



Procédé d'immobilisation de levures pour applications oenologiques. Etudes des paramètres du procédé.

Validations expérimentales

Filipe Monteiro Centeno da Costa

► To cite this version:

Filipe Monteiro Centeno da Costa. Procédé d'immobilisation de levures pour applications oenologiques. Etudes des paramètres du procédé. Validations expérimentales. Génie des procédés. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 2011. Français. NNT : 2011INPT0061 . tel-04552454

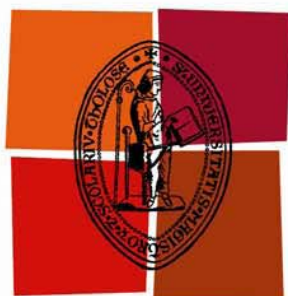
HAL Id: tel-04552454

<https://theses.hal.science/tel-04552454>

Submitted on 19 Apr 2024

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 :

Filipe CENTENO

le : mardi 19 juillet 2011

Titre :

PROCÉDÉ D'IMMOBILISATION DE LEVURES POUR APPLICATIONS
ŒNOLOGIQUES. ÉTUDES DES PARAMÈTRES DU PROCÉDÉ. VALIDATIONS
EXPERIMENTALES

JURY

M. P. STREHAIANO, Professeur, INP-ENSIACET, Toulouse

Mme M. ALLIET, Maître de conférences, INP-ENSIACET, Toulouse

Mme M. F. TEIXEIRA, PDG Proenol – Ind. Biotecnológica, Porto

M. J. M. SABLAYROLLES, Directeur de Recherche, INRA Montpellier

M. R. CHEDAS SAMPAIO, Professeur, ISEL, Lisboa

Ecole doctorale :

Mécanique, Énergétique, Génie civil et Procédés (MEGeP)

Unité de recherche :

Laboratoire de Génie Chimique (LGC) – UMR CNRS 5503

Directeur(s) de Thèse :

M. Pierre STREHAIANO

Mme Marion ALLIET,

Rapporteurs :

M. Jean-Marie SABLAYROLLES

M. Rui CHEDAS SAMPAIO

Remerciements

La partie expérimentale de cette étude a été réalisée dans les installations de la société Proenol - Indústria Biotecnológica sous l'orientation du Professeur Pierre Strehaiano et de Madame Marion Alliet du Laboratoire de Génie Chimique de Toulouse.

J'aimerais exprimer mes sincères remerciements à Madame Maria de Fátima Teixeira et au Professeur Pierre Strehaiano pour avoir soutenu ce projet, et réuni les conditions pour que ce travail se réalise et aussi pour la confiance qu'ils m'ont témoignée pour le mener à bien.

Plus spécialement, j'aimerais remercier Madame Maria de Fátima pour l'opportunité unique qu'elle m'a offerte de réaliser cette thèse au sein de Proenol, société reconnue par sa capacité d'innovation. Je la remercie également pour sa disponibilité pour les discussions techniques/scientifiques qui ont accompagné ce projet et pour la grande chaleur humaine qu'elle a toujours su y apporter.

J'exprime aussi ma gratitude à Madame Marion Alliet et au Professeur Pierre Strehaiano, mes directeurs de thèse, pour leur aide à construire et à orienter ce projet, pour leur disponibilité particulièrement lors de mes séjours à Toulouse.

J'aimerais aussi remercier Monsieur Jean-Marie Sablayrolles, Directeur de Recherches à l'INRA et le Professeur Chedas Sampaio d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse, spécialement en acceptant d'en être les rapporteurs.

L'environnement industriel où se sont déroulées plusieurs expériences d'immobilisation a nécessité l'engagement systématique des personnels de la Production et du Laboratoire de Proenol. Je les remercie tous pour leur inestimable contribution à la réalisation de ce travail. Je remercie spécialement Pedro Soares pour son aide technique mais aussi pour la bonne humeur dont il remplit parfois notre bureau. Mes remerciements vont aussi à Ana Patricia pour sa disponibilité et son amabilité...même quand les échantillons arrivaient pendant le week-end.

Aux Professeures Ana Xavier et Inês Portugal de l'Universidade de Aveiro je veux transmettre ma reconnaissance pour leur contribution dans le développement de l'application de *Shz pombe* immobilisée.

J'exprime encore ma reconnaissance à Madame Marta Lourenço des Caves Murganheira pour son intérêt et son engagement dans les essais de cellules immobilisées conduits à l'échelle industrielle.

A Monsieur Hermínio Silva, membre fondateur de Proenol, je veux exprimer mon plus profond remerciement, en regrettant son départ précoce mais en l'assurant qu'il a bien construit les bases nécessaires pour développer un projet solide et novateur.

Enfin, je n'oublierai pas ma Famille dont l'Amour et le support toujours inconditionnels sont tellement importants pour maintenir l'équilibre dans la vie. Un mot spécial pour Ana, toujours infatigable dont la douceur et le soutien sans faille m'ont permis de terminer ce travail.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	17
PREMIERE PARTIE - PROCEDE DE PRODUCTION DE LEVURES IMMOBILISEES	19
1. BIBLIOGRAPHIE	23
1.1. Applications de cellules immobilisées en œnologie.....	23
1.2. Méthodes d'immobilisation de cellules.....	24
1.3. Restrictions pour les cellules immobilisées en œnologie	27
1.4. Immobilisation par inclusion dans des alginates.....	28
1.4.1. Chimie des alginates	28
1.4.2. Propriétés fonctionnelles des alginates.....	29
1.4.3. Diffusion moléculaire et porosité	32
1.4.4. Stabilité des gels d'alginate	32
1.4.5. Déshydratation et réhydratation de cellules immobilisées dans alginate	33
1.5. Techniques d'immobilisation par inclusion/encapsulation	34
1.6. Impact de l'immobilisation sur les cellules	36
2. MATERIELS ET METHODES	41
2.1. Matériel biologique	41
2.1.1. Conservation des souches	41
2.2. Production des levures	41
2.2.1. Equipement de production de levures.....	42
2.2.2. Formulations des milieux de culture pour la propagation des levures	44
2.2.3. Mise en œuvre des fermentations.....	46
2.2.4. Récupération et concentration de la biomasse	49
2.3. Immobilisation et séchage des levures	50
2.3.1. Équipement d'immobilisation et de séchage.....	50
2.3.2. Detail du système de pompage pneumatique pour les solutions d'alginates ...	53
2.3.3. Détail du système de gélification.....	54
2.4. Techniques analytiques	55
2.4.1. Détermination de la concentration en biomasse et de la viabilité	55
2.4.2. Détermination de la viscosité des solutions d'alginates	59
2.4.3. Dosage enzymatique du D-Glucose et du D-Fructose	60
2.4.4. Mesure de la conductivité.....	61
2.4.5. Détermination de l'activité biologique des levures	61
2.4.6. Détermination des levures de contamination	62
2.4.7. Détermination de l'activité de l'eau	63

2.4.8.	Détermination du nombre de billes par gramme	63
2.4.9.	Détermination des ions Na ⁺ et Ca ²⁺ en solution de gélification	64
2.4.10.	Observation des billes à la loupe binoculaire	64
3.	MISE AU POINT D'UN PROCEDE D'IMMOBILISATION DE LEVURES	67
3.1.	Points importants du procédé	67
3.1.1.	Matières premières	67
3.1.2.	Formation des gouttelettes	71
3.1.3.	Réaction de gélification	86
3.1.4.	Séchage	87
3.2.	Expérimentations d'immobilisation	89
3.3.	Reproductibilité du procédé d'immobilisation	93
3.4.	Conclusion	95
	DEUXIEME PARTIE - MISE EN ŒUVRE EN ŒNOLOGIE	97
4.	PRISE DE MOUSSE	101
4.1.	Bibliographie	101
4.1.1.	Généralités sur la « prise de mousse »	101
4.1.2.	Applications des levures immobilisées à la prise de mousse en bouteille	102
4.1.3.	Applications des levures immobilisées à la prise de mousse en cuve	105
4.2.	Matériel et Méthodes	107
4.2.1.	Vin de base	107
4.2.2.	Formulation des billes	108
4.2.3.	Filtration stérile du vin de base	108
4.2.4.	Mise en bouteille (tirage laboratoire)	109
4.2.5.	Mesure de la pression des vins effervescents	110
4.2.6.	Dosage enzymatique de l'acide L-malique	111
4.2.7.	Dosage enzymatique du glycérol	111
4.2.8.	Dosage de l'azote assimilable	112
4.2.9.	Détermination de l'acidité totale	112
4.2.10.	Dosage de l'anhydride sulfureux libre et total	112
4.2.11.	Dosage de l'alcool	113
4.2.12.	Dosage des polysaccharides	113
4.2.13.	Evaluation de l'hygiène des chaînes par bioluminescence	113
4.3.	Expérimentations	114
4.4.	Résultats et discussion	120
4.4.1.	Influence du vin de base sur la cinétique de fermentation	120
4.4.2.	Evolution de la viabilité	122
4.4.3.	Influence de la température	122
4.4.4.	Influence de la dose de levures immobilisées	123

4.4.5.	Influence des débits du procédé d'immobilisation.....	126
4.4.6.	Comparaison avec des levures libres	128
4.4.7.	Influence des activateurs de fermentation	139
4.4.8.	Conclusion.....	142
5.	DESACIDIFICATION BIOLOGIQUE DES MOÛTS ET DES VINS AVEC	
	SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE IMMOBILISEE	145
5.1.	Bibliographie	145
5.1.1.	L'acidité du vin.....	145
5.1.2.	Les outils pour la gestion de l'acidité du vin	146
5.1.3.	Généralités sur <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	147
5.1.4.	Aspects cinétiques et métaboliques de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	148
5.1.5.	Fermentation malo-alcoolique de moûts par <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ..	149
5.2.	Matériel et méthodes	152
5.2.1.	Moût et vin.....	152
5.2.2.	Filtration stérile du moût et vin	152
5.2.3.	Réhydratation des levures immobilisées.....	152
5.2.4.	Équipement de fermentation	152
5.2.4.1.	Fermenteur non agité.....	153
5.2.4.2.	Fermenteur de lit expansé avec recyclage total	153
5.2.4.3.	Fermenteur industriel non-agité	154
5.2.5.	Techniques analytiques.....	154
5.2.5.1.	Détermination de la densité optique	154
5.2.5.2.	Dosage d'éthanol par HPLC	154
5.3.	Expérimentations	155
5.3.1.	Fermentations dans un fermenteur non agité	155
5.3.2.	Fermentations dans un fermenteur à lit expansé.....	156
5.3.3.	Fermentations dans un fermenteur industriel non-agité en co-inoculation	156
5.4.	Résultats et discussion	157
5.4.1.	Influence de différents facteurs dans le processus de désacidification discontinue de moûts.....	157
5.4.1.1.	Concentration initiale du dioxyde de soufre (SO ₂) libre	157
5.4.1.2.	Concentration initiale en l'acide L-malique	158
5.4.1.3.	Température.....	160
5.4.2.	Énergie d'activation du processus de désacidification.....	161
5.4.3.	Désacidification d'un moût en utilisant un fermenteur discontinu, en lit expansé avec recyclage total. Étude de quelques paramètres du procédé	165
5.4.3.1.	Concentration initiale en acide malique	166
5.4.3.2.	Concentration en levure <i>Shz pombe</i> immobilisée	168
5.4.4.	Interaction entre les levures <i>Shz pombe</i> et les levures <i>S. cerevisiae</i>	169
5.4.4.1.	Essai laboratoire	170

5.4.4.2.	Essai industriel	171
5.4.5.	Désacidification de vin.....	173
5.5.	Conclusions.....	174
6.	FERMENTATION ALCOOLIQUE EN CONTINU DES MOUTS	179
6.1.	Bibliographie	179
6.1.1.	Procédés de fermentation alcoolique en continu	179
6.1.2.	La FAC pour la production des vins tranquilles	179
6.1.3.	Quelle configuration de fermenteur pour la FAC ?	181
6.1.4.	Effets de la FAC sur les levures immobilisés	182
6.1.5.	Caractéristiques chimiques des vins produits par FAC	182
6.2.	Matériel et méthodes	183
6.2.1.	Moût.....	183
6.2.2.	Filtration stérile	184
6.2.3.	Réhydratation des levures immobilisées.....	184
6.2.4.	Équipement de fermentation en continu	184
6.2.5.	Techniques analytiques.....	186
6.3.	Expérimentation	187
6.3.1.	Essai préliminaire en lit fixe.....	187
6.3.2.	Expériences à l'échelle laboratoire	187
6.3.3.	Expériences à l'échelle pilote	188
6.4.	Résultats et discussion	189
6.4.1.	Fermentation continue de moût en fermenteur à lit fixe.....	189
6.4.2.	Fermentation en continu de moût dans un fermenteur à lit fluidisé	192
6.4.2.1.	Évolution de la concentration en sucre pendant la FAC dans le fermenteur à lit fluidisé	193
6.4.2.2.	Évolution de la population de cellules libres et immobilisées pendant la fermentation en continu.....	197
6.4.2.3.	Évolution de la concentration d'alcool dans le fermenteur à lit fluidisé pendant la FAC	198
6.4.2.4.	Effet de l'oxygénation pendant FAC	200
6.4.3.	Fermentation continue de moût dans des conditions réelles de vinification avec fermenteur à lit fixe	201
6.5.	Conclusions.....	203
	CONCLUSION GENERALE	207
	NOMENCLATURE.....	212
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	215

LISTE DES FIGURES

Figure 1-1 Classement des techniques d'immobilisation cellulaire conformément à la nature des interactions entre les cellules et le matériel de support.	24
Figure 1-2 Types de blocs dans l'alginate a) blocs G, b) blocs M et c) blocs MG	29
Figure 1-3 Modèle <i>boîte d'œufs</i> pour les liaisons de cations divalents avec l'alginate a) liaisons avec du calcium b) Formation de jonctions entre des chaînes de polymère (extrait de Donati et Paoletti, 2009).	30
Figure 2-1 Schéma de propagation et de récupération des levures <i>Sacharomyces cerevisiae</i> et <i>Schizosacharomyces pombe</i>	42
Figure 2-2 Fermenteur de laboratoire New Brunswick, Volume = 10L	42
Figure 2-3 Schéma de l'unité pilote de propagation de levures	43
Figure 2-4 Ligne pilote d'immobilisation. 1 - réservoir de dissolution d'alginate; 2 - réservoir de couche interne ; 3 - réservoir de couche externe ; 4 - diffuseurs de débit ; 5 – buses bi-fluide; 6 <i>shaker</i> ; 7 - réservoir de gélification ; 8 - réservoir de préparation de la solution de chlorure de calcium ; 9 - Convoyeur ; 10 - Réservoir de lavage ; 11 - Réservoir intermédiaire pour stock des sphères humides ; 12 - Séchoir en lit fluidisé ; 13 - Échangeur de chaleur ; 14 - Filtre de particules ; 15 - Condenseur ; 16 - Ventilateur ...	50
Figure 2-5 Vue latérale a) et frontale b) de l'équipement d'immobilisation. 1 - Diffuseurs de débit; 2 - <i>shaker</i> ; 3 - support et buses bi-fluide; 4 - Tuyaux flexibles.....	51
Figure 2-6 Vue en coupe des buses bi-fluide 01 - Chambre de jonction des fluides ; 02 - Entrée couche interne ; 03 - Entrée de la couche externe.	52
Figure 2-7 Représentation schématique du système de pompage pneumatique et de contrôle de débit à partir des réservoirs de couche interne/externe. PT – transmetteur de pression ; PI - indicateur de pression ; FI - indicateur de débit.....	53
Figure 2-8 Équipement pour alimentation et contrôle du chlorure de calcium dans la ligne d'immobilisation. 1- réservoir mère ; 2- réservoir de gélification.....	54
Figure 2-9 Cellule de Neubauer (photo extraite de Lucarini et al., 2004)	56
Figure 2-10 Alignement des molécules d'alginate en solution avec l'augmentation de la vitesse de cisaillement.....	60
Figure 3-1 Viscosité de solutions d'alginate avec de différentes concentrations préparées à partir des références Alg1 et Alg2 (100rpm, système 11, T=20°C).	68
Figure 3-2 Viscosités de solutions d'alginate à 1% préparées à partir de différents lots provenant de 3 fournisseurs différents.....	69
Figure 3-3 Vue schématique du coupe d'un jet laminaire subissant une perturbation axisymétrique (Brandenberger et al., 1999).....	71
Figure 3-4 Représentation schématique d'une partie d'un jet de liquide où il est appliqué une vibration à f_{opt} que conduit à que le cylindre de longueur L, qui est équivalente à λ_{opt} , forme une goutte.	73

Figure 3-5 Formation de gouttes principales et de gouttes satellites par déstabilisation de la colonne liquide (Chuech et Yan, 2005)	74
Figure 3-6 Limites d'opération pour une buse bi-fluide (Berger, 2001).....	76
Figure 3-7 Photographies des billes produites dans l'essai G10 avec différents débits.....	78
Figure 3-8 Photographies des billes obtenues avec de différents débits à l'essai G12.....	80
Figure 3-9 Photographies des billes obtenues pendant l'essai G12 avec un débit total 9,2 kg/h et en faisant varier la relation Q_{CI}/Q_{CE} entre 0,6 et 1,5.	81
Figure 3-10 Jets de solution d'alginate à la sortie de 3 buses de 1.2 mm de diamètre, avec un débit de 9,3 kg/h heure dans chaque buse.	82
Figure 3-11 Corrélation entre le rapport du diamètre du jet à celui de la buse (d_j/d_n) et le nombre de Weber déterminé dans ce travail (—) et par Brandenberger (- - -).....	82
Figure 3-12 Valeurs de K et de n calculées pour des solutions avec différentes concentrations d'alginate (Alg 1).....	83
Figure 3-13 Fréquence optimale estimée pour la formation de billes en fonction du débit avec des buses de a) 1,0 mm et de b) de 1,2 mm en utilisant les conditions des essais G10 et G12, respectivement. Les points (▲) et (Δ) représentent la fréquence et le débit des essais G10 et G12 où la formation des billes a été respectivement bonne et mauvaise.	83
Figure 3-14 Distribution du débit par les 15 buses du diffuseur de la couche interne, pour différents débits totaux : 42,7kg/h ; 55,9 kg/h et 84,6 kg/h.	85
Figure 3-15 Distribution du débit par les 15 buses du diffuseur de la couche externe, pour différents débits totaux : 44,4kg/h ; 57,0 kg/h et 84,6 kg/h.	85
Figure 3-16 Conductivité d'une solution aqueuse de chlorure de calcium en fonction de la concentration de calcium.....	86
Figure 3-17 Évolution de la concentration des ions Na^+ et Ca^{2+} pendant le procédé d'immobilisation.	87
Figure 3-18 Courbe de séchage de deux lots de levures immobilisées	88
Figure 3-19 Évolution de la température du lit et de la température d'entrée au cours d'un séchage.....	89
Figure 3-20 Aspect des billes avant et après le séchage observées dans la loupe binoculaire.	89
Figure 3-21 Évolution de la moyenne : a) du nombre de billes/g ; b) de la humidité résiduelle ; c) des cellules viables/g et d) de la viabilité de lots produits dans les années de 2007 à 2010. La formulation utilisée a été la FES et chaque point est au minimum la moyenne de 100 lots différents.	94
Figure 4-1 Système de filtration par des cartouches. 1 - Réservoir de vin ; 2 - Pré-filtre de 0,50 μm porosité nominale ; 3 - Filtre final de 0,45 μm porosité absolue ; 4 - sortie du système de filtration directement pour la bouteille.	109
Figure 4-2 Aphromètre pour capsules.....	110
Figure 4-3 Diagramme représentatif de l'essai FB1.....	115
Figure 4-4 Diagramme représentatif de l'essai FB2.....	117

