temperatures. Effect of immobilization and temperature on volatile by-products. *Food Chem* 80:109–113.
- Mayer K, Temperli A (1963) The metabolism of l-malate and others compounds by *Schizosaccharomyces pombe*. *Archiv Mikrobiol* 46:321-328.
- McGhee JE, Stjulian G, Detroy RW (1982) Continuous and static fermentation of glucose to ethanol by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells of different ages. *Appl Env Microb* 44:1:19-22.
- McMullin RB, Weber M (1935) The theory of short-circuiting in continuous-flow mixing vessels in series and kinetics of chemical reactions in such systems. *Trans Am Inst Chem Eng* 31:2:409-458.

- Melzoch K, Rychtera M, Hábová V (1994) Effect of immobilization upon the properties and behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* cells. *J Biotechnol* 32:59-65.
- Mensour NA, Margaritis A, Briens CL, Pilkington H, Russell I (1997) Developments in the brewing industry using immobilised yeast cell bioreactor systems. *Journal of the institute of brewery* 103:6:363-370.
- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31:426-428.
- Monbouquette HG, Sayles GD, Ollis DF (1990) Immobilized cell biocatalyst activation and pseudo-steady-state behaviour: model and experiment. *Biotechnol Bioeng* 35:609-629.
- Nabais RC, Sa-correia J, Viegas CA, Novais JM (1988) Influence of calcium ions on ethanol tolerance of *Saccharomyces bayanus* and alcoholic fermentation by yeasts. *Appl Environ Microbiol* 54:2439-2446.
- Nagashima M, Azuma M, Noguchi S, Inusuka K (1984) Continuous ethanol fermentation using immobilized yeast cells. *Biotechnol Bioeng* 26:992-997.
- Nedović V, Willaert R, Leskošek-Čukalović I, Obradović B, Bugarski B (2005) "Beer production using immobilized cells" dans: *Applications of Cell Immobilization Biotechnology*, V. Nedović & R. Willaert, Eds. Springer, 259-274.
- Norton S and D'Amore T (1994) Physiological effects of yeast cell immobilization: Application for brewing. *Enz Microb Technol* 16:365-375.
- Norton S, Watson K, D'Amore T (1995) Ethanol tolerance of immobilized brewers' yeast cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 43:18-24.
- Ogbonna JC, Amano Y, Nakamura K, Yokotsuka K, Shimazu Y, Watanabe M, Hara S (1989) A multistage bioreactor with replaceable bioplates for continuous wine fermentation. *Am J Enol Viti* 40:4:292-298.
- Phillips CR, Poon YC (1988) *Immobilization of cells*. Springer-Verlag, Berlin.
- Poulard A, Reberteau R, Rousset Y (1985) La microflore des phases préfermentaires. *Rev Fr Oenol* 99:14-19.
- Puligundla P, Poludasu RM, Rai JK, Obulam VSR (2011) Repeated batch ethanolic fermentation of very high gravity medium by immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann Microbiol* :1-7.
- Ribéreau-Gayon J, Peynaud E, Ribéreau-Gayon P, Sudraud P (1975) *Traité d'œnologie. Science et technique du vin*. Dunod (Ed), Paris, Tome II, 548-551.
- Ribéreau-Gayon J, Peynaud E, Ribéreau-Gayon P, Sudraud P (1976) *Traité d'œnologie. Vinification. Transformations du Vin. Sciences et Techniques du Vin*. Dunod (Ed), Paris, Tome III.
- Ribéreau-Gayon P (1991) *Le vin*. Presses Universitaires de France. Paris, France.
- Ribéreau-Gayon P, Dubourdieu D, Donèche B, Lonvaud A (1998) *Microbiologie du vin, Vinification*. Dunod (Ed.), Paris, Tome I.