Figure 4-5 Diagramme représentatif de l'essai FB3.....	118
Figure 4-6 Diagramme représentatif de l'essai FB4.....	119
Figure 4-7 Évolution de la pression dans la bouteille au cours du temps pour les vins TN, MF et MM (Essai FB1 ; FES ; Dose = 1,2 g/bouteille ; T _{ferm} = 14°C).....	121
Figure 4-8 Evolution des sucres au cours du temps pour les vins TN, MF e MM. (Essai FB1; FES ; Dose = 1,2 g/bouteille ; T _{ferm} = 14°C).....	121
Figure 4-9 Évolution de la viabilité des levures immobilisés pendant la fermentation des vins TN, MF et MM (Essai FB1 ; FES, Dose = 1,2 g/bouteille ; T _{ferm} = 14°C).....	122
Figure 4-10 Évolution de la pression au long du temps pour fermentation dans bouteille à la température de 10°C et de 14°C. (Essai FB2, vin 991X ; FES ; dose = 1,2 g/bouteille)	123
Figure 4-11 Évolution de la pression au cours du temps pour de différentes doses d'inoculum de levure immobilisé. (Essai FB2 ; FES ; vin 991X ; dose = 1,2 ; 1,6 et 1,8 g/bouteille ; T _{ferm} = 10°C).....	124
Figure 4-12 Évolution de la pression au cours du temps pour différentes doses d'inoculum de levure immobilisé. (Essai FB2 ; vin 991X ; FE1 ; dose = 1,2 ; 1,8 et 2,4 g/bouteille ; T _{ferm} = 10°C).....	125
Figure 4-13 Évolution de la pression pour les formulations FES et FE1 à la température de a) 14°C et de b) 10°C (Essai FB2, vin 991X ; dose 1,8 g/bouteille).....	126
Figure 4-14 Évolution de la pression au cours du temps pour les formulations FES, FE1 et FE2 à la température de 10°C. (Essai FB2, vin 991X dose 1,8 g/bouteille).....	127
Figure 4-15 Évolution de la pression au cours du temps pour les vins a) TN ; b) MF ; c) MM fermentés avec des levures libres et avec des levures immobilisés. (Essai FB1 ; FES ; Dose = 1,2 g/bouteille ; T _{ferm} = 14°C).....	129
Figure 4-16 Concentrations d'éthanol, d'acide malique, d'acidité volatile et du glycérol mesurées 3 mois après le tirage pour les TN ; MF et MM de l'essai FB1 élaboré avec des levures immobilisés et libres.	131
Figure 4-17 Concentrations des polysaccharides totaux dans les vins de base MF, TN et MM, et mesurées 3 mois après la fin de la fermentation alcoolique réalisée avec des levures libres et des levures immobilisées.	132
Figure 4-18 Résultats de l'analyse sensorielle pour les vins) MF ; b) TN et c) MM de l'essai FB1 produits avec des levures immobilisés et avec des levures libres.....	133
Figure 4-19 Évolution de la pression au cours du temps pour le vin J64 fermenté avec des levures libres et avec des levures immobilisées. La fermentation s'est déroulée en cave à une température proche de 10°C. (Essai FB3 ; vin J64 ; FE2 ; Dose = 1,8g ;)	134
Figure 4-20 Évolution de la pression dans le vin 991X fermenté dans le laboratoire (Essai FB2 ; FE2 ; Dose = 1,8 g/bouteille ; T _{ferm} = 10°C) et à le vin J64 fermenté en cave (Essai FB3 ; FE2 ; Dose = 1,8 g/bouteille ; T _{ferm} = 10°C).	136
Figure 4-21 Résultats de l'analyse descriptive du vin J 64 réalisé une année et quatre mois après le tirage, Test 1 et 2 - vin fermenté avec des levures libres, Perl 1 et 2 - vin	

fermenté avec des levures immobilisés (Essai FB3, FE2 ; Dose = 1,8 g/bouteille ; T _{ferm} = 10°C)	138
Figure 4-22 Évolution de la pression au cours du temps dans les vins ES, IT et PT fermentés au laboratoire (Analyse FB4 ; FES ; Dose = 1,2 g/bouteille ; T _{ferm} = 14°C). Traité - Vin avec addition d'activateur de fermentation ; Non Traité - Vin sans addition d'activateur de fermentation	140
Figure 4-23 Évolution de la pression au cours du temps dans les vins ES, IT et PT fermentés au laboratoire a) Traité - Vin avec addition d'activateur de fermentation b) Non Traité - Vin sans addition d'activateur de fermentation (Analyse FB4 ; FES ; Dose = 1,2 g/bouteille ; T _{ferm} = 14°C).....	141
Figure 5-1 Réactions biochimiques de la décomposition fermentaire de l'acide malique par la levure <i>Shz pombe</i>	147
Figure 5-2 Fermenteurs de lit expansé avec recyclage total a) photographie b) représentation schématique. 1 - réservoir de moût V = 5 L ; 2 - pompe de recirculation ; 3 - prise de échantillons ; 4 - flacon pour dégagement du CO ₂ ; 5 - fermenteur (h = 200 mm ; □ = 36 mm) ; 6 - filtre de air (0,2 □m).....	153
Figure 5-3 Application industriel de la levure <i>Shz pombe</i> immobilisée. A - sacs de polyéthylène perméables ; B - fil pour supporter le sac ; C - levures immobilisées dans le moût, D - lest pour tenir le sac immergé ; E – Solution de réhydratation.	154
Figure 5-4 Profils de concentration de l'acide malique au cours du processus de désacidification de moût avec différentes concentrations initiales de SO ₂ libre (T _{ferm} = 15°C ; dose = 1 g/L)	157
Figure 5-5 Profils de concentration de l'acide malique pendant le processus de désacidification d'un moût avec différentes concentrations initiales d'acide malique (T _{ferm} = 15°C ; dose = 1 g/L).	159
Figure 5-6 Évolution de la vitesse initiale de consommation d'acide malique en fonction de sa concentration initiale dans le moût.	159
Figure 5-7 Profils de concentration de l'acide malique pendant le processus de désacidification d'un moût avec <i>Shz pombe</i> immobilisée à différentes températures ([ac. malique] initial = 5 g/L ; dose = 1 g/L)	160
Figure 5-8 Profils de concentration de l'acide malique pendant le processus de désacidification d'un moût avec <i>Shz pombe</i> libre à différentes températures ([ac. malique] initial = 5 g/L ; Population initiale = 1.10 ⁶ cell/mL)	160
Figure 5-9 Représentations graphiques de ln k versus 1/T pour trois situations distinctes: I - limitations diffusionnelles externes, II - zone intermédiaire, III - cinétique réactionnel	164
Figure 5-10 Représentations graphiques de ln k contre 1/T pour les essais à de différentes températures réalisées avec les levures immobilisés	165
Figure 5-11 Profils de concentration a) de l'acide malique et b) du sucre mesurés à l'entrée et à la sortie du fermenteur en lit expansé pendant la désacidification d'un moût avec des	

concentrations initiales de 2 et 5 g/L d'acide malique (T _{ferm} = 15°C, dose = 1g/L, débit recyclage = 100 mL/mn).....	166
Figure 5-12 Comparaisons de profils de consommation d'acide malique dans le fermenteur en lit expansé et dans le fermenteur non agité (T _{ferm} = 15°C, dose = 1g/L, débit de recyclage = 100 mL/mn).....	167
Figure 5-13 Profils de concentration en acide malique pendant la désacidification d'un moût dans un fermenteur de lit expansé avec recyclage total et avec différentes concentrations de <i>Shz pombe</i> immobilisée (T _{ferm} = 15°C, débit de recyclage = 100 mL/mn)	168
Figure 5-14 Influence de la concentration de <i>Shz pombe</i> immobilisée sur la vitesse initiale de consommation d'acide malique dans un fermenteur de lit expansé avec recyclage total (T _{ferm} = 15°C, débit de recyclage = 100 mL/mn).....	168
Figure 5-15 Influence de la concentration en <i>Shz pombe</i> immobilisée sur la vitesse spécifique de consommation de l'acide malique dans un fermenteur en lit expansé avec recyclage total (T _{ferm} = 15°C, débit de recyclage = 100 mL/mn)	169
Figure 5-16 Influence de l'inoculation de <i>S. cerevisiae</i> sur la FMA réalisée avec <i>Shz pombe</i> immobilisée, dans un fermenteur en lit expansé avec recyclage total. (T _{ferm} = 15°C, dose <i>Shz pombe</i> = 1g/L, dose <i>S. cerevisiae</i> (LSA) = 25 g/hL, débit de recyclage = 100mL/mn)	170
Figure 5-17 Évolution de la consommation d'acide malique par <i>Shz pombe</i> immobilisée pendant la FMA dans un fermenteur en lit expansé avec et sans réalisation simultanée de la FA (T _{ferm} = 15°C, dose <i>Shz pombe</i> = 1 g/L, débit de recyclage = 100 mL/mn).....	171
Figure 5-18 Essais de vinification industrielle de moût Alvarinho avec inoculation mixte par <i>Shz pombe</i> immobilisée et <i>S. cerevisiae</i> , à la dose de 200 g/hL et de 25 g/hL, respectivement. a) 1 ^{ère} application b) réutilisation.....	172
Figure 5-19 Évolution de la concentration en acide malique pendant la désacidification d'un vin avec <i>Shz pombe</i> immobilisée (T _{ferm} = 15°C, dose = 1 g/L)	173
Figure 6-1 Fermenteur à lit fluidisé continu a) photographie, b) représentation schématique. 1 - réservoir de moût ; 2 - pompe d'alimentation ; 3 - clapet anti-retour ; 4 – pompe de recyclage ; 5 - fermenteur, 6 - réservoir de vin ; 7 - sonde de température, 8 - grilles de rétention des billes.	185
Figure 6-2 Fermenteur pilote en acier inox de volume V = 160 L a) dessin technique b) photographie	186
Figure 6-3 Concentrations maximales et minimales des sucres en fonction du débit d'alimentation pour un vin élaboré dans un fermenteur continu à lit fixe.	189
Figure 6-4 Évolutions de la densité optique (DO) pendant la fermentation de moût en continu dans un fermenteur à lit fixe.	190
Figure 6-5 Photographies de 3 billes du fermenteur à lit fixe : A) Bille au début de la fermentation, B) bille prise sur le dessus du fermenteur après 22 jours de fermentation, C) bille prise dans le bas du fermenteur après 22 jours de fermentation.	191

Figure 6-6 Photographies du fermenteur à lit fixe avec plus de la moitié de la colonne remplie avec du CO ₂ .	192
Figure 6-7 Évolution de la concentration en sucre, du débit d'alimentation et de la température au cours de la phase batch (I) et de la phase continue (II).	193
Figure 6-8 Évolution de la concentration en sucre pendant la FAC dans un fermenteur à lit fluidisé, pour différentes concentrations de billes ($D \approx 0,088 \text{ h}^{-1}$; $T \approx 23^{\circ}\text{C}$; $C_{\text{sucre}}^{\text{entrée}} \approx 205 \text{ g/L}$).	194
Figure 6-9 Vitesses de consommation des sucres en fonction de la concentration en billes dans un fermenteur continu en lit fluidisé ($D \approx 0,088 \text{ h}^{-1}$; $T \approx 23^{\circ}\text{C}$; $C_{\text{sucre}}^{\text{entrée}} \approx 205 \text{ g/L}$).	195
Figure 6-10 Vitesses spécifiques de consommation de sucre en fonction de la concentration de billes dans un fermenteur continu à lit fluidisé ($D \approx 0,088 \text{ h}^{-1}$; $T \approx 23^{\circ}\text{C}$; $C_{\text{sucre}}^{\text{entrée}} \approx 205 \text{ g/L}$).	196
Figure 6-11 Concentrations de cellules viables immobilisées et libres (exprimé par volume de fermenteur) obtenues à la fin des essais de fermentation en continu pour les différentes concentrations de billes dans le fermenteur à lit fluidisé ($D \approx 0,088 \text{ h}^{-1}$; $T \approx 23^{\circ}\text{C}$; $C_{\text{sucre}}^{\text{entrée}} \approx 205 \text{ g/L}$).	196
Figure 6-12 Évolution au cours du temps des cellules libres viables pendant la fermentation en continu d'un moût dans le fermenteur à lit fluidisé ($D \approx 0,088 \text{ h}^{-1}$; $T \approx 23^{\circ}\text{C}$; $C_{\text{sucre}}^{\text{entrée}} \approx 205 \text{ g/L}$).	197
Figure 6-13 Concentrations de cellules par bille au début et à la fin des essais de fermentation, en fonction de la concentration de billes dans le fermenteur à lit fluidisé.	198
Figure 6-14 Évolution de la concentration d'alcool pendant FAC dans un fermenteur à lit fluidisé, avec de différentes concentrations de levure immobilisé ($D \approx 0,088 \text{ h}^{-1}$; $T \approx 23^{\circ}\text{C}$; $C_{\text{sucre}}^{\text{entrée}} \approx 205 \text{ g/L}$).	199
Figure 6-15 Évolution de la concentration de sucre pendant la FAC pour une concentration de 50 g/L de billes, avec et sans oxygénation du fermenteur. Ox10x/jour : oxygénation 10x par jour pendant 2 min ; Ox continu : oxygénation continue pendant le jour. ($D \approx 0,088 \text{ h}^{-1}$; $T \approx 23^{\circ}\text{C}$; $C_{\text{sucre}}^{\text{entrée}} \approx 205 \text{ g/L}$).	200
Figure 6-16 Évolutions de la concentration de cellules libres pendant la FAC pour une concentration de 50 g/L de billes, avec oxygénation du fermenteur. Ox10x/jour : oxygénation 10x par jour pendant 2 min ; Ox continu : oxygénation continue pendant le jour ($D \approx 0,088 \text{ h}^{-1}$; $T \approx 23^{\circ}\text{C}$; $C_{\text{sucre}}^{\text{entrée}} \approx 205 \text{ g/L}$).	201
Figure 6-17 Evolution du débit et de la concentration des sucres dans le vin pendant la FAC dans des conditions réelles de vinification.	202
Figure 6-18 Évolution de l'alcool et du pH du vin pendant la FAC dans des conditions réelles de vinification.	202

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1-1 – Caractéristiques de techniques d'inclusion/encapsulation par gélification ionotrope (Serp, 2000).....	35
Tableau 2-1 – Composition du milieu de culture pour l'étape 1 pour les deux souches de levures utilisées.....	45
Tableau 2-2 – Composition du milieu de l'étape 2 pour les deux souches de levures utilisées. 46	
Tableau 2-3 – Caractéristiques de la pré-culture pour les 2 souches étudiées.....	47
Tableau 2-4 – Caractéristiques de la population obtenue dans les fermenteurs de 10L.....	48
Tableau 2-5 – Conditions opératoires de la centrifugeuse pour les 2 souches de l'étude.	49
Tableau 2-6 – Caractéristiques du procédé de centrifugation	50
Tableau 2-7 – Tableau de collecte d'échantillons pour évaluation de l'activité biologique des levures sèches immobilisées.....	62
Tableau 2-8 – Valeurs minimales de a_w reportés pour la croissance de plusieurs micro-organismes (Jay et al., 2005).....	63
Tableau 2-9 – Comptages (et erreur associée) du nombre de billes par gramme fait par 4 opérateurs	64
Tableau 3-1 – Caractéristiques des alginates utilisés dans le travail, d'après information du fabricant.....	68
Tableau 3-2 – Débit massique total et vitesses utilisés dans l'essai G10, évaluation de la qualité des billes formées.	77
Tableau 3-3 – Débits, vitesses et relation de débits employés à l'essai G12, évaluation de la qualité des billes.	79
Tableau 3-4 – Conditions opératoires des plusieurs essais d'immobilisation réalisés	90
Tableau 3-5 – Caractéristiques analytiques des levures immobilisées produites avec les différentes formulations (* AB - Activité biologique).....	92
Tableau 4-1 – Caractéristiques physico-chimiques des différents vins de base utilisés pour la prise de mousse.	107
Tableau 4-2 – Sucres mesurés à la fin de l'essai FE1 ; vin 991X.....	125
Tableau 4-3 – Sucres résiduels dans les vins TN, MF et MM fermentés avec levures libres et levures immobilisées (mesures réalisées 3 mois après le tirage).....	130
Tableau 5-1 – Valeurs de la vitesse initiale de consommation d'acide malique, coefficient de corrélation pour les essais avec différentes concentrations d'anhydride sulfureux libre initial dans le moût.....	158
Tableau 5-2 – Valeurs de vitesse initiale de consommation de l'acide malique dans un moût avec des levures immobilisées et libres à différentes températures ([ac. malique] initial = 5 g/L ; dose = 1 g/L).	161

Tableau 5-3 – Valeurs des constantes de réaction et respectifs coefficients de corrélation calculés à partir de l'essai de désacidification de moût avec <i>Shz pombe</i> immobilisé et libre à différentes températures.	163
Tableau 5-4 – Valeurs de l'énergie d'activation pour les cellules de <i>Shz pombe</i> immobilisées et libres	163
Tableau 5-5 – Valeurs de vitesse initiale de consommation de l'acide malique dans un fermenteur en lit expansé et dans un fermenteur non agité pendant la désacidification de moût avec des concentrations initiales de 2 et 5 g/L d'acide malique (T _{ferm} = 15°C, dose = 1g/L, volume recyclage = 100 mL/mn)	167
Tableau 5-6 – Valeurs de vitesse initiale de consommation de l'acide malique dans un vin et dans un moût avec <i>Shz pombe</i> immobilisée (T _{ferm} = 15°C, dose = 1 g/L)	173
Tableau 6-1 – Résumés des caractéristiques de quelques procédés de laboratoire et conditions utilisées pour la production de vins tranquilles en faisant appel à la FAC avec des cellules immobilisées.....	180
Tableau 6-2 – Caractéristiques du moût utilisé dans chaque essai à l'échelle laboratoire	183
Tableau 6-3 – Conditions opératoires de l'essai préliminaire en fermenteur à lit fixe	187
Tableau 6-4 – Conditions opératoires des essais réalisés dans le fermenteur à lit fluidisé avec des concentrations en billes entre 10 et 150 g/L.....	188
Tableau 6-5 – Fermentation continue d'un moût en fermenteur à lit fixe : concentrations en sucres (Glucose et Sucrose : G + F) en sortie	189
Tableau 6-6 – Concentration de sucre en haut et au centre du fermenteur à lit fixe pendant l'essai préliminaire	191
Tableau 6-7 – Durée de la fermentation <i>batch</i> pour les concentrations de billes utilisées.....	193
Tableau 6-8 – Rendement en alcool pour les essais de FAC avec différentes concentrations de billes, dans le fermenteur à lit fluidisé.	199

INTRODUCTION GENERALE

Introduction Générale

L'étude et le développement des procédés de fabrication de levures immobilisées en vue de la réalisation de fermentations de vins a débuté au milieu des années 80. Malgré les bénéfices potentiels que cette technologie pouvait apporter pour le secteur œnologique, peu de procédés d'immobilisation ont réussi à dépasser l'échelle laboratoire ou pilote et ceux qui sont arrivés à l'échelle industrielle n'ont pas eu le succès désiré pour des questions d'ordre technique ou économique.

Pendant les années 90, le Laboratoire de Génie Chimique de Toulouse et la société Proenol ont développé, à l'échelle laboratoire d'abord, pilote ensuite, un procédé d'immobilisation de levures dans l'alginate. Le produit, en formulation humide, était destiné en premier lieu à la seconde fermentation en bouteille de vins effervescents, et dans un deuxième temps, au traitement des arrêts de fermentation. Un inconvénient majeur était la faible durée de vie du produit, à cause de sa forte teneur en eau. Par la suite, le procédé a été industrialisé et une étape de déshydratation des levures immobilisées a été introduite, rendant possible des temps de stockage longs. Malgré l'évolution rapide du procédé certains aspects nécessitaient une connaissance plus approfondie dans le but de l'optimiser.

En faisant appel à la technologie d'immobilisation mise en œuvre, différentes formulations de levures immobilisées ont été développées par Proenol en vue des applications suivantes :

- la fermentation de vins effervescents
- la reprise des fermentations stoppées
- la désacidification biologique de moûts en faisant appel à la levure *Schizosaccharomyces pombe*

L'objectif de ce travail est la formalisation du savoir faire de Proenol et des études réalisées au sein de cette société pour le développement du procédés d'immobilisation de levures et pour les utilisations de ces dernières. Ainsi le premier objectif de ce travail concerne la mise au point du procédé industriel en insistant sur les aspects les plus sensibles, et qui comme tels ont exigé des études complémentaires. Le deuxième objectif de ce travail vise à caractériser du point de vue cinétique et lorsque possible sensoriel, les fermentations avec les levures immobilisées pour la production de vins effervescents et pour la désacidification biologique de moûts. Le troisième et dernier objectif de ce travail consiste à évaluer l'utilisation de levures immobilisées pour la réalisation de la fermentation alcoolique en continu de moût. Pour cela on a fait appel à des fermenteurs continus à lit fixe et à lit fluidisé.

Le travail développé comprend deux parties distinctes :

- **la première partie** concerne le procédé de production de levures immobilisées. On présente, dans un premier chapitre, une synthèse bibliographique sur les différentes techniques d'immobilisation en identifiant pour chacune les avantages et les désavantages. On justifie

pourquoi l'immobilisation en alginate de calcium en utilisant la technique des buses vibrantes (*vibrating nozzle*) est la méthode de prédilection, non seulement pour le secteur de l'œnologie, mais aussi pour d'autres domaines du secteur alimentaire. Il est aussi mis en évidence l'importance des propriétés physico-chimiques des alginates dans la performance des levures immobilisées.

Dans un deuxième chapitre, on décrit les matériels et les méthodes utilisés au cours des expériences du chapitre 3. Un éclairage particulier est porté sur la ligne d'immobilisation qui a été intégralement développée par l'équipe technique de Proenol.

Pour conclure la première partie, le chapitre 3 présente les résultats de la mise au point du procédé industriel d'immobilisation de levures, en insistant sur les points sensibles que sont le choix de l'alginate, la formation des gouttelettes, leur gélification en billes et le séchage de ces dernières en vue de produire des billes les mieux adaptées aux différentes applications

- **la seconde partie** est divisée en 3 chapitres qui évaluent la performance des cellules immobilisées, produites conformément à la procédure décrite en première partie, sur différentes applications œnologiques : la prise de mousse, la désacidification biologique de moûts et la fermentation alcoolique en continu.

Pour chacun de ces trois chapitres, on a réalisé une courte synthèse bibliographique (afin d'encadrer les avantages des levures immobilisées dans le procédé œnologique concerné), les matériels et les méthodes utilisés ainsi que les résultats et discussion associés.

Les conclusions et les perspectives générales sont présentées à la fin du manuscrit.

PREMIERE PARTIE

PROCEDE DE PRODUCTION DE LEVURES IMMOBILISEES

BIBLIOGRAPHIE

1. Bibliographie

1.1. Applications de cellules immobilisées en œnologie

Le développement des techniques de fabrication de microorganismes immobilisés en vue de la production de boissons fermentées a été l'objet d'intérêt depuis la décennie 1960 (Martynenko et Gracheva, 2003). Pendant les années 80 et le début des années 90 plusieurs groupes de recherche ont expérimenté différents supports et différents protocoles pour l'immobilisation de cellules d'intérêt œnologique. Cet intérêt vient du fait que les cellules immobilisées ont plusieurs applications potentielles en œnologie (Cachon et Divies, 2001) et qui vont de la fermentation alcoolique de moûts en discontinu (Bardi et al., 1994) ou en continu (Sipsas et al., 2009), en passant par la réalisation de la fermentation malo-lactique (Guzzon et al., 2009 ; Kosseva et Kennedy, 2004), de la fermentation malo-alcoolique (Taillandier, 1990 ; Silva et al., 2003) et de la seconde fermentation pour production de vins effervescentes (Yokotsuka et al., 1997, Martynenko et Gracheva, 2003).

Selon Cachon et Divies (2001) l'utilisation de cellules immobilisées présente plusieurs avantages :

- Amélioration de la productivité des fermentations
- Meilleur contrôle et optimisation des procédés continus
- Facilité d'enlèvement des cellules des procédés discontinus
- Plus grande tolérance à certaines substances inhibitrices
- Installations de moindre dimension et en conséquence des coûts d'investissement et opérationnels moindres.

et aussi quelques désavantages potentiels associés à :

- Croissance excessive de cellules pouvant causer de la turbidité dans les vins
- Perte d'activité des levures lors de fonctionnements prolongés

Le dépôt de plusieurs brevets relatifs à l'utilisation de microorganismes immobilisés pour la production de boissons fermentées prouve bien l'intérêt industriel potentiel de cette technologie. Bien que la littérature reporte beaucoup de cas d'application en laboratoire réussis, peu de procédés industriels font appel à la technologie de cellules immobilisées. Pour que les systèmes de cellules immobilisées soient attrayants pour le secteur de l'œnologie, ils doivent être économiquement viables, suffisamment robustes pour être intégrés dans des procédés industriels, présenter de faibles risques de contamination et aussi apporter des arômes corrects au vin (Divies et Cachon, 2005 ; Kourkoutas et al., 2010). Selon Serp (2002) un facteur limitant pour le passage à l'échelle industrielle est le manque de robustesse des procédés développés en laboratoire. En outre et selon le même auteur aucune technique ne garantit un bon niveau de viabilité avec simultanément une rétention appropriée des cellules. De plus, l'utilisation de cellules comme biocatalyseurs exige une connaissance profonde des caractéristiques

physiologiques des cellules, qui peuvent être modifiées pendant le procédé d'immobilisation ou encore durant l'application. Un autre point qui aussi a rendu difficile le développement des procédés d'immobilisation des cellules est lié à la difficulté de caractérisation des cellules immobilisées en conditions industrielles dûe au manque d'outils adaptés (Serp, 2002 ; Diviès et Cachon, 2005).

Plusieurs sociétés (Diviès et Deschamps, 1986 ; Diviès et al., 1988 ; Lemonnier, 1992 ; Da Silva et al., 2007) ont breveté des procédés d'immobilisation de levures pour la réalisation de la seconde fermentation en bouteille de vin effervescent. Elles sont mêmes arrivées à la phase de commercialisation du produit. Actuellement seul Proenol maintient la commercialisation des levures immobilisées, les autres sociétés ayant suspendu la vente principalement à cause de difficultés techniques au niveau de la mise en oeuvre.

1.2. Méthodes d'immobilisation de cellules

L'immobilisation cellulaire peut être définie comme la restriction physique de cellules intactes à une certaine région de l'espace, en préservant leurs activités catalytiques (Karel et al., 1985). L'immobilisation de cellules peut être réalisée à travers des méthodes distinctes qui diffèrent les unes des autres selon le type d'interaction des cellules avec la matrice, entre elles ou avec le matériel de support. En première approche, l'immobilisation peut être classée en deux catégories suivant l'interaction des cellules avec le support d'immobilisation (Serp, 2000) - voir figure 1-1.

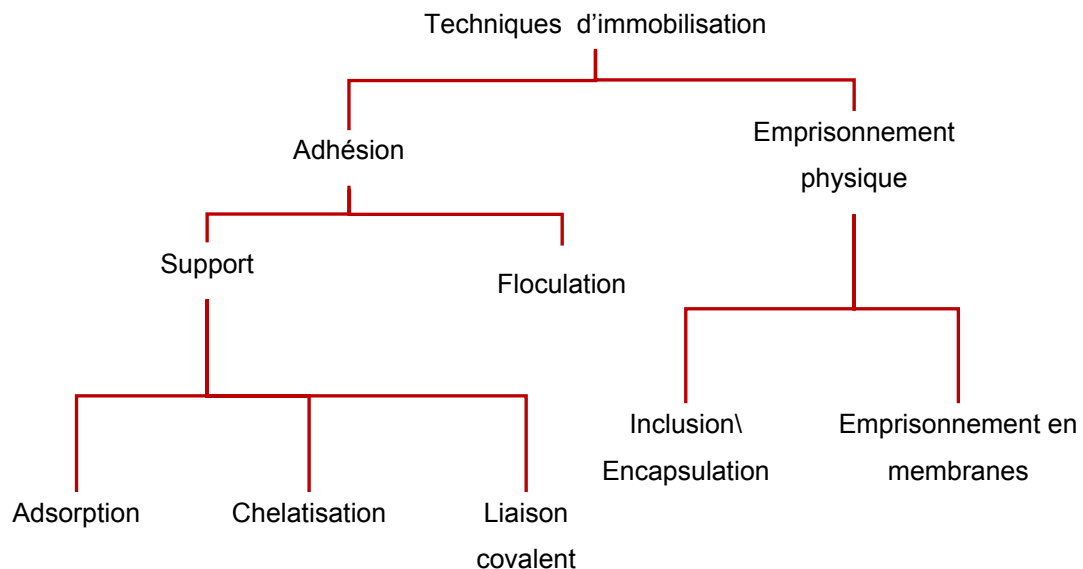


Figure 1-1 Classement des techniques d'immobilisation cellulaire conformément à la nature des interactions entre les cellules et le matériel de support.

Quand il existe une interaction celle-ci peut être entre les cellules et le support d'immobilisation (adhésion), ou entre les cellules elles-mêmes (floculation). L'interaction des cellules avec le support peut être par adsorption, par liaisons électrostatiques ou par liaisons covalentes. Dans ces techniques, il n'existe pas de barrière entre les cellules et le milieu où elles se trouvent, ce qui rend donc possible leur détachement du support et leur migration vers le milieu jusqu'à atteindre un équilibre entre les cellules immobilisées et les cellules libres (Kourkoutas et al., 2004). Ainsi ces techniques ne peuvent pas être utilisées quand on veut un milieu exempt de cellules à la fin de l'application.

Quand il n'y a pas interaction entre les cellules et le support, l'immobilisation est faite par rétention physique dans une membrane ou par emprisonnement dans une matrice tridimensionnelle.

Adsorption

L'immobilisation par adsorption se produit grâce à des interactions de type ionique ou des forces d'attraction faibles (type van der Waals ou liaison hydrogène) entre le support et la paroi des cellules (Serp, 2000). Bien que l'immobilisation par adsorption soit une méthode douce et qui préserve la viabilité cellulaire, elle a le désavantage d'être facilement réversible quand il y a des changements de température, de pH ou de force ionique. Ces changements provoquent la désorption du support.

Les supports utilisés sont variés et ils peuvent être d'origine inorganique ou organique. Comme supports inorganiques on peut citer le kissiris (minéral poreux d'origine volcanique) qui a été utilisé par Kana et al (1989) et par Bakoyianis et al (1992) pour la production de vins et l'alumine gamma qui aussi a été utilisée comme support d'immobilisation pour la production de vin (Kana et al, 1989 ; Loukatos, 2000). Pour des questions de sécurité alimentaire, ces matériaux sont considérés impropres pour cette utilisation dans la fabrication de vin (Kourkoutas et al, 2010). Parmi les supports organiques de la littérature, on trouve des morceaux de fruit comme la poire et la pomme que ce soit pour la réalisation de fermentations discontinues ou continues de vins (Kourkoutaset al., 2005). On trouve aussi de la cellulose délignifiée (Bardi et Koutinas, 1994) et des granules de gluten (Bardi et al, 1996).

Liaisons covalentes

Dans ce cas, l'immobilisation se réalise aussi sur la surface d'un support, néanmoins le mécanisme impliqué dans cette méthode est basé sur la formation de liaisons covalentes entre un support inorganique activé et les cellules, en présence d'un agent liant. Cette technique est préférentiellement utilisée pour l'immobilisation d'enzymes vu que les réactifs utilisés et les conditions de réaction peuvent affecter négativement respectivement la viabilité et l'activité cellulaire (Serp, 2000)

Liaisons électrostatiques

Les cellules se lient à des oxydes métalliques à travers des liaisons électrostatiques. Cette méthode se base sur les propriétés chélatantes de métaux de transition, particulièrement le titane (IV) et le zirconium (V) dont les oxydes ont une basse toxicité (Kennedy et Cabral, 1990).

Floculation

L'immobilisation par interaction des parois cellulaires sans support physique est appelée floculation. Cette technique est dépendante de la capacité des cellules à former spontanément des agrégats et implique l'établissement de liaisons ioniques entre les parois des cellules grâce à des protéines nommées floculines, protéines qui en présence de calcium se lient sélectivement à des résidus de mannose des cellules adjacentes (Verstrepen et al., 2006) Dans des situations où les cellules n'ont pas tendance à s'agglomérer naturellement, la floculation peut être promue par l'addition d'agents floculants, qui ont souvent l'inconvénient d'être toxiques pour les cellules. (Kourkoutas et al., 2004). L'immobilisation par floculation a aussi l'inconvénient d'être un processus réversible et qui est affecté par beaucoup de facteurs dont le pH, l'agitation, la présence de sucres, la présence de calcium et d'oxygène dissous. L'utilisation de levures *S. cerevisiae* avec des propriétés floculantes est connue pour la production de bière (Jin et Speers, 1998) et pour la fermentation de vins (Azeredo et al., 1997).

Emprisonnement dans des membranes

Les cellules sont retenues dans un espace limité par une membrane semi perméable qui permet le passage des substrats et des métabolites.

Ce type d'immobilisation est approprié quand on vise un produit exempt de cellules. Cette technologie peut présenter des problèmes qui sont la limitation du transfert de masse et le colmatage de la membrane dû à la croissance cellulaire excessive. (Lebeau et al., 1998, Kourkoutas et al., 2004). Bien que la technique soit attrayante en termes de productivité, la relation coût/bénéfice pour des produits de basse valeur ajoutée comme le vin et la bière est défavorable car ces membranes sont encore très coûteuses (Verbelen et al., 2006)

Des exemples d'application de cette technique sont les bioréacteurs à membrane pour la vinification et les cartouches pour la seconde fermentation de vins effervescents « Millispark » (Lemonnier, 1992).

Inclusion/Encapsulation

Dans l'immobilisation par inclusion/encapsulation, on forme une matrice tridimensionnelle qui emprisonne les cellules au sein de la structure formée. La matrice tridimensionnelle peut être constituée par des polymères naturels ou synthétiques.

La formation de la matrice autour des cellules peut être réalisée par plusieurs méthodes selon la nature du polymère utilisé pour former la matrice. Plusieurs méthodes de fabrication, ainsi que les polymères pouvant être utilisés sont listés ci-après (Serp, 2000) :

- Gélification ionotrope (alginate, chitosane, carragénates, pectates, carboxyméthylcellulose)
- Gélification thermique (agar, agarose, carragénates, collagène, gélatine)
- Précipitation (cellulose, cellulose triacétate)
- Polymérisation avec des agents liants (poliacrilamide, polyméthacrylate)
- Polycondensation (polyuréthane, résines époxy)
- Photo-polymérisation (résines photo-sensibles)
- Gélification par congélation (alcool polyvinyle PVA)

Le choix du polymère doit prendre en compte des aspects techniques et des aspects légaux du secteur où les cellules immobilisées vont être utilisées. Dans le domaine de l'œnologie, on est immédiatement restreint à quelques polymères et en conséquence seulement deux méthodes restent disponibles: gélification ionotrope et gélification thermique.

La gélification ionotrope est basée sur la propriété de quelques polysaccharides à former des hydrogels en présence d'ions divalents. La gélification ionotrope est un processus réversible (Serp, 2000) qui forme des gels thermo stables (Onsøien, 1997). Cette propriété est un avantage par rapport aux gels obtenus par gélification thermique, car ils peuvent être soumis à des températures plus élevées sans démantèlement de la matrice. Parmi les polymères possibles pour l'immobilisation de cellules vivantes par gélification ionotrope l'alginate est sans aucun doute le plus populaire de tous (Kourkoutas et al., 2004).

Dans l'inclusion de cellules dans des matrices polymériques, les cellules qui se trouvent à la surface extérieure d'une bille peuvent se multiplier dans le milieu, générant ainsi un système avec des cellules immobilisées et des cellules libres (Kourkoutas, 2004). Pour certaines applications, comme par exemple la seconde fermentation en bouteille de vins effervescents, ce phénomène est inacceptable. Pour éviter ce problème, des techniques plus complexes d'encapsulation ont été développées. Avec ces techniques, on produit des billes constituées d'un noyau de polymère et de cellules, recouvert par une couche extérieure seulement de polymère. La couche extérieure n'est rien d'autre qu'une capsule qui empêche la propagation des cellules vers le milieu (Da Silva et al., 2007 ; Strehano et al, 2006 ; Silva et al., 2003 ; Silva et al, 2002).

1.3. Restrictions pour les cellules immobilisées en œnologie

Malgré l'existence de plusieurs méthodes d'immobilisation visant une application œnologique, très peu d'entre elles sont passées de l'échelle laboratoire à l'échelle du procédé industriel. Idéalement, pour que cette transition soit réussie, les critères suivants doivent être respectés:

- Conservation de la viabilité et de l'activité cellulaire
- Rétention des cellules dans la matrice d'immobilisation
- Bonne stabilité mécanique et chimique de la matrice

- Stabilité microbiologique correcte (temps de vie)
- Réduction au minimum des limitations au transfert massique
- Respect des conditions légales du secteur
- Facilité d'utilisation et coûts non supérieurs (ou faiblement) au processus traditionnels

Des restrictions supplémentaires peuvent exister en fonction de la spécificité de l'application. Les cellules immobilisées doivent avoir une activité cellulaire qui garantisse une rapide consommation des substrats (sucre, acide malique,...) quand elles sont placées dans le milieu fermentaire. Néanmoins avant l'application, elles doivent être dans un état d'inactivité qui garantisse la conservation à moyen terme. Ceci est possible seulement si les cellules immobilisées sont séchées de telle façon qu'une fois réhydratées elles récupèrent leur activité originelle. D'autre part la matrice d'immobilisation doit résister aux différents composés chimiques existant naturellement dans le vin et présenter une résistance mécanique aux conditions de transport et d'immobilisation. Enfin, c'est aussi important d'avoir à l'esprit que la facilité d'utilisation et les prix compétitifs sont aussi déterminants pour motiver les producteurs de vin à faire appel à cette technologie.

Une méthode qui satisfait ces conditions est l'immobilisation par inclusion/encapsulation dans une matrice d'alginate. Cette méthodologie a été testée dans plusieurs études relevant du secteur des boissons fermentées (Da Silva et al., 2007 ; Ramon Portugal et al., 2000 ; Gódia et al., 1991 ; Yokotsuka et al., 1997, Fumi et al, 1988).

1.4. Immobilisation par inclusion dans des alginates

L'alginate est un polymère naturel autorisé dans l'industrie alimentaire qui est utilisé comme épaississant, stabilisant et aussi pour la formation de films pour protection de divers aliments (Onsøien, 1997). De par la facilité de manipulation, par les conditions douces d'immobilisation qu'il offre aux cellules et aussi par le fait d'être un produit d'origine naturelle, l'alginate de calcium est un matériel de prédilection pour l'immobilisation de cellules (Cellesi et al., 2004). Comme l'alginate est la matière première principale pour l'immobilisation de cellules par la méthode d'inclusion, la connaissance de ses propriétés est fondamentale pour assurer une bonne performance du produit final.

1.4.1. Chimie des alginates

L'alginate est un extrait d'algues marines marron (*Laminaria Hyperborea*, *Laminaria digitata*, *Macrocysts pyrifera*,...) et c'est le polysaccharide le plus abondant, pouvant représenter environ 40% du poids sec des algues (Thu et al., 1996).

Du point de vue moléculaire l'alginate est un polymère non ramifié constitué par 2 monomères : l'acide β - D-mannuronique (M) et l'acide α -L-gulonique (G) dont les proportions et les dispositions séquentielles sont variables et dépendent de l'espèce d'algue et du tissu dont

l'alginate est extrait (Thu et al., 1996). Le long de la chaîne, les monomères sont disposés en blocs avec des régions homopolymériques de M et de G, espacées avec des régions de structure alternée de MG (blocs MG) - figure 1-2.

Les alginates n'ont pas une unité répétitive régulière ; leur composition et la structure des blocs varient selon le type d'alginate. Par exemple, les alginates préparés à partir de la tige de l'espèce *Plaquarait hyperborea* contiennent normalement plus d'acide guluronique.

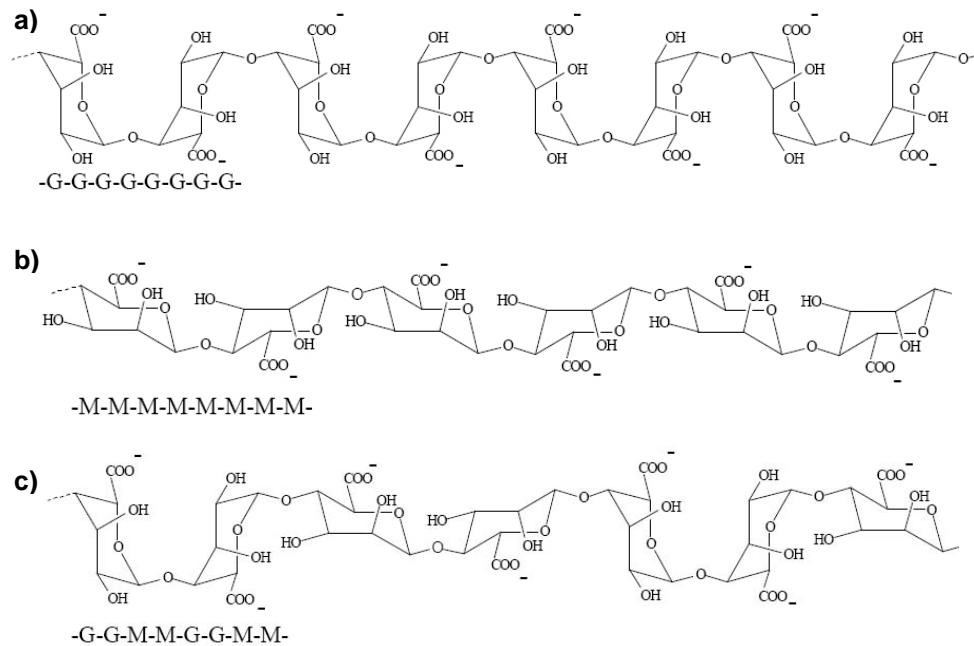


Figure 1-2 Types de blocs dans l'alginate a) blocs G, b) blocs M et c) blocs MG

Les alginates sont des sels d'acide alginique qui est un produit intermédiaire dans la production des alginates et qui possède une stabilité limitée. Afin de stabiliser l'acide alginique et de le rendre soluble dans l'eau, il est transformé en alginate commercial à travers l'incorporation de plusieurs sels tels que Na_2CO_3 , K_2CO_3 , NH_4HCO_3 , MgCO_3 et CaCO_3 .