- Ruggeri B, Sassi G, Gianetto A, Specchia V, Bosco F (1992) Mass transfer and observed activity for entrapped biomass. *Chem Eng Sci* 47:2363-2368.
- Ryder DS and Masschelein CA (1985) The growth process of brewing yeast and the biotechnological challenge. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 43:66-75.
- Serra A (2004) Production d'hybrides *S.cerevisiae* \* *S.uvarum* : contraintes physiologiques et procédé. Thèse Institut National Polytechnique de Toulouse, France.
- Shiotani T and Yamané T (1981) A horizontal packed-bed bioreactor to reduce CO<sub>2</sub> gas holdup in the continuous production of ethanol by immobilized yeast cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 13(2):96-101.
- Silva DP, Branyik T, Dragone G, Vicente AA, Teixeira JA, Almeida e Silva JB (2008) High gravity batch and continuous processes for beer production: Evaluation of fermentation performance and beer quality. *Chemical Papers* 62:1:34-41.
- Silva S, Ramon Portugal F, Silva P, De Fatima Texeira M, Strehaiano P (2002) Use of encapsulated yeast for the treatment of stuck and sluggish fermentations. *J Int Sci Vigne Vin* 36:161–168.
- Silva S, Ramon Portugal F, Andrade P et al. (2003) Malic acid consumption by dry immobilized cells of *Schizosaccharomyces pombe*. *American Journal of Enology and Viticulture* 54:50-55.
- Singh RS, and Sooch BS, (2009) High cell density reactors in production of fruits wine with special reference to cider – An overview. *Natural Product Radiance* 8(4):323-333
- Strasser de Saad AM (1983) Enzima malolactica on *Lactobacillus murinus* CNRZ 2313. These Universidad Nacional de Tucuman, Facultad de Biochimica, Quimica y Farmacia, Argentina.
- Strehaiano P (1984) Phénomènes d'inhibition et fermentation alcoolique. Thèse Institut National Polytechnique de Toulouse, France.
- Strehaiano P., Ramon Portugal F., Taillandier P., (2006), “Yeasts as biocatalysts” dans: *The Yeast Handbook vol.2 : Yeasts in food and beverages*, Querol A. et Fleet G. Eds Springer, 243-283.
- Swiegers JH, Bartowksy EJ, Henschke PA, Pretorius IS (2005) Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Austral J Grape Wine Res* 11:127-138.
- Taillandier P, Riba JP, Strehaiano P (1988) Malate utilisation by *Schizosaccharomyces pombe*. *Biotechnol Lett* 10:469-472.
- Taillandier P (1990) Désacidification des moûts par *Schizosaccharomyces*. Analyse cinétique et métabolique. Thèse Institut National Polytechnique de Toulouse, France.
- Taillandier P, Riba JP, Strehaiano P (1991) Malate degradation by *Schizosaccharomyces* yeasts included in alginate beads. *Bioprocess Engineering* 7:141-144.
- Taillandier P, Cazotte ML, Strehaiano P (1994) Deacidification of grape musts by *Schizosaccharomyces* entrapped in alginate beads – A continuous fluidized bed process. *Chem Eng J Biochem Eng J* 55:1-2:B29-B33.