1.4.2. Propriétés fonctionnelles des alginates

L'intérêt de connaître la structure séquentielle des alginates vient de la forte corrélation entre la structure et les propriétés fonctionnelles.

La viscosité d'une solution d'alginate est fortement dépendante de la longueur moyenne des chaînes polymériques (ce que équivaut à dire que c'est dépendant du poids moléculaire - PM) et des conditions utilisées (température, solvant). L'augmentation du PM augmente la viscosité de la solution d'alginate (Donati et Paoletti, 2009, Onsøien, 1997). Pour l'immobilisation de cellules ce paramètre doit être pris en compte car l'utilisation d'alginates de haut PM donne des solutions très visqueuses, de manipulation difficile et qui peuvent conduire à des pertes de viabilité dues aux contraintes de cisaillement élevées nécessaires pour mélanger les cellules avec l'alginate (Donati et Paoletti, 2009).

La capacité à former des gels en présence d'ions divalents est une autre propriété des alginates qui dépend de la quantité et de la structure séquentielle des blocs de M, de G et de MG. La stabilité des gels formés dépend de la nature des ions métalliques utilisés pour la gélification et augmente selon la suite suivante : $Mg^{2+} < Mn^{2+} < Ca^{2+} < Sr^{2+} < Ba^{2+} < Cu^{2+} < Pb^{2+}$ (Donati et Paoletti, 2009). Parmi ceux-ci, l'ion le plus utilisé dans l'industrie alimentaire est le Ca^{2+} . Pour que l'alginate puisse réagir avec le calcium afin de former un gel, il doit contenir une quantité minimale d'acide guluronique, dont les monomères doivent exister en série. Des régions d'acide guluronique d'une molécule d'alginate, se lient à des régions semblables d'autres molécules d'alginate au moyen de l'ion Ca^{2+} , en formant ainsi une zone de jonction entre les deux molécules. Donati et Paoletti (2009) ont reporté que pour le calcium, il faut au moins 8 à 20 monomères adjacents d'acide guluronique pour former une jonction stable. Ainsi la capacité de l'alginate pour former un gel dépend de la quantité et de la longueur des blocs G (Onsøien, 1997). Une teneur élevée en acide guluronique et de longues chaînes de blocs G donnent des alginates avec une plus grande réactivité vis-à-vis du calcium et avec un plus grand potentiel pour produire de gels plus forts. Comme l'illustre la figure 1-3 l'ion calcium s'encastre dans la structure d'acide guluronique comme un œuf dans une boîte (modèle *boîte d'œufs*).

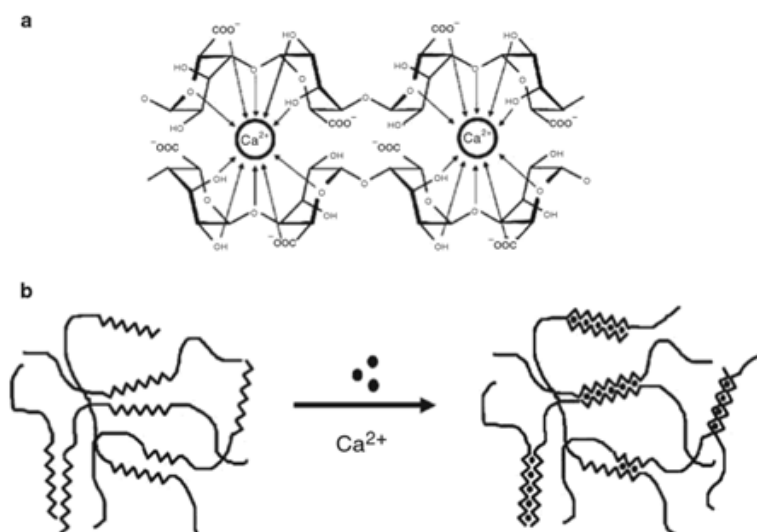


Figure 1-3 Modèle *boîte d'œufs* pour les liaisons de cations divalents avec l'alginate a) liaisons avec du calcium b) Formation de jonctions entre des chaînes de polymère (extrait de Donati et Paoletti, 2009).

Lors de leur formation, les gels d'alginate de calcium se rétrécissent par perte d'eau, induisant une augmentation de la concentration du polymère dans les billes par rapport à la solution initiale d'alginate (Martinsen et al., 1989b). Ce phénomène connu comme synérèse induit un effondrement partiel de la matrice, augmente la stabilité du gel et réduit sa porosité. Le même auteur a vérifié aussi que des alginates avec des teneurs plus élevées en acide guluronique et avec des blocs G de longueur moyenne supérieure présentent une moindre réduction de volume. La réduction de volume est aussi affectée par le temps de contact et par la concentration en Ca^{2+} dans la solution de gélification, mais seulement jusqu'à une certaine

valeur de concentration. Pour des concentrations supérieures à cette valeur, la concentration de Ca^{2+} cesse d'avoir toute influence sur la réduction de volume.

La cinétique de gélification est dépendante de la méthode utilisée pour l'introduction de l'agent gélifiant, introduction induisant la formation de gels homogènes ou hétérogènes. Pour réussir une distribution homogène de l'alginate dans un gel, l'introduction de l'agent gélifiant doit être réalisée sous forme contrôlée, en utilisant pour cela le calcium dans sa forme inactivée (CaCO_3) et en abaissant ultérieurement le pH par l'addition de δ - glucanolactone (Donati et Paoletti, 2009). Les gels avec distribution hétérogène d'alginate sont obtenus quand l'agent gélifiant provient d'un réservoir extérieur vers la solution d'alginate. Dans ce cas il y a une gélification très rapide sur le front de diffusion de l'ion, résultant en une formation instantanée du gel. L'alginate qui est dans le centre de la solution diffuse vers la zone de gélification ce qui conduit à une diminution de l'alginate au centre (Skjåk-Bræk et al., 1989). Pour contrôler l'homogénéité du gel, on doit procéder à une sélection soignée du PM, de la concentration de l'alginate et de la concentration de l'ion gélifiant ainsi que des ions non gélifiants. D'une manière générale l'utilisation d'alginate avec faible PM, et des solutions avec de basses concentrations en ions gélifiants et non gélifiants forment les gels les plus hétérogènes (Thu et al., 1996).

La diffusion de l'alginate du centre de la bille vers la périphérie peut entraîner aussi les cellules du micro-organisme à s'immobiliser en créant une hétérogénéité dans la distribution des cellules dans la matrice. Zohar-Perez et al. (2004) ont observé qu'en partant de solutions d'alginate homogènes avec des cellules d'*Escherichia coli* et de *Trichoderma asperellum*, la distribution des microorganismes dans les billes d'alginate n'était plus homogène, étant plus dense près de la surface et plus diffuse dans les zones les plus proches du centre. Il a vérifié aussi que même pour des microorganismes de tailles et de propriétés différentes, le comportement dans les billes d'alginate était semblable, ce qui renforce l'idée que la distribution hétérogène est due au mécanisme de formation des billes.

La présence de cellules dans des concentrations de 5.10^8 et de 1.10^9 cell/mL semble ne pas affecter les propriétés rhéologiques de l'alginate de sodium, notamment la viscosité (Manojlovic, 2006) En contrepartie, la présence de levures dans les gels d'alginate augmente les temps de gélification d'un facteur proportionnel au volume occupé par les cellules (Manojlovic et al, 2006 ; Gilson et al., 1990).

Comme discuté précédemment les propriétés fonctionnelles des alginate sont très importantes pour leur utilisation comme matériel d'immobilisation et dépendent fortement de leur composition monomérique, des dispositions séquentielles et de la longueur des blocs G. Ainsi une sélection soignée du matériel à utiliser est nécessaire pour obtenir les meilleurs résultats (Martinsen et al., 1989b).

1.4.3. Diffusion moléculaire et porosité

La connaissance de la diffusion des substrats et des métabolites dans les gels d'alginate ainsi que celle de la distribution du diamètre des pores est essentielle pour l'utilisation d'alginate comme matrice d'immobilisation.

La diffusion de petites molécules semble être peu affectée par la matrice d'alginate. La diffusion de glucose et d'éthanol a été décrite comme en étant environ 90% de celle dans l'eau (Smidsrød et Skjåk-Bræk, 1990). Le transport de molécules de plus grande dimension comme les protéines peut être restreint. Des protéines avec un PM supérieur à $3 \cdot 10^5$ peuvent diffuser vers l'extérieur des billes avec un taux de diffusion qui dépend de leurs dimensions moléculaires (Smidsrød et Skjåk-Bræk, 1990). Avec les alginates possédant plus d'acide guluronique on observe des taux de diffusion plus élevés, ce qui indique une structure de pore plus ouverte (Martinsen et al., 1989b). Ceci peut être liée au fait que ces alginates ont une réduction de volume moins importante pendant la gélification. Néanmoins Amsden et Turner (1999) ont conclu que la diffusion de BSA (albumine sérum bovine) était plus grande dans les gels préparés à partir d'alginate de sodium avec faible teneur en acide guluronique que dans des gels avec une forte teneur en acide guluronique.

Des études sur la porosité des gels d'alginate faisant appel la microscopie électronique ont montré que le centre du gel est macroporeux avec des pores qui peuvent avoir des diamètres de 5 à 200 nm, tandis que la porosité plus proche de la surface est plus serrée, de 5-16 nm (Martinsen, 1989a).

Il est couramment accepté que le taux de diffusion de substrats et de métabolites soit restreint par l'augmentation de la concentration des cellules dans les billes. Ainsi des densités cellulaires élevées (100 à 200 g cellules sèches/L alginate) ne sont pas nécessairement synonymes de plus grande réactivité (Furusaki et al., 1985). Selon Estape et al. (1992), de telles valeurs de concentration de cellules sont très supérieures à ce qui pourra être utilisé réellement pour le fonctionnement de fermenteurs avec des cellules immobilisées. Une telle observation est confirmée par l'expérience du présent travail où la concentration est seulement de 20 g de cellules sèches / L alginate. Estapé et al (1992) ont trouvé des résultats apparemment contradictoires dans la mesure où le coefficient de diffusion du glucose dans l'alginate avec 10^9 cel/mL alginate est plus élevé que celui déterminé dans l'alginate sans cellules. Pour expliquer ce phénomène, l'auteur propose l'hypothèse d'une adsorption préférentielle du glucose dans les cellules.

1.4.4. Stabilité des gels d'alginate

D'une manière générale les alginates les plus riches en acide guluronique forment des gels plus brillants et plus forts, tandis que les alginates plus riches en acide mannuronique conduisent à des gels plus élastiques et souples (Thu et al., 1996). La force du gel formé dépend aussi de la

concentration du chlorure de calcium. Plus la concentration de calcium dans la solution de gélification est grande, plus la force du gel est élevée (Shoichet et al, 1996).

La plus grande limitation pour l'utilisation d'alginate de calcium comme matrice d'immobilisation de cellules est sa sensibilité vis à vis des agents chélatants comme les phosphates, citrates et lactates, vu que sa présence enlève le calcium des zones de jonction des chaînes de polymère. De manière identique, la présence d'ions concurrents comme le Na^+ vont déstabiliser la matrice, par substitution du Ca^{2+} (Smidsrød et Skjåk-Bræk, 1990). Une façon de dépasser cette limitation passe par le maintien des ratios de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ inférieurs à 25 pour des alginates avec une forte teneur en acide guluronique et inférieurs à 3 pour les alginates avec une teneur en acide guluronique basse (Smidsrød et Skjåk-Bræk, 1990).

Pour l'utilisation de cellules immobilisées en œnologie la stabilité des gels d'alginate de calcium n'est pas un problème dans la mesure où le sodium, le phosphate ou d'autres agents complexants concurrents potentiels sont présents dans des concentrations très faibles. Néanmoins plusieurs auteurs indiquent que le manque de stabilité chimique et mécanique des gels d'alginate est le principal désavantage de cette méthode (Plieva et al., 2008), principalement pour leur mise en oeuvre dans des bioréacteurs industriels de grande capacité ou pour des fonctionnement de longue durée (Kourkoutas et al., 2010)

1.4.5. Déshydratation et réhydratation de cellules immobilisées dans alginate

Un des points importants pour la sélection d'une méthode d'immobilisation est la garantie d'un temps de conservation adéquat pour le produit développé. Le séchage des levures est une méthode couramment utilisée dans l'industrie de production de levures pour prolonger leur temps de vie. La déshydratation apporte aussi d'autres avantages par rapport à la levure non déshydratée : facilité de transport et réduction de coûts associés, réduction de l'espace de stockage, faible niveau de contaminants (Bayrock et Ingledew, 1997). Les équipements plus fréquemment utilisés pour réaliser la déshydratation sont les séchoirs en lit fluidisé car ils permettent un séchage doux avec un transfert rapide de chaleur et de masse entre courant gazeux et particules. De plus, ils rendent possible un mélange rapide du solide en créant des conditions presque isothermes à travers tout le séchoir. Le contrôle du procédé a une importance essentielle pour garantir que la température des cellules ne dépasse pas 40°C, limitant ainsi la perte rapide de viabilité (Bayrock et Ingledew, 1997).

Pendant le séchage, il y a transfert d'eau des billes vers le courant gazeux. Tout comme lors de la formation des billes, la sortie d'eau des billes conduit à une réduction de leur volume, à une augmentation de la concentration d'alginate et en conséquence à une réduction significative de la porosité du gel (Smidsrød et Skjåk-Bræk, 1990). De plus, le séchage accentue le gradient de distribution de cellules dans les billes, du fait de la contraction des billes (Zohar-Perez et al., 2004).

Après séchage et une fois placées dans le milieu fermentaire, les billes peuvent récupérer totalement ou partiellement leur forme initiale. Placées dans de l'eau, les billes élaborées à

partir d'un alginat riche en acide guluronique pourront être de taille identique à leur taille initiale (Vreeker, 2008) ou légèrement plus gonflées (Smidsrød, 1990). La réhydratation dans une solution aqueuse avec 10 mM de NaCl a montré que des billes avec une faible teneur en acide guluronique se réhydratent plus rapidement que des billes avec des teneurs en acide guluronique plus élevées (Vreeker et al., 2008). Ces résultats suggèrent que la réhydratation des billes dépend du type d'alginate utilisé et aussi de la force ionique du milieu de réhydratation. En réalité, cette dernière observation n'est pas surprenante car l'ion Na^+ entre en compétition avec le Ca^{2+} , entraînant ainsi la rupture des liaisons entre différentes chaînes d'alginate, et permettant une expansion du volume des billes. Vreeker (2009) a vérifié aussi que les ions monovalents ont des affinités différentes vis-à-vis de l'alginate. Par exemple, les ions Na^+ ont une plus grande affinité que les ions K^+ et en conséquence sont plus efficaces pour remplacer le Ca^{2+} et se lier à l'alginate.

Ce paragraphe montre que l'alginate présente les meilleures conditions pour constituer un système d'immobilisation cellulaire. De plus, il y a des critères généraux comme les résistances chimique et mécanique, la taille des pores, l'homogénéité des cellules dans les billes, qui peuvent être totalement ou partiellement remplis grâce à une sélection appropriée des alginates. Cette sélection peut être faite en fonction de la composition, de la structure séquentielle, du poids moléculaire et du contrôle de la cinétique de gélification des alginates.

Des alginates avec une forte teneur en acide guluronique (>70%) et une longueur moyenne de blocs G supérieur à 15, permettent d'élaborer des billes avec une plus grande résistance mécanique, une moindre réduction de volume, une meilleure stabilité vis-à-vis des ions monovalents et une plus grande porosité. Ainsi ce type d'alginate sera au départ plus avantageux pour l'immobilisation de cellules vivantes (Martinsen et al, 1989).

1.5. Techniques d'immobilisation par inclusion/encapsulation

L'inclusion/encapsulation par gélification ionotrope est un processus qui se déroule en deux étapes : d'abord la formation de gouttes, suivi de la solidification dans un bain avec un agent gélifiant. Les gouttes formées devront être idéalement sphériques, de la même dimension et leur forme doit être stable même après immersion dans la solution de gélification.

Pour la formation de gouttes, il existe plusieurs techniques qui seront abordées par la suite. Le tableau 1-1 résume les techniques et les caractéristiques du produit obtenu avec chaque technique

Tableau 1-1 – Caractéristiques de techniques d'inclusion/encapsulation par gélification ionotropique (Serp, 2000)

Technique	Description	Dimension billes	Distribution de taille
<i>Dripping</i>	Des gouttes se forment par goutte à goutte à partir d'une seringue	1 - 5 mm	Elevée
<i>Rotating disk atomizer</i>	Coupe de faisceau de liquide en utilisant un atomiseur à disque rotatif	15 μm – 4 mm	Elevée
<i>Air-flow</i>	Formation de gouttes par perturbation avec un jet d'air coaxial	10 μm – 2mm	Elevée
<i>Air atomization</i>	Formation de gouttes par application d'air à haute pression en sortie d'une buse	5 μm - 300 μm	> 60%
<i>Mechanical jet cutting</i>	Coupe du faisceau de liquide en utilisant fil métallique rotatif de haute vitesse	300 μm – 2 mm	Faible
<i>Vibrating nozzle</i>	Formation de gouttes dues à perturbation mécanique dans une buse	200 μm – 2 mm	< 10%
<i>Electrostatic</i>	Utilisation de forces électrostatiques pour couper le faisceau liquide	50 μm – 3 mm	>10%

À l'exception de la technique de *vibrating nozzle*, les autres techniques produisent des billes avec une distribution de taille élargie, nécessitant un tamisage ultérieur de façon à obtenir un produit final homogène en taille (Schwinger et al., 2002 ; Serp, 2000). En outre, seule la technique de *vibrating nozzle* permet de réaliser l'immobilisation en double couche - encapsulation.

Dans la technique de *vibrating nozzle* la solution d'alginate est pompée vers une buse qui vibre avec une fréquence et un déplacement connus. La vibration contrôlée casse le faisceau de liquide qui sort de la buse, conduisant à la formation de gouttes individuelles qui, par gravité, tombent dans un bain de solution gélifiante où l'alginate se transforme en gel. Quand on utilise une buse double (ou buse bi-fluide) concentrique la vibration casse un faisceau de deux fluides concentriques ce qui forme des gouttes avec un noyau et une capsule extérieure enveloppant le noyau (Cellesi et al., 2004). Si le noyau est constitué d'alginate et de levures et la capsule seulement d'alginate, on obtient après gélification de levures encapsulées dans une matrice d'alginate.

La formation continue et reproductible de gouttes sphériques est seulement possible quand le mécanisme de coupe du faisceau est stable et cette condition dépend du choix approprié de

plusieurs paramètres comme le débit du liquide, la viscosité de la solution, la tension superficielle, le diamètre des buses et la fréquence de vibration (Heinzen et al., 2002)

La morphologie des capsules formées est aussi affectée par l'entrée des gouttes dans la solution de gélification. Une pénétration incorrecte peut modifier la forme des gouttes et donner une forme plus ovale. Il peut aussi se produire la formation d'une bulle d'air qui est emprisonnée dans le gel ou qui adhère à la surface de la bille. Ce phénomène dépend principalement de l'énergie cinétique au moment de l'impact, de la viscosité, du diamètre de la goutte et aussi de la tension superficielle du bain (Cellesi et al., 2004).

1.6. Impact de l'immobilisation sur les cellules

Au cours des dernières années, il a été montré que la physiologie des cellules immobilisées diffère de celle des cellules libres. Quelques modifications sont avantageuses mais d'autres peuvent être défavorables. Malheureusement pour le moment, on ne réussit pas à prévoir quel type de modifications va se produire ; différents auteurs reportent différentes observations.

Doran et Bailey (1985) ont observé que les propriétés cinétiques de cellules de *S. cerevisiae* immobilisées dans de la gélatine sont notablement différentes de celles des cellules libres : La levure immobilisée consomme le glucose deux fois plus rapidement que la levure libre, néanmoins le taux spécifique de croissance est réduit de 45%. Le même auteur a constaté que les cellules immobilisées stockent de grandes quantités d'hydrates de carbone de réserve (tréhalose et glycogène) et contiennent plus de polysaccharides structurels que les cellules libres.

Fumi et al. (1994) ont détecté des ratios d'ATP/ADP plus élevés dans les cellules immobilisées, ce qui indique une activité métabolique plus intense que dans les cellules libres. Ils ont observé aussi une quantité plus importante de phosphomonoesters ce qui indique une plus grande consommation de glucose. Le contenu d'acides gras insaturés ou de chaînes courtes était environ 50% supérieur dans les levures immobilisées. Plusieurs auteurs ont associé cette surproduction d'acides gras insaturés à une augmentation de la tolérance des cellules à l'éthanol (Verbelen et al, 2006).

Il a aussi été reporté des cas où les cellules immobilisées ont souffert de modifications morphologiques (Bonin et al., 2006 ; Laca et al., 2000). Bonin et al. (2006) ont observé qu'après 3,5 mois de fermentation de moût en continu, les cellules de *S. bayanus* isolées du support (*foam glass*) ne présentaient pas une morphologie normale. Quelques-unes avaient une forme allongée type poire, d'autres présentaient des rides. Laca et al. (2000) ont constaté par microscopie de transmission électronique que les cellules de *Serratia marcescens* plus proches du centre des billes d'alginate de calcium semblaient plus petites et déformées. Laca et al. (2000) ont aussi vérifié que pendant la fermentation, il existe une croissance préférentielle des cellules plus proches de la surface des billes. Ces cellules plus proches de la surface et donc

avec un accès facilité aux éléments nutritifs et à l'oxygène se reproduisaient en formant des colonies de forme sphérique.

D'un point de vue plus pragmatique, en ce qui concerne l'impact sur le produit final (vin), l'immobilisation de cellules semble introduire aussi des modifications. Kourkoutas et al. (2005) a produit des vins fermentés à de basses températures avec une qualité améliorée et avec un profil aromatique distinct. Pour cela il utilise des cellules de *S. cerevisiae* immobilisées dans des morceaux de fruit (poire et pomme). Loukatos et al (2000) ont aussi observé que des cellules immobilisées dans une matrice de γ -alumine produisaient du vin avec une meilleure qualité sensorielle que celui produit avec des levures libres. L'utilisation de levures du type *Schizosaccharomyces pombe* immobilisés dans de l'alginate de calcium pour la désacidification de moûts améliore aussi la qualité organoleptique du vin (Silva et al, 2003), comparativement à un témoin non désacidifié.

MATERIELS ET METHODES

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériel biologique

Dans ce travail deux souches de levures de différents genres ont été utilisées:

- une *Saccharomyces cerevisiae* – souche QA23
- une *Schizosaccharomyces pombe* – souche G2

La souche QA23 a été sélectionnée par l'Universidade de Trás-os-montes e Alto Douro en collaboration avec la Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes (CVRVV) et l'entreprise Proenol. La levure a été isolée dans la Quinta de Azevedo dans la région de Vinhos Verdes (Portugal). Elle est exploitée industriellement sous la forme sèche active (LSA) et sous la forme encapsulée. La QA23 est utilisée surtout pour la fermentation des vins blancs pour lesquels on cherche un profil aromatique jeune et fruité. Elle est aussi reconnue pour ses faibles besoins en azote.

La souche G2 a été isolée par l'Institut Coopératif du Vin (ICV Montpellier, France) et elle est exploitée industriellement sous forme encapsulée par Proenol. Cette levure est caractérisée par son aptitude à dégrader l'acide malique en éthanol et CO₂. Par ailleurs elle présente une extrême sensibilité à des traitements thermiques comme celui du séchage (Silva et al., 2002).

2.1.1. Conservation des souches

Pendant la durée de l'étude les souches ont été conservées à 4°C sur une pente de gélose YEPD– agar (Yeast Extract Peptone Dextrose), dont la composition est la suivante :

- | | |
|---------------------|--------|
| ○ Extrait de levure | 10 g/L |
| ○ Peptone | 20 g/L |
| ○ Glucose | 20 g/L |
| ○ Agar | 20 g/L |

Après dissolution le milieu était stérilisé en autoclave pendant 20 minutes à 121°C.

Un repiquage des souches a été fait tous les deux mois.

2.2. Production des levures

La production des levures pour leur immobilisation ultérieure était faite dans un fermenteur pilote de 600 L. Afin de développer un inoculum pour un fermenteur de cette taille, il est obligatoire de passer par les différentes étapes présentées dans la Figure 2-1.

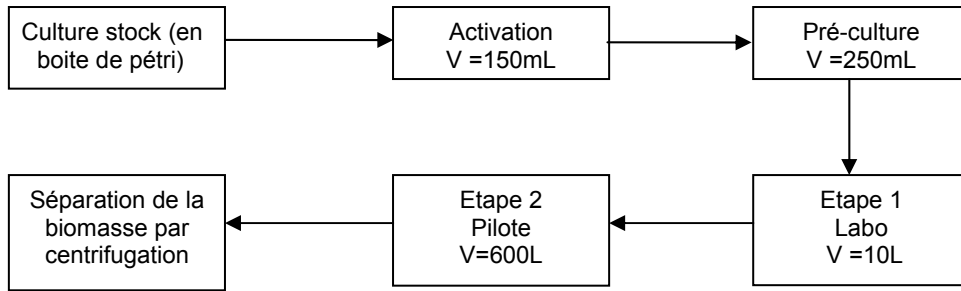


Figure 2-1 Schéma de propagation et de récupération des levures *Sacharomyces cerevisiae* et *Schizosacharomyces pombe*

À partir des cultures en boîte de pétri, on développait deux inoculum séquentiels appelés « d'activation » et « pré-culture ». Ensuite la pré-culture servait à ensemencer le fermenteur labo de 10 L qui à son tour servait d'inoculum pour l'étape 2 (pilote de 600 L). En fin de croissance dans l'étape 2, la biomasse était séparée du moût fermenté et concentrée par centrifugation.

2.2.1. Equipement de production de levures

○ Fermenteur labo

Les fermenteurs de laboratoire sont de la marque Newbrunswick, ils fonctionnent en discontinu et ont un volume utile de 10 L. Chaque fermenteur est composé d'un réservoir et d'un couvercle, tous deux en acier inox. Dans le couvercle divers piquages permettent l'insertion des sondes de pH, de température, des tubes pour l'entrée et la sortie du gaz ainsi que pour l'addition d'éléments nutritifs et/ou de la solution de contrôle du pH (voir la Figure 2-2). Au cours de ce travail seuls les piquages d'entrée et sortie du gaz ont été utilisés, les autres restant dûment bouchés. Le couvercle sert aussi de support à un agitateur à pales du type Newton-Rushton.

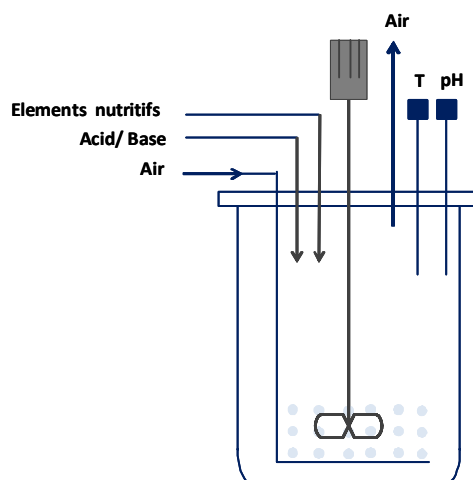


Figure 2-2 Fermenteur de laboratoire New Brunswick, Volume = 10L

Le contrôle de la température des fermenteurs est réalisé par immersion dans un bain thermostaté.

○ Unité pilote

L'unité pilote utilisée pour l'étape 2 de propagation des levures est représentée schématiquement dans la Figure 2-3:

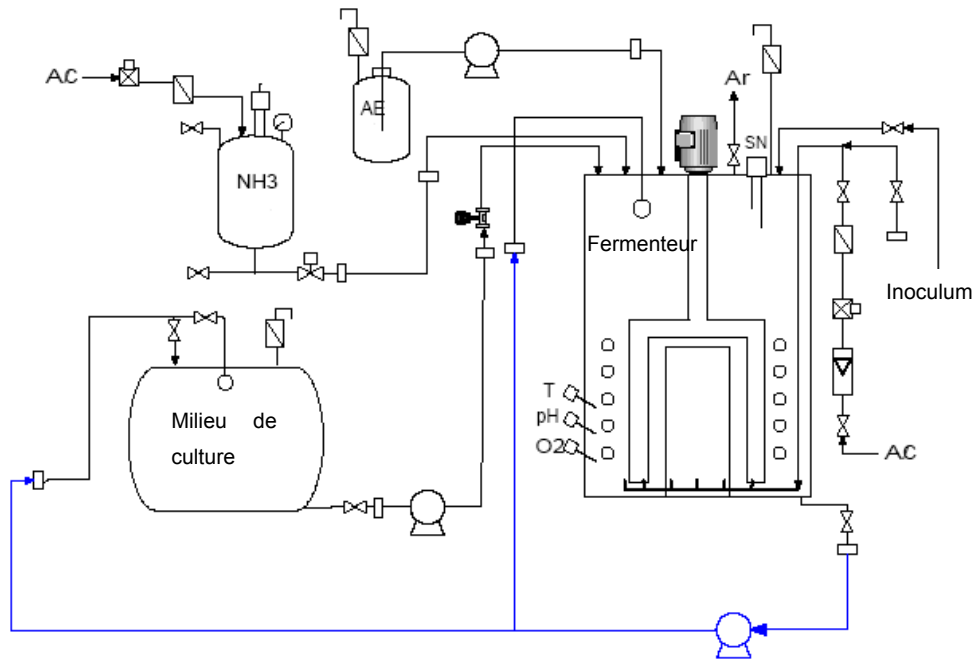


Figure 2-3 Schéma de l'unité pilote de propagation de levures

L'unité est constituée par:

- 1 fermenteur de volume utile de 600 L
- 1 réservoir pour stocker le milieu de culture
- 1 réservoir pour ammoniaque liquide
- 1 réservoir pour l'antimousse
- 2 pompes, l'une pour l'addition du milieu de culture et l'autre pour l'addition de l'anti mousse
- 1 PLC pour faire le contrôle de l'installation.

Le fermenteur dispose de plusieurs piquages dans le couvercle afin de permettre l'addition du milieu de culture, de l'ammoniaque, de l'anti mousse et l'entrée et sortie de l'air. Il existe un autre piquage dans le couvercle pour l'insertion des sondes de niveau. Dans la paroi du fermenteur, il existe 3 piquages de plus pour l'insertion des sondes de mesure de la température, du pH et de l'oxygène dissous.

Le contrôle de température est réalisé grâce à des résistances électriques et à un serpentin de réfrigération, les deux placés à l'intérieur du fermenteur. À l'intérieur du serpentin, il circule de l'eau à 0°C.

L'air qui entre est filtré par un filtre absolu de 0,45 µm et son débit est mesuré avec un rotamètre. La dispersion de l'air est réalisée avec un *sparger* placé dans le fond du fermenteur sous le module d'agitation. Toute l'unité peut être désinfectée chimiquement et/ou avec de la vapeur.

Le fermenteur peut opérer en régime semi-continu avec une alimentation graduelle du milieu de culture au fermenteur (fed-batch) ou en discontinu (batch) selon les objectifs de culture.

2.2.2. Formulations des milieux de culture pour la propagation des levures

Le milieu de culture de l'inoculum variait selon l'étape de propagation et selon la souche de levures utilisée.

- Activation et Pré-culture

Pour ces 2 étapes la composition du milieu est la suivante :

▪ Glucose	50 g/L
▪ KH ₂ PO ₄	5 g/L
▪ (NH ₄) ₂ SO ₄	2 g/L
▪ Extrait de levure	2 g/L
▪ MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,4 g/L
▪ Peptone	1 g/L
▪ Eau (q.s.p)	1 L

Ce milieu est commun aux deux souches de levures utilisées.

- Etape 1 – Fermentation labo

L'étape 1 se déroule dans le fermenteur labo. Le milieu est à base de moût de raisin concentré, supplémenté avec des nutriments. La concentration des sucres (glucose + fructose) dans le moût concentré est de 840 g/L et la densité est de 1321 kg/m³ à 20°C.

Dans cette étape, la composition du milieu diffère selon la levure à faire croître. Le Tableau 2-1 suivant présente la composition selon la souche de levure.

Tableau 2-1 – Composition du milieu de culture pour l'étape 1 pour les deux souches de levures utilisées.

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Shz. pombe</i>
Moût concentré (g/L)	157	165
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	2	5
KH ₂ PO ₄ (g/L)	5	5
MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	0,4	0,4
Extrait de levure (g/L)	1	5
Thiamine (mg/L)	0,8	0,8
Eau (qsp) (L)	10	10

○ Etape 2 – Fermentation pilote

Pour la production de la souche de *S. cerevisiae* qui est « Crabtree positive » (Walker, 1998 ; Deken, 1966), le fermenteur pilote travaillait en régime discontinu alimenté. Dans ce cas, deux milieux de culture différents sont utilisés : un pour le pied de cuve et l'autre pour l'alimentation du fermenteur.

Pour la levure *Shz. pombe* qui selon nos évaluations internes est « Crabtree négatif » contrairement à ce qui a été publié dans la bibliographie (Deken, 1966), il est inutile de travailler en régime discontinu alimenté. Ainsi la production de *Shz. pombe* se faisait en discontinu et un seul milieu de culture était nécessaire. Le tableau 2-2 indique la composition du milieu pour chacune des levures.

Tableau 2-2 – Composition du milieu de l'étape 2 pour les deux souches de levures utilisées.

	<i>S. cerevisiae</i>		<i>S. pombe</i>
	Pied de cuve	Alimentation	Discontinue
Moût concentré (g/L)	79	173	165
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	2	0,5	5
KH ₂ PO ₄ (g/L)	5	5	5
MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	0,4	0,4	0,4
ZnSO ₄ ·7H ₂ O (mg/L)	10	10	10
Extrait de levure (g/L)	1	1	5
Thiamine (mg/L)	0,8	0,8	0,8
Eau (qsp) (L)	225	375	600

2.2.3. Mise en œuvre des fermentations

Dans ce paragraphe, nous décrirons de façon détaillée la procédure de propagation de la levure, notamment les conditions opératoires pour chacune des souches utilisées dans le travail.

○ Activation et Pré-culture

L'activation est la première étape du procédé de production des levures et est réalisée dans des fioles d'erlenmeyer avec 150 mL du milieu de culture décrit dans l'alinéa 2.2.2. Avant l'inoculation, le milieu est stérilisé dans l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes.

Les erlenmeyers contenant le milieu de culture sont inoculés avec deux colonies de levures prélevées sur une gélose en boîte de Pétri. Par la suite, ils sont incubés à 30°C pendant 24h. À la fin de cette période et après agitation, on quantifie la population cellulaire, le taux de viabilité et le taux de sucre résiduel - voir tableau 2-3.

Les levures issues de cette première étape vont servir d'inoculum pour la pré-culture, qui est faite dans des erlenmeyers avec 250 mL de milieu. Le volume d'inoculum à ajouter à la pré-culture est de 20 mL (8 %), ce qui correspond à une population initiale proche de $2,5 \cdot 10^6$ cellules viables/mL pour la QA23 et de $1,0 \cdot 10^5$ cellules viables/mL pour la G2. Ces erlenmeyers sont incubés dans les mêmes conditions que les précédents, pendant 24 h. À la fin, des échantillons sont pris pour caractériser la pré-culture – voir tableau 2-3.

Tableau 2-3 – Caractéristiques de la pré-culture pour les 2 souches étudiées.

	Souche	QA23	G2
Activation	Population finale (10^7 cel/mL)	$3,5 \pm 0,0$	$1,5 \pm 1,4$
	Viabilité (%)	$97 \pm 1,9$	$98,1 \pm 2,8$
	Sucres résiduelles (Gluc + Frut) (g/L)	$26,1 \pm 0,9$	$41,3 \pm 1,2$
Pré-culture	Population initiale (10^6 cel/mL)	$2,6 \pm 0,5$	$0,1 \pm 0,1$
	Population finale (10^7 cel/mL)	$2,6 \pm 0,3$	$0,9 \pm 0,0$
	Viabilité (%)	$98,3 \pm 0,6$	$98,9 \pm 1,6$
	Sucres résiduelles (Gluc + Frut) (g/L)	$16,3 \pm 0,7$	$36,3 \pm 2,8$

Pour minimiser l'impact de contaminations accidentelles, il est toujours inoculé un erlenmeyer de plus que le strictement nécessaire. Nous gardons aussi un erlenmeyer non inoculé qui sert de contrôle pour évaluer si le milieu est effectivement stérile.

Le procédé décrit ci-dessus est valable pour le *S. cerevisiae* et pour la *Shz. pombe*. La pré-culture obtenue va servir d'inoculum pour les fermenteurs de 10 L.

○ Etape 1 – Fermentation laboratoire

Comme déjà indiqué dans l'alinéa 2.2.2, le milieu de culture varie avec la souche de levures mais les procédures opératoires sont identiques. Le pH initial du milieu est corrigé à 5,0, avec de l'acide orthophosphorique à 85%. Les fermenteurs et les 10 L de milieu de culture qu'ils contiennent sont stérilisés à 121°C pendant 20 minutes. Le sulfate d'ammonium, pour sa part, est stérilisé séparément et ajouté aseptiquement au milieu avant l'inoculation.

Après stérilisation et refroidissement, les fermenteurs sont placés dans un bain à température contrôlée à 30°C et par la suite sont inoculés avec 270 mL de pré-culture. En moyenne, ce volume permet d'obtenir une population initiale dans le fermenteur de l'ordre de $1,5 \cdot 10^6$ cellules/mL pour la QA23 et de $7,0 \cdot 10^5$ cellules/mL pour la G2 (consulter le Tableau 2-4).

La vitesse d'agitation, contrôlée avec un tachymètre, est de 150 rpm. L'air injecté dans le fermenteur traverse un filtre en téflon avec une porosité absolue de 0,2 μm et son débit est ajusté pour 4 L/minute à l'aide d'un rotamètre. Pendant la fermentation, il n'est réalisé aucune correction du pH.

La durée de la fermentation est de 24 h. À la fin de cette période, il est réalisé une mesure de la concentration cellulaire et du taux de viabilité. Dans le tableau suivant on présente des résultats de ces mesures pour les deux souches utilisées.

Tableau 2-4 – Caractéristiques de la population obtenue dans les fermenteurs de 10 L

Souche	QA23	G2
Population initiale (10^6 cel/mL)	$1,7 \pm 0,9$	$0,7 \pm 0,2$
Population finale (10^8 cel/mL)	$5,0 \pm 0,5$	$3,7 \pm 1,1$
Viabilité (%)	$> 98,5$	$> 99,0$

Il est toujours inoculé un fermenteur de plus que nécessaire. Les fermenteurs de laboratoire serviront d'inoculum pour le fermenteur pilote.

○ Etape 2 – Fermentation pilote

La réalisation des fermentations pilote démarre avec le nettoyage et la stérilisation de l'installation. Ensuite, on procède à la stérilisation du milieu de culture : le moût dilué est stérilisé *in-situ* dans l'installation, les sels minéraux et autres éléments nutritifs sont stérilisés séparément par autoclavage et ajoutés ultérieurement au moût.

Pour les deux souches, le débit d'air apporté au fermenteur est constant et est de 1320 L/min (2,2 vvm). Les fermentations se déroulent à une température proche de 30°C. La valeur de consigne du pH est fixée à 5,0 et son ajustement est réalisé avec une solution d'ammoniaque à 12,5 %.

L'oxygène dissous en phase liquide diminue au cours du temps et peut atteindre à la fin de la fermentation des valeurs proches de 5 %.

Contrairement aux fermentations de laboratoire, les fermentations pilote sont conduites différemment pour la souche QA23 et la souche G2.

La propagation de la QA23 est réalisée en régime fed-batch. Pour cela un pied-de-cuve de 225 L est préparé dans le fermenteur. Deux fermenteurs de laboratoire (20 L volume total) servent d'inoculum pour le pied de cuve. La concentration cellulaire dans le pied de cuve, après inoculation, est approximativement de $40 \cdot 10^6$ cel/mL. Une fois les sucres du pied de cuve consommés, on démarre l'alimentation continue du milieu de culture selon un profil prédéterminé qui a été développé par Proenol pour cette souche spécifique. À la fin de la fermentation, le volume de milieu de culture apporté au fermenteur est de 375 L. Comme il n'existe aucun condenseur dans le fermenteur, environ 100 L d'eau sont entraînés dans le courant gazeux de sortie. Ainsi, le volume final est approximativement de 500 L et non les 600 L attendus s'il n'y avait pas eu évaporation. À la fin de la croissance, on obtient environ $1,0 \cdot 10^9$ cel/mL, ce qui équivaut à 40 g/L de biomasse sèche. La propagation de la QA23 a en moyenne une durée de 40 h.