- Taillandier P, Gilis M, Strehaiano P (1995) Deacidification by *Schizosaccharomyces*: interactions with *Saccharomyces*. *Journal of Biotechnology* 40:199-205.
- Tata M, Duncombe D, Lau V, Fehring J, Eyder D (1999) Continuous beer fermentation using immobilized yeast in a fluidized bed bioreactor system. *Abs Papers American Chem Society* 217 :U170-U170.
- Tyagi RD, Gupta SK, Chand S (1992) Process engineering studies on continuous ethanol-production by immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry* 27:1:23-32.
- Ugliano M and Henschke PA (2009) Yeasts and Wine Flavour. *Wine Chemistry and Biochemistry II*:313-392.
- Uematsu K, Fong D, Ryu DDY (1988) Development of continuous fermentation using immobilized yeast-cells for wine cooler process development. *Appl Biochem Biotech* 19:2:177-188.
- Valach M, Navratil M, Horvathova V, Zigova J, Sturdik E, Hrabarova E, Gemeiner P (2006) Efficiency of a fixed-bed and a gas-lift three-column reactor for continuous production of ethanol by pectate- and alginate-immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Chemical Papers* 60:2:154-159.
- Van Dieren B (1995) “Yeast metabolism and the production of alcohol-free beer” dans: *EBC Symposium “Immobilized Yeast Applications in the Brewery Industry”*, Monograph XXIV, Oct 1995, Espoo, Finland: Verlag Hans Carl Getränke-Fachverlag, 66–76.
- Verbelen PJ, De Schuter DP, Delvaux F, Verstrepen KJ, Delvaux FR (2006) Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. *Biotechnol Lett* 28: 1515-1525.
- Vives C, Casas C, Gòdia F, Solà C (1993) Determination of the intrinsic fermentation kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized in Ca-alginate beads and observations on their growth. *Appl Microbiol Biotechnol* 38:467-472.
- Wibowo D, Eschenbruch R, Davis CR, Fleet GH, Lee TH (1985) Occurrence and Growth of Lactic Acid Bacteria in Wine: A Review. *American Journal of Enology and Viticulture* 36:4:302-313.
- Willaert R and Baron R (1993) Growth kinetics of gel-immobilized yeast cells studied by on-line microscopy. *Appl Microbiol Biotechnol* 39:347-352.
- Willaert R and Baron G (1996) Gel entrapment and microencapsulation: Methods, applications and engineering principles. *Rev Chemistry Engineering* 12, 1 et 2.
- Yadav BS, Rani U, Dhamija SS, Nigam P, Singh D (1996) Process optimization for continuous ethanol fermentation by alginate-immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* HAU-1. *J Basic Microb* 36:3:205-210.
- Yajima M, Yokotsuka K (2001) Volatile compound formation in white wines fermented using immobilized and free yeast. *Am J Enol Vitic* 52:210–218.
- Yokotsuka K, Otaki IA, Naitoh A, Tanaka H (1993) Controlled simultaneous deacidification and alcohol fermentation of high acid grape must using two immobilized yeasts, *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*. *American Journal of Enology and Viticulture* 44:371-377.



Doctorat de l'Université de Toulouse

Délivré par l'Institut National Polytechnique de Toulouse

Ecole doctorale Mécanique, Energétique, Génie Civil et Procédés

Spécialité Génie des Procédés et de l'Environnement

Date de soutenance : 27 Février 2012

Caroline KASSIM

Résumé : Un nouveau procédé intensifié de vinification continue avec un mélange de levures *S.cerevisiae* et *Sch.pombe* immobilisées dans des billes d'alginate est proposé. A l'échelle laboratoire, l'étude de la teneur en billes et de la configuration du réacteur conduit à l'obtention d'un réacteur de type lit fixe permettant une production de vin en 35 heures. Des validations du procédé aux échelles pilote (170 L) puis industrielle (120 hL) montrent que, en cave, du vin de qualité semblable au témoin est produit en 2 à 3 jours. Une analyse du comportement du réacteur a identifié des raisons de pertes de performances liées à l'hydrodynamique lors du changement d'échelle ainsi que des axes améliorations possibles. Ce procédé permet d'obtenir un vin de qualité maîtrisée et un gain de temps de plusieurs semaines.

Mots-clés : Levures immobilisées, Billes d'alginate, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, Vinification continue, Fermentation industrielle.

Abstract: From a batch to another, produced wines are usually different because of the different alcoholic and malolactic fermentation courses. To blend wines quality and continue wine production industrialization, a new continuous process, using Ca-alginate immobilized yeast cells, was developed for red wine-making. Working with a blending of *S.cerevisiae* and *Sch.pombe* allowed the regrouping of the alcoholic and malolactic fermentations in a unique step. After testing different reactor set-ups at lab scale, the selected process, a vertical bed reactor, was used in real wine-making conditions, firstly in a pilot reactor (170 L) and then in an industrial one (120 hL). The results showed that continuous wine-making was possible in 2 to 3 days. The wine presented nearly the same sensory profile compared to a classical one. Thanks to the analysis of the reactor behaviour, we were able to explain the efficiency losses linked to the hydrodynamic, observed during the scale-up. This new intensified process enables to obtain a wine with a controlled quality and to save several weeks of production time.

Keywords: Immobilized yeast cells, Ca-alginate beads, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, Continuous wine-making, Industrial scale-up.