La souche G2 est multipliée en discontinu. Donc, le fermenteur contient depuis le début un volume de milieu de culture de 600 L. Comme pour la QA23 le fermenteur est inoculé avec 20 L d'inoculum provenant des deux fermenteurs de laboratoire. La population cellulaire initiale est de l'ordre de $10 \cdot 10^6$ cel/mL. En fin de cycle on obtient en moyenne $6,0 \cdot 10^8$ cel/mL ce qui correspond à 14 g/L de biomasse sèche. La durée de la propagation de la souche G2 dans

l'échelle pilote est approximativement de 21 h. Environ 100 L d'eau sont perdus par évaporation ce qui rend le volume final dans le fermenteur de l'ordre de 500 L.

2.2.4. Récupération et concentration de la biomasse

À la fin de la multiplication, la biomasse est refroidie jusqu'à 10°C puis transférée dans un réservoir où elle est refroidie à 4°C. La biomasse est maintenue à cette température pendant 15 h, jusqu'au passage à l'étape de concentration.

Dans cette étape les levures sont séparées du moût fermenté par centrifugation. La crème de levures obtenue est remise en suspension dans 500 L d'une solution aqueuse à 8 g/L de chlorure de sodium. Ceci correspond à un lavage qui a pour objectif d'enlever les composés toxiques produits lors de la croissance. Une nouvelle centrifugation permet d'obtenir la crème de levures finale qui sera utilisée dans l'immobilisation.

La centrifugeuse utilisée pour la concentration de la biomasse est une centrifugeuse à assiettes de la marque Alfa-Laval modèle LPX. Cet équipement accumule la biomasse concentrée vers l'intérieur et réalise périodiquement des décharges de la biomasse vers l'extérieur. La régularité des déchargements est programmable en fonction du débit d'alimentation et de la concentration initiale de solide en suspension.

Les conditions opératoires de la centrifugeuse sont présentées dans le tableau 2-5 pour chacune des souches :

Tableau 2-5 – Conditions opératoires de la centrifugeuse pour les 2 souches de l'étude.

	QA23	G2
Débit alimentation (L/h)	215	550
Intervalle entre décharges (min)	2	2
Pression intérieure (bar)	4	4

On observe que pendant le procédé de centrifugation, il y a une perte de cellules dans le surnageant. Cette perte limite le rendement de centrifugation à 87% pour la QA23 et à 96% dans le cas de la G2. Probablement un autre type de centrifugeuse comme celle dite à *nozzles*, permettrait d'obtenir des rendements plus élevés pour la QA23. Néanmoins il n'a pas été possible d'essayer ce type d'équipement pendant le travail.

Le tableau 2-6 résume les caractéristiques de la biomasse avant et après centrifugation.

Tableau 2-6 – Caractéristiques du procédé de centrifugation

	QA23	G2
Conc. avant centrifugation (g/L)	40	14
Conc. après centrifugation (g/L)	170	174
Facteur concentration	4,2	12,4

Après centrifugation les levures se présentent sous la forme d'une crème liquide de couleur beige. Cette crème est ensuite dirigée vers le procédé d'immobilisation.

2.3. Immobilisation et séchage des levures

2.3.1. Équipement d'immobilisation et de séchage

La ligne d'immobilisation utilisée dans le travail est schématisée dans la Figure 2-4. Cette ligne a été intégralement développée et mise au point par l'équipe technique de Proenol.

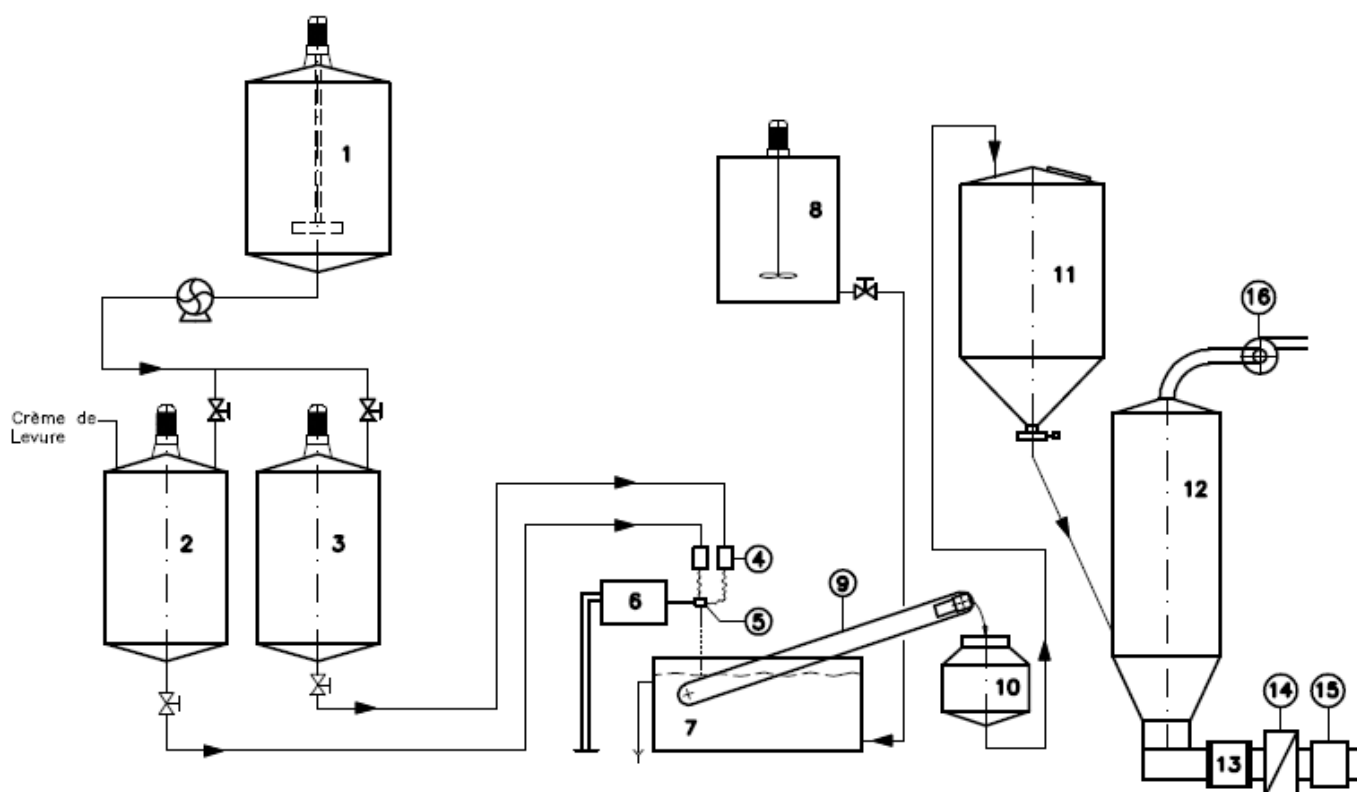


Figure 2-4 Ligne pilote d'immobilisation. 1 - réservoir de dissolution d'alginate; 2 - réservoir de couche interne ; 3 - réservoir de couche externe ; 4 - diffuseurs de débit ; 5 – buses bi-fluide; 6 *shaker* ; 7 - réservoir de gélification ; 8 - réservoir de préparation de la solution de chlorure de calcium ; 9 - Convoyeur ; 10 - Réservoir de lavage ; 11 - Réservoir intermédiaire pour stock des sphères humides ; 12 - Séchoir en lit fluidisé ; 13 - Échangeur de chaleur ; 14 - Filtre de particules ; 15 - Condenseur ; 16 - Ventilateur

Les alginates utilisés dans le travail se présentent sous la forme d'une poudre beige de couleur uniforme et de fine granulométrie. Dans le réservoir 1, on réalise la dissolution de ces alginates dans l'eau. Pour cela le réservoir est équipé avec un agitateur à haut taux de cisaillement qui permet de travailler avec les viscosités élevées (0,5 à 2,5 Pa.s) obtenues en fin de dissolution. Les solutions d'alginate sont ensuite pompées vers les réservoirs 2 et 3. Les additions de l'alginate et de la crème de levure au réservoir 2 sont simultanées. Les deux réservoirs sont équipés d'agitateurs afin de maintenir les solutions homogènes et d'empêcher dans le cas du réservoir 2, le dépôt des levures dans le fond. Ils sont aussi préparés pour être pressurisés avec de l'air jusqu'à une pression de 2 bars. À la sortie de chacun des réservoirs le débit est contrôlé à l'aide d'un débitmètre massique.

Par mise sous pression d'air, les fluides des réservoirs 2 et 3 sont dirigés vers deux diffuseurs de débits indépendants – voir Figure 2-4 (4) et Figure 2-5 (1). Les diffuseurs assurent la distribution homogène du débit grâce à 15 tuyaux d'acier inox qui acheminent les alginates vers la batterie de buses bi-fluide – Figure 2-4 (5) et Figure 2-5 (3). La connexion entre les tuyaux inox et les buses est faite par des tuyaux flexibles en silicone – Figure 2-5 (4).

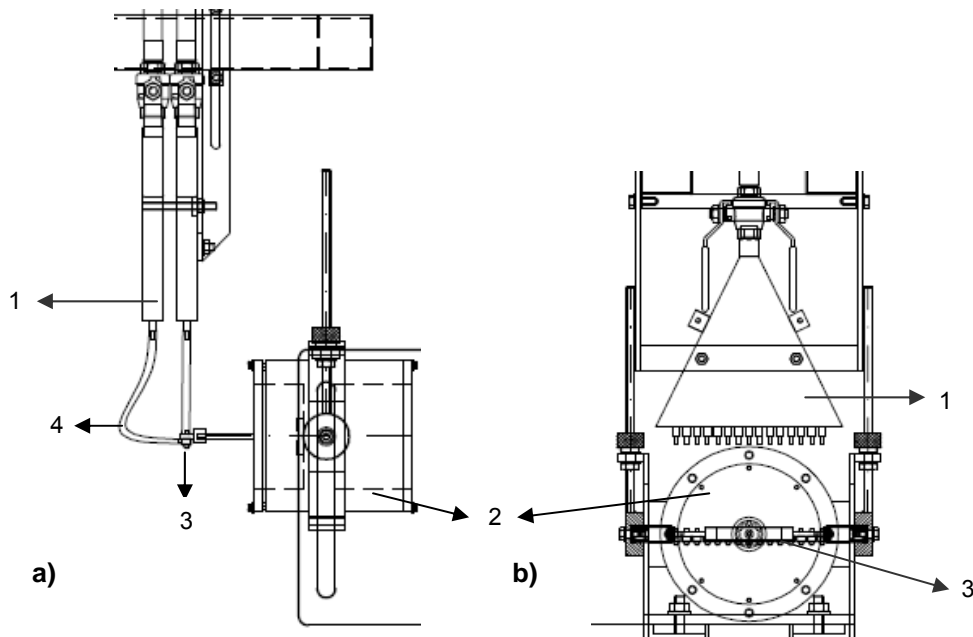


Figure 2-5 Vue latérale a) et frontale b) de l'équipement d'immobilisation. 1 - Diffuseurs de débit; 2 - *shaker*; 3 - support et buses bi-fluide; 4 - Tuyaux flexibles

Les buses sont fixées sur un support qui est directement lié au *shaker* – Figure 2-4 (6) et Figure 2-5 (2). La Figure 2-6 présente une vue en coupe des buses bi-fluide.

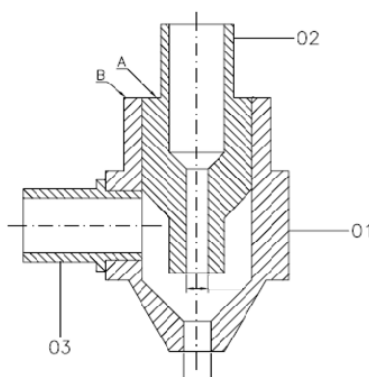


Figure 2-6 Vue en coupe des buses bi-fluide 01 - Chambre de jonction des fluides ; 02 - Entrée couche interne ; 03 - Entrée de la couche externe.

Le fluide provenant du réservoir 2 entre par la partie supérieure du bec - pièce 02 - et le fluide venu du réservoir 3 entre par la pièce latérale 03. La sortie des deux liquides du bec se fait par l'orifice inférieur de la chambre de jonction – pièce 01. À l'intérieur de la chambre de jonction les fluides ne se mélangent pas et donc on obtient en sortie deux faisceaux de liquide concentriques. Le faisceau intérieur contient le fluide du réservoir 2 et le faisceau extérieur est constitué par le fluide du réservoir 3.

En même temps que les liquides traversent les becs, le *shaker* produit une vibration sinusoïdale horizontale avec une fréquence et un déplacement contrôlés et identiques pour chacun des becs. La vibration transmise aux becs induit une déstabilisation du faisceau de liquide qui conduit à la formation de milliers de gouttes sphériques par seconde, sensiblement de la même taille. Pour observer et optimiser la qualité des gouttes formées, on utilise une lampe stroboscopique. La sélection de la forme de l'onde, de la fréquence de vibration et de l'amplitude de déplacement appliquée aux becs est faite au moyen d'un générateur et d'un amplificateur de signal.

Les gouttes produites avec les équipements décrits ci-dessus sont constituées par deux couches : une couche interne (ou noyau) qui contient la solution provenant du réservoir 2 (alginate + crème de levure) et une couche externe faite à partir de la solution du réservoir 3 (alginate seul).

Les gouttes qui se forment à la sortie des becs tombent par gravité dans une solution de chlorure de calcium (Figure 2-4 (7)) où une réaction instantanée de gélification transforme les gouttes liquides en billes de gel. L'extérieur des billes se gélifie immédiatement, gagnant ainsi la résistance mécanique nécessaire au transport par un tapis convoyeur (Figure 2-4 (9)) vers un réservoir de lavage (Figure 2-4 (10)).

Dans ce réservoir les billes subissent plusieurs lavages consécutifs destinés à enlever l'excès d'agent gélifiant et le sodium qui a été libéré pendant la gélification. Les lavages sont réalisés jusqu'à ce que l'eau de fin de lavage ait une conductivité qui ne dépasse pas de 10 mS/cm la conductivité de l'eau du réseau.

Après lavage les billes sont pesées et transportées pneumatiquement vers un réservoir intermédiaire (Figure 2-4 (11)), où elles vont s'accumuler jusqu'à ce que le procédé d'immobilisation soit terminé, c'est à dire que les réservoirs 2 et 3 soient vides.

Une fois terminé l'immobilisation, les levures encapsulées sont envoyées du réservoir intermédiaire vers un séchoir en lit fluidisé (Figure 2-4 (12)). L'air utilisé pour le séchage est préalablement déshydraté grâce à un condenseur (Figure 2-4 (15)), filtré (Figure 2-4 (14)) et finalement chauffé dans un échangeur de chaleur (Figure 2-4 (13)) jusqu'à ce que la température désirée soit atteinte.

Un programme d'ordinateur lit la température du lit de billes (indiquée par une sonde) et ajuste la température à la sortie de l'échangeur afin de maintenir celle du lit proche de la valeur sélectionnée de consigne.

Au début et à la fin de chaque production la ligne est intégralement lavée et désinfectée avec des solutions à base d'acide peracétique, de soude et de chlore actif.

2.3.2. Detail du système de pompage pneumatique pour les solutions d'alginate

La Figure 2-7 représente le système de contrôle de débit des alginate à partir des réservoirs 2 et 3 (déjà présentés dans la Figure 2-4).

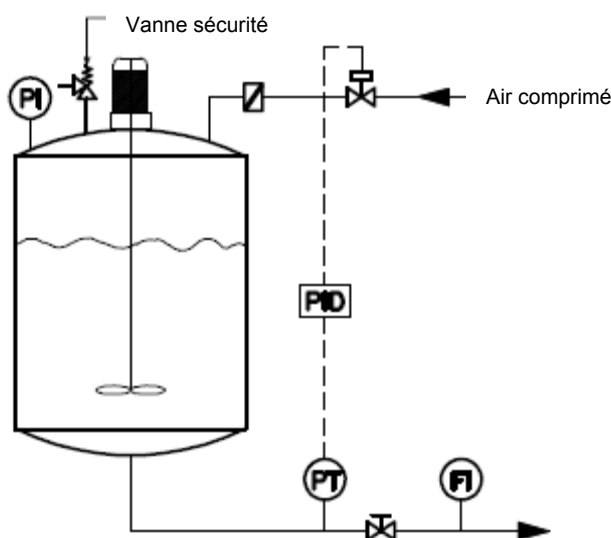


Figure 2-7 Représentation schématique du système de pompage pneumatique et de contrôle de débit à partir des réservoirs de couche interne/externe. PT – transmetteur de pression ; PI - indicateur de pression ; FI - indicateur de débit

Le pompage des alginate vers les diffuseurs de débit se fait par pressurisation de la partie supérieure des réservoirs. La valeur de consigne en pression est définie en fonction du débit désiré. Un contrôleur PID maintient la pression dans les valeurs sélectionnées. Le débit à la sortie des réservoirs est mesuré avec un débitmètre massique placé dans la canalisation.

2.3.3. Détail du système de gélification

De façon à garantir que la concentration du chlorure calcium (agent gélifiant) se maintienne constante pendant tout le procédé d'immobilisation, le système présenté sur la Figure 2-8 a été utilisé.

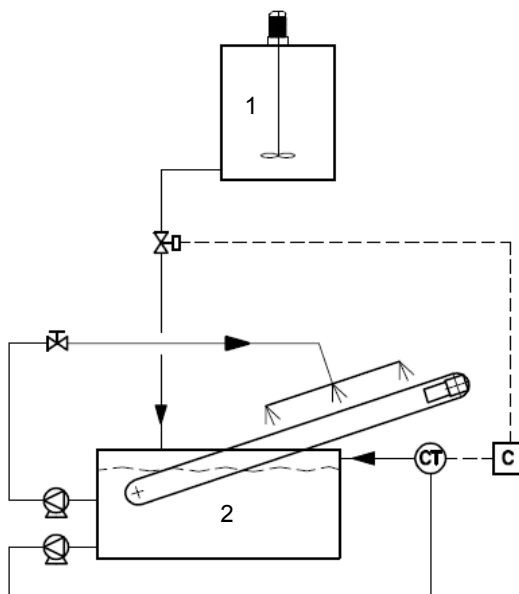


Figure 2-8 Équipement pour alimentation et contrôle du chlorure de calcium dans la ligne d'immobilisation. 1- réservoir mère ; 2- réservoir de gélification

Ce système est constitué par un réservoir qui contient la solution mère de chlorure de calcium (Figure 2-8 (1)) avec une concentration de 300 g/L et qui alimente par gravité le réservoir où se produit la réaction de gélification (Figure 2-8 (2)). À la sortie du réservoir de gélification, il existe deux pompes :

- une pour faire la recirculation du chlorure de calcium dans le réservoir de réaction, en maintenant ainsi une concentration homogène.
- une autre pour alimenter un ensemble de buses qui sont placées sur le convoyeur. Ces buses ont pour objectif de disperser l'agent gélifiant sur les sphères juste formées qui ne sont plus immergées dans la solution de calcium. Ceci permet de prolonger le temps de contact des sphères avec le calcium, en garantissant que la gélification de l'alginate se produit jusqu'au centre des sphères.

Au cours du procédé d'immobilisation, il y a consommation de calcium, associée à la réaction et il existe aussi un important effet de dilution du calcium dans le réservoir du à la libération d'eau présente dans la solution des alginates. Ce phénomène connu comme synérèse s'explique par un rapprochement des molécules d'alginate, lié à la formation du gel, et qui conduit à une réduction du volume des billes en expulsant une partie de l'eau contenue dans la solution d'alginate.

Pour compenser l'effet de dilution, on a utilisé un système de contrôle basé sur la conductivité, les ions présents en solution étant majoritairement Cl^- et Ca^{2+} .

Dans la canalisation de recyclage du chlorure de calcium, il est inséré une sonde de conductivité reliée à un contrôleur PI. Quand la conductivité atteint des valeurs au-dessous de celle désirée, le contrôleur ouvre la vanne d'alimentation ce qui permet le passage du chlorure de calcium stocké dans le réservoir mère, et ferme la vanne quand la valeur désirée est atteinte.

La concentration en chlorure de calcium dans le réservoir de gélification varie conformément aux conditions opératoires sélectionnées, mais est toujours très inférieure à la concentration de la solution mère.

2.4. Techniques analytiques

2.4.1. Détermination de la concentration en biomasse et de la viabilité

La quantité de biomasse produite et sa viabilité sont deux paramètres importants qui fonctionnent comme des indicateurs de l'évolution correcte du procédé de fabrication des levures immobilisées. Au cours de ce travail deux méthodes ont été utilisées pour quantifier la biomasse.

- Méthode thermo-gravimétrique

Cette méthode est basée sur la quantification de la matière sèche obtenue par déshydratation d'un échantillon de levures en suspension. Le résultat est exprimé en masse de biomasse sèche par volume d'échantillon.

L'échantillon de volume connu ($V_i = 5$ ou 2 mL selon la concentration cellulaire) est centrifugé à 4300 rpm pendant 10 min à une température de 4°C . Le culot est remis en suspension dans de l'eau et centrifugé dans les mêmes conditions. Ensuite, on détermine la masse du nouveau culot (m) qui est placé dans un analyseur électronique d'humidité Sartorius MA30. Avec la valeur d'humidité résiduelle obtenue (HR), on calcule la masse de levure sèche (MS) dans l'échantillon initial en faisant appel à la relation suivante:

$$MS = \left(1 - \frac{HR}{100}\right) * m / V_i$$

- Numération directe par observation au microscope

Une des techniques les plus communes pour quantifier le nombre de cellules dans un échantillon est le comptage direct au microscope en utilisant un hematimètre (ou compte cellules), qui dans ce travail a été une chambre de Neubauer. La chambre de Neubauer est une lame de microscope, plus épaisse qu'une lame normale et comportant une partie plus basse

sur laquelle est gravée dans le verre une surface quadrillée. D'après la Figure 2-9, la chambre est divisée en 9 carrés. Le carré central, où se réalise le comptage, contient 25 carrés moyens et chacun d'eux est subdivisé en 16 carrés plus petits.

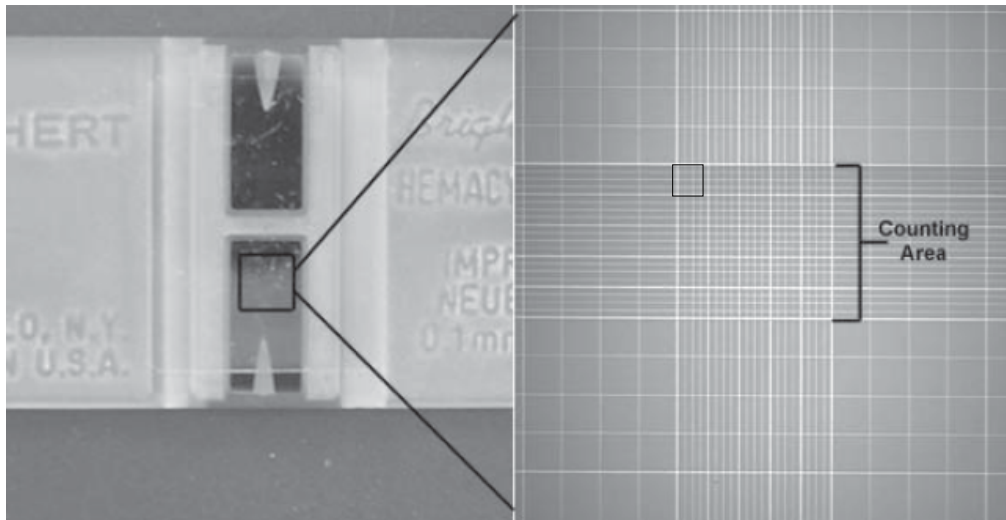


Figure 2-9 Cellule de Neubauer (photo extraite de Lucarini et al., 2004)

La hauteur de la chambre est délimitée par une lamelle qui est placée dessus. En connaissant la surface des carrés moyens et la hauteur de liquide à l'aplomb de la surface, il est possible de calculer le volume apparent de la colonne de liquide. En comptant les cellules dans ce volume connu, on arrive à une estimation de la concentration cellulaire dans l'échantillon initial. La surface de chacun des 25 carrés est de $0,04 \text{ mm}^2$. La hauteur jusqu'à la lame est de $0,100 \text{ mm}$ ainsi le volume de chacun de ces carrés moyens est de $4 \cdot 10^{-6} \text{ mL}$.

Quand on place l'échantillon dans la chambre, les micro-organismes se distribuent aléatoirement. La précision du comptage dépend donc de la bonne homogénéisation de l'échantillon, du nombre de carrés comptés et du nombre de cellules comptées. Pour obtenir une homogénéisation correcte, les échantillons analysés étaient agités avec un appareil vortex avant d'être placés dans la chambre. On compte toujours 5 carrés moyens dans la diagonale (Figure 2-9). Afin que l'erreur associée au comptage soit inférieure à 10 %, le nombre total de cellules comptées doit être compris entre 150 et 250.

La concentration en cellules, exprimé en cellules/mL, a été déterminée en utilisant la relation suivante :

$$X = (\text{nombre de cellules comptées} \times \text{dilution}) / (\text{nombre de carreaux moyens comptés} \times 4 \cdot 10^{-6})$$

Pour des échantillons très dilués où on ne réussissait pas à avoir un comptage minimum de 150 cellules dans 5 carrés, on réalisait des comptages dans les 25 carrés moyens et le résultat était accepté seulement à la condition d'obtenir un nombre minimum de 100 cellules comptées.

- Viabilité

Le comptage direct au microscope optique fournit une estimation du nombre de cellules totales existant dans un échantillon, néanmoins il ne donne pas d'informations à l'égard de la viabilité des cellules. Une façon d'obtenir ces informations passe par l'utilisation du bleu de méthylène.

Le bleu de méthylène est un colorant organique qui appartient au groupe des thiazines. Quand ce colorant est mélangé avec l'échantillon, les cellules mortes présentent à l'observation au microscope une coloration bleue tandis que les cellules vivantes gardent leur couleur usuelle.

Le mode d'action du bleu de méthylène est encore objet de débat scientifique ; deux hypothèses existent (Lonvaud et al., 2010):

- dans un cas, on suppose que la membrane des levures mortes est fragilisée et ainsi elle est perméable au bleu de méthylène, tandis que les cellules vivantes maintiennent une perméabilité sélective de la membrane.
- dans l'autre, on suppose que la membrane cellulaire est perméable au bleu de méthylène et que c'est à l'intérieur des cellules vivantes qu'il est réduit par des enzymes en perdant la coloration bleue, tandis que dans les cellules mortes qui n'ont pas la capacité de produire ces enzymes la couleur bleue est maintenue.

L'utilisation du bleu de méthylène pour la détermination de la viabilité est une technique appropriée pour des levures du type *S. cerevisiae* et du type *Shz. pombe*.

Par contre, hors du contexte du présent travail, on a constaté dans le laboratoire de Proenol, que ce colorant n'est pas approprié pour évaluer la viabilité d'une souche de *Starmerella bombicola* avec laquelle nous avons eu l'occasion de travailler. Avec cette levure nous avons trouvé sur les comptages en plaque des viabilités inférieures à 50%, tandis qu'avec le bleu de méthylène les viabilités étaient de l'ordre de 85%. Le bleu de méthylène fournissait des résultats par excès.

Il faut noter que des auteurs affirment que cette technique est peu précise quand la viabilité est inférieure à 95% (Mochaba et al., 1998). Dans notre laboratoire nous avons pu trouver une corrélation entre la viabilité au bleu de méthylène et la viabilité déterminée par cytométrie de flux qui va jusqu'à 75% (résultat non présenté).

Aussi il faut faire la distinction entre viabilité et vitalité car ce sont des concepts différents. La viabilité fait référence à la mesure des cellules vivantes, capables de se multiplier, tandis que la vitalité est une mesure de l'activité métabolique des levures. La vitalité est liée à l'état de santé ou de vigueur d'une culture. Elle peut être évaluée indirectement par des mesures de l'activité fermentaire, des molécules intracellulaires (glycogène, stérols, ATP) ou des coefficients d'échange gazeux. Ces mesures ont un degré de corrélation variable avec la performance fermentaire et il n'y a pas de technique unique qui puisse prévoir précisément l'activité physiologique d'un échantillon de levures (Walker, 1998).

Le protocole utilisé dans ce travail pour la détermination de la viabilité est très simple. On ajoute un volume de solution de bleu de méthylène à un volume d'échantillon. Après homogénéisation

et un temps de contact de 10 mn, on homogénéise à nouveau et on place une goutte dans la chambre de Neubauer pour réaliser le comptage.

Le taux de viabilité est le rapport entre le nombre de cellules non colorées et le nombre de cellules totales.

○ Préparation d'échantillons de levures immobilisées

Les techniques décrites jusqu'à présent pour la détermination de la concentration et de la viabilité de la biomasse demandent que les cellules de levures se trouvent en suspension, c'est à dire sous une forme libre où elles sont facilement accessibles. Tel est le cas des échantillons provenant des activations, des pré-cultures, des fermenteurs, de la centrifugation et du réservoir qui contient le mélange alginate/levure.

Par contre, pour utiliser les dites techniques dans des échantillons où les levures sont immobilisées, il devient obligatoire de dissoudre préalablement l'alginate de calcium qui enrobe les cellules. La dissolution de l'alginate de calcium libère les levures de la matrice polymérique où elles étaient emprisonnées. Après la dissolution, les cellules se trouvent dans une suspension d'alginate de sodium.

La solution pour la dissolution des billes d'alginate a la constitution suivante :

- D-Glucose monohydraté 10g/L
- Citrate tri-sodique hydraté 20g/L
- Chlorure de sodium 10g/L
- bacto-peptone 1,2 g/L

Pour la numération des cellules et la mesure de la viabilité au microscope la dissolution est réalisée en ajoutant 20 billes (humides ou déshydratées) et 5 mL de solution de dissolution dans un tube à essai. Le tube est placé en agitation dans un Vortex pendant 20 minutes, ce qui correspond au temps nécessaire pour que la dissolution soit complète.

Pour quantifier la biomasse sèche dans les billes déshydratées, la dissolution est réalisée dans un flacon contenant 450 mL de solution et 5 g de sphères sèches. L'agitation se fait avec une barre magnétique et le temps de dissolution est de 1h. Ensuite les levures sont séparées de la solution d'alginate de sodium par centrifugation. La biomasse rassemblée est lavée avec de l'eau, centrifugée encore une autre fois et le culot repris dans 3 mL d'eau. Par la suite il est placé dans un analyseur électronique d'humidité Sartorius MA30. Le résultat est exprimé en masse de levures sèches par masse de billes. La matière sèche dans l'échantillon initial (billes) est calculée en faisant appel à la suivante relation :

$$MS = \left(1 - \frac{HR}{100}\right) * m / M_b$$

où MS est la masse de levure sèche exprimée en g_{levure}/L, HR est la humidité résiduelle de l'échantillon, m est la masse de levure humide en g et M_b représente la masse de billes en g.

2.4.2. Détermination de la viscosité des solutions d'alginate

La mesure de la viscosité de solutions dans l'industrie est très utilisée dans le domaine du contrôle de qualité pour évaluer la reproductibilité des lots de matières premières mais aussi pour estimer la facilité de travailler avec ces solutions au niveau de la production. Cette constatation s'applique intégralement au procédé de production de levures immobilisées et justifie le besoin de réaliser cette analyse. La viscosité des solutions d'alginate est un paramètre important du contrôle, pas seulement du procédé d'immobilisation mais aussi de la qualité de l'alginate lui-même.

La viscosité est la mesure de l'attrition interne d'un fluide, ou si nous préférons est la mesure de la résistance d'un fluide au flux. Mathématiquement cette définition peut être exprimée en faisant appel à la relation suivante :

$$\eta = \frac{\tau}{\gamma}$$

η est la viscosité (Pa.s), τ la contrainte de cisaillement (Pa) et γ la vitesse de cisaillement (s⁻¹).

Pour des fluides newtoniens la viscosité est constante indépendamment de la vitesse de cisaillement appliquée. Pour des fluides non-newtoniens la relation τ/γ n'est plus constante c'est-à-dire que quand la vitesse de cisaillement est modifiée, la vitesse de cisaillement ne varie pas dans la même proportion ou direction.

Les solutions d'alginate présentent un comportement non-newtonien de type pseudoplastique. Ceci veut dire qu'au fur et à mesure que nous augmentons la vitesse de cisaillement la viscosité apparente du fluide devient plus basse. Ce phénomène peut être interprété de la façon suivante : tant que la solution est maintenue dans des conditions de basse vitesse de cisaillement, par exemple basse vitesse d'agitation, les molécules d'alginate sont disposées de façon aléatoire et désorganisées en créant une résistance au flux (Figure 2-10-a). Au fur et à mesure que la vitesse de cisaillement augmente, les molécules tendent à s'aligner parallèlement les unes aux autres, en offrant peu de résistance au flux et en donnant donc une viscosité apparente plus basse (Figure 2-10-b).

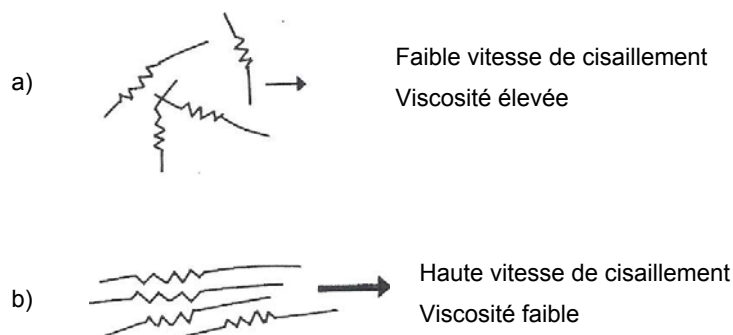


Figure 2-10 Alignement des molécules d'alginate en solution avec l'augmentation de la vitesse de cisaillement

Pour des fluides pseudoplastiques la viscosité mesurée est apparente et on peut seulement dire que la mesure est exacte quand les conditions où elle a été réalisée sont dûment explicitées (marque et modèle de viscosimètre, *spindle* et vitesse de cisaillement).

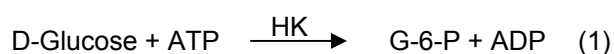
La viscosité des solutions préparées au cours de ce travail a été mesurée avec un viscosimètre rotatif Mettler-Toledo RM180 Rheomat, en utilisant le tube 1, module d'agitation 1 et les vitesses de cisaillement suivantes: 20 ; 50 ; 75 et 100 s⁻¹. La température de mesure a toujours été de 20 °C.

Il est aussi important de faire ressortir que la viscosité d'une solution d'alginate dépend de la concentration de l'alginate et de la longueur des molécules d'alginate, c'est à dire du nombre de monomères qui constituent la chaîne (poids moléculaire moyen). La viscosité, pour une même concentration, est d'autant plus élevée que la longueur du polymère est plus grande.

2.4.3. Dosage enzymatique du D-Glucose et du D-Fructose

Le dosage du glucose et du fructose a été réalisé avec un analyseur enzymatique automatique de la marque Horiba modèle ABX Pentra 400. Les kits enzymatiques utilisés sont de la marque Megazyme (référence K-FRUGL) et permettent la quantification simultanée du D-glucose et du D-fructose. L'analyse avec ce kit ne fournit pas les informations sur la concentration de chacun de ces composés pris individuellement.

Le D-glucose et le D-fructose sont phosphorylés par l'enzyme hexokinase (HK) et par l'adenosine-5-triphosphate (ATP) en donnant le fructose-6-phosphate (F-6-P) et le glucose-6-phosphate (G-6-P).





En présence de l'enzyme glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6P-DH) et du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP^+), le G-6-P est oxydé en gluconate-6-phosphate ce qui est accompagné de la formation de NADPH.



La quantité de NADPH formée lors de la réaction est mesurée par l'augmentation de l'absorbance à 340 nm et est proportionnelle à la quantité de D-glucose présente dans l'échantillon.

Quand la réaction 3 est complète, la F-6-P est convertie en G-6-P par la phosphoglucose isomerase (PGI), qui, à son tour, entre dans la réaction 3 et contribue à augmenter encore davantage l'absorbance. De cette façon le glucose et aussi le fructose sont quantifiés.

La relation entre l'absorbance mesurée et la concentration de glucose/fructose est établie avec une courbe de calibration. La gamme de détection de la méthode est comprise entre 0,1 et 5,0 g/L de D-glucose + D-fructose.

2.4.4. Mesure de la conductivité

La conductivité est un paramètre utilisé dans le contrôle des étapes de gélification et de lavage.

La détermination de la conductivité dans les solutions liquides est réalisée ainsi : deux électrodes dont les surfaces identiques (S) et la distance qui les sépare (d) sont connues, sont immergées dans le produit. Une tension alternative est appliquée à ces électrodes, ce qui génère un courant dans le produit. La résistance électrique (R) ou sa valeur inverse, la conductance G, est calculée d'après la loi d'Ohm. A l'aide de la constante de cellule $c = d/S$, définie par la géométrie de la cellule, on détermine la conductivité spécifique $\varepsilon = R/c$ exprimée en S/cm.

Les mesures de conductivité sont réalisées directement dans la ligne de production (*on-line*) avec des conductimètres de la marque Yokogawa. Le conductimètre est constitué par un transmetteur et par une sonde de conductivité de 2 électrodes, équipée avec un thermomètre PT100 pour faire la compensation automatique de la température.

2.4.5. Détermination de l'activité biologique des levures

Afin d'évaluer l'activité biologique des levures immobilisées déshydratées, une méthode basée sur la capacité de la levure à consommer une certaine quantité de glucose dans une période de

temps défini a été mise en œuvre. Cette technique a comme résultat final l'approbation ou le rejet du lot et elle est seulement applicable quand la levure immobilisée est la QA23 ou autre *Saccharomyces*.

L'essai consiste à ajouter 15 g de levure sèche immobilisée à 100 mL d'une solution qui contient 5 g/L de glucose. Au moment de l'inoculation, la solution est à la température de 37°C. Après l'inoculation la solution est placée dans une étuve aussi à 37°C. Périodiquement sont rassemblés des échantillons pour analyse du glucose conformément au tableau 2-7.

Tableau 2-7 – Tableau de collecte d'échantillons pour évaluation de l'activité biologique des levures sèches immobilisées

Temps	0 h	0,5h	1h	1,5h	2h	3h	4h	5h	6h
Identification de l'échantillon	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8

Il est défini comme critère d'acceptation que la concentration de sucre dans le T8 doit être inférieure à 0,13 g/L. Les lots qui ne répondent pas à cette exigence sont automatiquement rejetés.

2.4.6. Détermination des levures de contamination

Le procédé d'immobilisation utilisé dans ce travail peut être, comme tout autre procédé biotechnologique, sujet à des contaminations de source variée. Une façon de minimiser et de contrôler les contaminations potentielles passe par la mise en œuvre d'un plan de Bonnes Pratiques d'Hygiène et de Fabrication. Ce plan englobe des activités qui vont de la formation des opérateurs de ligne en HACCP jusqu'à la réalisation de contrôle microbiologique des installations et des matières premières. Le respect de ce plan minimise le risque de contaminations provenant de l'extérieur, qui peuvent présenter un risque biologique pour le produit final. Néanmoins les levures immobilisées peuvent aussi être l'objet de contamination si le procédé de formation de gouttes n'est pas dûment contrôlé. C'est le cas s'il y a des levures qui devraient être à l'intérieur de la capsule et qui en réalité ont réussi à s'échapper à l'extérieur de la sphère pendant la formation des gouttes. Cette contamination ne compromet pas la sécurité du produit, mais peut compromettre sa performance dans l'utilisation.

Une façon d'évaluer si l'encapsulation a été réussie passe par la recherche de levures à l'extérieur des sphères. Pour ce contrôle, on ajoute 1 g de levures sèches immobilisées à 9 mL de solution isotonique peptonée (SIP) stérile et on l'agite dans le vortex pendant 1 min. 1 mL de cette solution est ensuite transféré sur une plaque stérile où on ajoute le milieu CRB. Après solidification, il est incubé pendant 48 h à 30°C. Si le résultat de ce contrôle est inférieur à 1000 ufc/g le produit est approuvé, autrement il est rejeté.

2.4.7. Détermination de l'activité de l'eau

L'activité de l'eau (a_w) est une mesure de la quantité d'eau libre (non liée) disponible pour les micro-organismes. L'activité de l'eau dans un échantillon peut être définie comme le rapport entre la pression de vapeur de l'eau dans l'échantillon et la pression de vapeur de l'eau pure à la même température, à l'équilibre. L'activité de l'eau est dépendante de la température et son effet est spécifique pour chaque produit. Pour une même quantité d'eau présente dans un échantillon donné, l'activité de l'eau sera d'autant plus élevée que le sera la température.

Il existe une valeur limite d'activité de l'eau au-dessous de laquelle il n'y a pas de développement microbien. Cette valeur diffère d'un micro-organisme à l'autre comme nous pouvons le voir dans le Tableau 2-8.

Tableau 2-8 – Valeurs minimales de a_w , pour la croissance de différents micro-organismes (Jay et al., 2005)

Microorganisme	a_w
<i>Candida utilis</i>	0,94
<i>Botrytis cinérea</i>	0,93
<i>Trichosporon pullulans</i>	0,91
<i>Saccharomycopsis vernalis</i>	0,89
<i>Aspergillus glaucus</i>	0,70
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	0,62

Des valeurs basses de l'activité de l'eau (0,2 – 0,4) limitent aussi l'oxydation des lipides et l'activité d'enzymes (Belitz et Grosch, 1987).

Comme l'objectif de l'étape de séchage est d'augmenter le temps de conservation des levures immobilisées par réduction de la quantité d'eau disponible, la mesure de l'activité de l'eau est la technique adoptée pour contrôler le moment d'arrêt du séchage.

La mesure de l' a_w a été réalisée avec un équipement Rotronic constitué par un lecteur Hygroskop et une sonde AwV C. Pour réaliser la mesure, l'échantillon était inséré dans la sonde et on attendait jusqu'à la stabilisation de la mesure de l' a_w .

2.4.8. Détermination du nombre de billes par gramme

Le comptage du nombre de billes qui existent dans un gramme de produit est un des paramètres de contrôle du produit fini.

On pèse avec rigueur dans une balance analytique de précision 0,500 g de levures immobilisées et ensuite on réalise le comptage du nombre de billes sur l'échantillon pesé. On multiplie le nombre de billes comptées par 2 de sorte à avoir le nombre par gramme.

Pour connaître l'erreur associée à l'échantillonnage et à l'opérateur on a fait des comptages sur un même lot par 4 personnes différentes et chacune a fait 3 comptages.

Les résultats sont présentés par la suite dans le tableau 2-9.

Tableau 2-9 – Comptages (et erreur associée) du nombre de billes par gramme fait par 4 opérateurs

Elément	1	2	3	4
Comptage	418 ± 6	437 ± 1	435 ± 3	438 ± 2

Pour le produit utilisé dans la fabrication de vins mousseux ce contrôle est important car le dosage des billes dans les bouteilles, est fait à l'aide d'une bague de volume constant mais en réalité ce qu'on veut avoir c'est une masse constante dans chaque bouteille. En faisant l'hypothèse que la densité de chaque bille est à peu près constante ce qui selon notre expérience est vrai, le comptage du nombre de billes par gramme nous permet de savoir si le dosage sera celui voulu ou pas. Plus de billes nous avons dans un gramme, plus petites seront les billes, donc quand on dose avec un volume constant, plus importante sera la masse dosée. L'inverse est aussi vrai, c'est-à-dire peu de billes par gramme implique une dose faible.

2.4.9. Détermination des ions Na⁺ et Ca²⁺ en solution de gélification

L'analyse de détermination des ions Na⁺ et Ca²⁺ dans la solution de gélification a été sous traitée à un laboratoire externe accrédité par le Instituto Português de Acreditação.

La détermination a été faite par la méthode de spectrophotométrie d'absorption atomique en flamme.

2.4.10. Observation des billes à la loupe binoculaire

L'observation des billes a été faite avec une loupe binoculaire Nikon SMZ 800 qui possède une capacité d'augmentation entre 5X et 31X. Elle permet aussi d'enregistrer les observations avec un appareil photo digital.

***MISE AU POINT D'UN PROCEDE
D'IMMOBILISATION DE LEVURES***

3. Mise au point d'un procédé d'immobilisation de levures

Dans cette partie du travail l'attention sera orientée vers l'importance du choix des matières premières et vers la description du procédé de formation de gouttes ainsi que dans la présentation des paramètres opératoires les plus importants. On discutera aussi l'impact que certains de ces paramètres ont sur le procédé d'immobilisation et sur la qualité du produit final obtenu vis-à-vis d'une application œnologique.

L'équipement et le procédé d'immobilisation de levures ont déjà été décrits dans le point 2.3.1.

3.1. Points importants du procédé

3.1.1. Matières premières

Le procédé d'immobilisation de levures fait appel à 3 matières premières : alginate de sodium, levure et chlorure de calcium.

- Alginate de sodium

L'alginate de sodium est sans aucun doute la matière première qui a le plus grand impact dans le procédé d'immobilisation. L'alginate est un polymère naturel extrait des algues ; constitué par des monomères d'acide manuronique et guluronique.

Le choix de l'alginate comme matériel d'immobilisation est dû à sa capacité à former des gels en présence de cations divalents. La formation du gel dépend de la quantité et de la longueur des chaînes d'acide guluronique existant dans l'alginate. Plus le nombre et la longueur moyenne des chaînes d'acide guluronique sont élevés, plus fort sera le gel formé (Onsøien, 1997). Selon Martinsen et al. (1989b), les alginates présentant des teneurs plus élevées en acide guluronique forment des gels avec des pores de plus grand diamètre ; ils n'ont pas de réduction significative de taille pendant la gélification, contrairement à ce qu'il arrive avec les alginates à basse teneur d'acide guluronique. Aussi la relation manuronique/guluronique (M/G) est un des premiers paramètres à prendre en compte dans la sélection de l'alginate car ce rapport va conditionner non seulement la perméabilité aux substrats et aux métabolites mais aussi la résistance mécanique du produit final. Le fabricant d'alginates sélectionné pour ce travail a mis à notre disposition 3 références différentes d'alginate dont les caractéristiques techniques sont présentées dans le Tableau 3-1. Pour des questions de confidentialité, au cours de ce travail, on ne présentera pas les valeurs de viscosité réellement mesurées, mais des valeurs corrigées (sans unités) qui gardent un rapport constant avec les valeurs mesurées.

Tableau 3-1 – Caractéristiques des alginates utilisés dans le travail, d'après information du fabricant

Alginate	Force en gel	M/G	Viscosité (adimensionnalisée)
Alg1	Elevée	0,45	1,00
Alg2	Moyenne	0,60	0,19
Alg3	Faible	1,5	0,97

On vérifie que plus la quantité d'acide guluronique dans l'alginate (rapport M/G plus bas), est importante plus la force du gel est élevée.

La concentration à laquelle on utilise l'alginate dans les solutions de couche interne et externe est aussi un paramètre à prendre en compte. Si la concentration de l'alginate est faible les billes qui se forment sont facilement déformables et il y a un risque de relargage de cellules pendant l'immobilisation et ultérieurement pendant l'utilisation du produit. Si la concentration est élevée, des problèmes diffusionnels peuvent limiter l'arrivée d'éléments nutritifs et des substrats aux cellules (Idris et Suzana, 2006). D'autre part, la concentration des solutions d'alginate intervient aussi significativement dans la viscosité comme on peut le voir dans la Figure 3-1 :

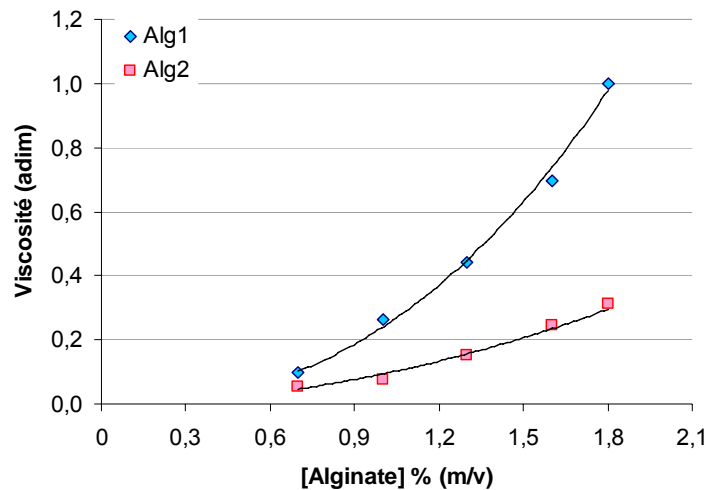


Figure 3-1 Viscosité en fonction de la concentration de solutions préparées à partir des références Alg1 et Alg2 (100 rpm, système 11, T=20°C).

On observe que plus la concentration d'alginate est forte, plus la viscosité de la solution est élevée. On vérifie aussi que pour la même concentration d'alginate de différentes références commerciales (Alg1 et Alg 2), les viscosités sont différentes, cette différence étant plus accentuée pour les concentrations les plus hautes. Il faut noter que pour des conditions bien définies, la mesure de la viscosité est un excellent paramètre de contrôle de la concentration.

Par exemple : après la dissolution de l'alginate à l'échelle industrielle, une mesure de viscosité trop élevée ou trop basse face à celle attendue, peut signifier une erreur dans la préparation des alginates soit dans le pesage de l'alginate, soit dans la quantité d'eau ajoutée au réservoir de dissolution.

Comme nous le verrons dans le point 3.1.2, la viscosité est une des propriétés rhéologiques majeure pour la formation correcte de billes et en conséquence pour le bon déroulement du procédé d'immobilisation. Ainsi la concentration de l'alginate doit aussi être choisie de manière à assurer que les valeurs de viscosité soient à l'intérieur de la gamme qui garantit la faisabilité du procédé de formation de gouttes.

Produit d'origine naturelle, la composition exacte des alginates change selon la récolte et, en conséquence, leurs propriétés rhéologiques aussi se modifient (Serp, 2002). Il faut ainsi s'attendre à ce que les lots produits à différentes périodes de l'année ou sur différentes années aient des viscosités différentes. La Figure 3-2 présente les viscosités de solutions à 1 %m/v de plusieurs lots d'alginate provenant de 3 fournisseurs différents, fabriqués entre 2008 et 2010.

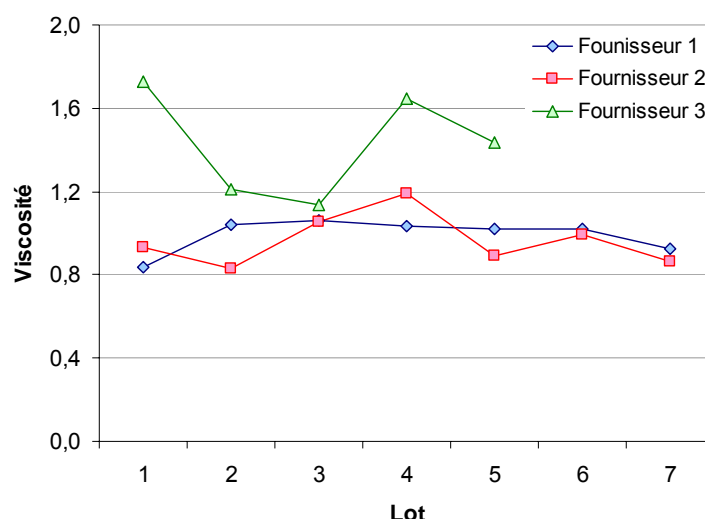


Figure 3-2 Viscosités de solutions d'alginate à 1% (m/v) préparées à partir de différents lots provenant de 3 fournisseurs différents.

On constate que le produit du fournisseur 3 présente de grandes variations de viscosité entre les lots, avec un écart type de 18 %. L'alginate du fournisseur 2 est plus constant dans la viscosité mais il a encore un écart type élevé de 13 %. Finalement le fournisseur 1 est celui qui réussit à être plus reproductible en ce qui concerne la viscosité des différents lots fournis avec un écart de seulement 8 %. Ces résultats prouvent que quelques producteurs réussissent à maintenir la viscosité sensiblement constante sur plusieurs lots, indépendamment du moment où l'alginate est fabriqué.

Quand on change de lot d'alginate, les fluctuations de viscosité, si elles sont faibles, peuvent être corrigées en ajustant les conditions opératoires du procédé industriel d'immobilisation. Néanmoins avec des variations comme celles observées par exemple dans l'alginate du

fournisseur 3 ces ajustements peuvent être insuffisants et la qualité des billes formées peut être sérieusement compromise, et dans une situation extrême la formation des billes peut être irréalisable. Il existe ainsi un point de plus à ajouter aux critères de sélection de l'alginate : la reproductibilité des lots de la part des fabricants.

En bref, la sélection de l'alginate doit être réalisée en fonction

- de la relation M/G,
- de la concentration à laquelle on désire travailler afin de maximiser la résistance mécanique et de minimiser la perte de cellules et les limitations diffusionnelles,
- de la viscosité de l'alginate pour la concentration de travail sélectionnée
- de la garantie de reproductibilité des lots de la part des fabricants.

Pour les applications de prise de mousse ou de désacidification biologique de moûts l'alginate utilisé est l'Alg1. Pour la fermentation en continu de moûts, on a opté pour l'utilisation d'un mélange d'Alg1 et d'Alg2.

- Levure

Les levures utilisées dans ce travail ont été produites conformément à ce qui est décrit dans le paragraphe 2.2. Le procédé de production utilisé permet d'avoir les levures sous la forme d'une crème avec une concentration proche de 170 g/L de matière sèche. En outre les levures sont dans un état physiologique qui leur permet de résister à l'immobilisation et au séchage, en présentant à la fin de ces opérations des viabilités supérieures à 98 % pour la QA23 et à 90 % pour la G2.

Un point du procédé qui mérite attention est le mélange de la levure avec l'alginate pour former la solution de couche interne. La crème de levure doit être mélangée avec l'alginate de manière à ce que, dans le réservoir de la couche interne (voir figure 2.4 (2)), la concentration de levure soit homogène. Pendant la période d'immobilisation la couche interne est maintenue en douce agitation de manière à maintenir les levures dans une suspension la plus homogène possible.

La concentration de levure dans la solution de couche interne varie entre 20,5 et 22,5 g matière sèche/L solution. La viabilité après le mélange est supérieure à 99 % pour la QA23 et supérieure à 95 % pour G2.

- Chlorure de calcium

Le chlorure de calcium est peut-être la matière première de laquelle on exige le moins pour le procédé d'immobilisation. Cependant sa sélection doit être soignée car ce sel existe dans le marché sous forme anhydre ou avec différents degrés d'hydratation. Le chlorure de calcium utilisé dans ce travail a été le dihydraté : $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, puisque l'anhydre est hautement hygroscopique et facilement instable.

Comme pour les alginates la sélection du fabricant est aussi importante. Pour certains, le produit fourni donne, après dissolution, des solutions turbides. Dans d'autres cas, le sel a tendance à s'agglomérer au cours du temps, rendant son maniement à l'échelle industrielle difficile.

3.1.2. Formation des gouttelettes

Le cœur du procédé d'immobilisation est sans aucun doute la formation de gouttes de forme sphérique idéalement du même diamètre et avec les couches interne et externe dûment différenciées. Comme on l'a déjà mentionné dans le point 2.3.1, c'est la mise en oeuvre d'une vibration sinusoïdale de fréquence optimale dans les buses bi-fluide qui induit la formation continue de gouttes sphériques de diamètre contrôlé.

- Théorie de la formation de gouttes

La formation de gouttes par application d'une vibration sinusoïdale est basée sur le phénomène de déstabilisation d'un jet de fluide en écoulement laminaire. Ce phénomène initialement a été étudié par Rayleigh en 1879 (Rayleigh, 1945), qui a développé une théorie pour expliquer la coupe de fluides newtoniens en négligeant la viscosité (analyse non visqueuse). Selon Rayleigh des perturbations axisymétriques dans des jets de liquide avec longueur d'onde (λ) supérieure à la circonférence du jet (πd_j) produisent une déstabilisation qui grandit exponentiellement et qui cause la coupe du jet, tel qu'il est présenté dans la Figure 3-3.

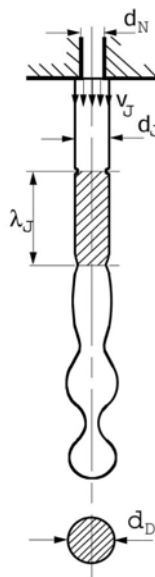


Figure 3-3 Vue schématique du coupe d'un jet laminaire subissant une perturbation axisymétrique (Brandenberger et al., 1999)

Pour des fluides non visqueux la longueur d'onde optimale (λ_{opt}) correspondant à la perturbation la plus efficace est donnée par la relation suivante:

$$\lambda_{opt} = \pi\sqrt{2}d_j \quad 3-1$$

où d_j est le diamètre du jet. En connaissant la longueur d'onde et la vitesse du jet (v_j) il est possible de déterminer la fréquence (f) par l'expression suivante :

$$f = \frac{v_j}{\lambda} \quad 3-2$$

En 1931, Weber a inclus dans cette analyse l'effet de la viscosité (η) (Brandenberger et al., 1999), ce qui conduit à la relation 3-3 :

$$\lambda_{opt} = \pi\sqrt{2}d_j \sqrt{1 + \frac{3\eta}{\sqrt{\rho\sigma d_j}}} \quad 3-3$$

ρ et σ sont respectivement la densité et la tension superficielle de l'alginate.

La relation 3-3 suggère que pour un diamètre de buse donné, la fréquence optimale pour produire des gouttes est dépendante des propriétés physico-chimiques du fluide et de son débit. À partir de cette relation il est possible de vérifier que l'augmentation de la viscosité conduit à une augmentation de la longueur d'onde optimale nécessaire pour déstabiliser une colonne de liquide et en conséquence la fréquence optimale diminue. La théorie proposée par Weber fournit une bonne base pour sélectionner les conditions de formation des gouttes. Pour l'application de cette théorie, le diamètre du jet (d_j) doit être déterminé expérimentalement; bien que quelques auteurs comme Schneider et Hendricks (1964) aient supposé que le diamètre du jet soit égal au diamètre de la buse. Brandenberger et Widmer (1998) ont montré que pour une solution d'alginate à 1,5% et des buses de 200 μ m, le diamètre du jet peut être exprimé en fonction du nombre de Weber par la suivante corrélation :

$$\frac{d_j}{d_n} = 4,33.We^{-0,337} \quad 3-4$$

Le nombre de Weber traduit le quotient entre les forces d'inertie et les forces de tension superficielle, en étant défini par :

$$We = \frac{v_n^2 \rho d_n}{\sigma} \quad 3-5$$

où v_n et d_n représentent respectivement la vitesse de l'alginate dans la buse et le diamètre de la buse.

Conformément à la relation 3-3, la longueur d'onde optimale est fonction de la viscosité de l'alginate entre autres paramètres. Pour des fluides non-newtonien avec des caractéristiques pseudo-plastiques la viscosité varie avec la vitesse de cisaillement. De ce fait, une valeur de viscosité mesurée avec un viscosimètre ne correspond pas nécessairement à la viscosité du fluide à l'intérieur de la buse. Il est ainsi nécessaire d'estimer la viscosité apparente de l'alginate

à l'intérieur de la buse dans les conditions d'opération du procédé, afin de pouvoir calculer la longueur d'onde optimale.

Pour cela, il est nécessaire de savoir que la rhéologie des alginates peut être décrite en utilisant le modèle d'Ostwald-de-Waele, aussi connu comme modèle *power law*. La relation 3-6 décrit le comportement des fluides qui suivent ce modèle :

$$\tau = K\gamma^n \quad 3-6$$

où K représente l'indice de consistance coulé et n l'indice de comportement. L'exposant n caractérise le degré de détour du comportement newtonien et est compris entre 0 et 1 pour les fluides pseudo-plastiques. Plus n est proche de 1 plus le comportement du fluide ressemble à celui d'un fluide newtonien.

En conjuguant 3-7

$$\eta = \frac{\tau}{\gamma} \quad 3-7$$

et 3-6 on obtient :

$$\eta = K\gamma^{(n-1)} \quad 3-8$$

K et n peuvent être déterminés expérimentalement pour une concentration donnée d'alginate, à partir des mesures de la viscosité et de la vitesse de cisaillement réalisée avec le viscosimètre.

La vitesse de cisaillement dans les buses peut être estimée en divisant la vitesse moyenne du liquide par la dimension caractéristique de la géométrie à travers laquelle le liquide est en train de couler qui, dans le cas de tuyaux ronds, est le rayon (Barnes et al., 1989).

Le diamètre des gouttes qui se forment quand le procédé opère à la longueur d'onde optimale peut être aussi estimée. Quand une perturbation axisymétrique et sinusoïdale, de fréquence optimale (f_{opt}) est imposée à une colonne de liquide, le cylindre de longueur L équivalente à la longueur d'onde optimale λ_{opt} , forme une goutte – voir figure Figure 3-4.

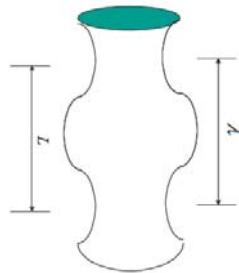


Figure 3-4 Représentation schématique d'une partie d'un jet de liquide où il est appliqué une vibration à f_{opt} qui conduit à ce que le cylindre de longueur L, qui est équivalente à λ_{opt} , forme une goutte.

Ainsi une goutte est produite chaque hertz et son diamètre peut être calculé à travers un bilan volumétrique. Soit $V_{cil} = \pi.r_j^2.L$ le volume d'une colonne cylindrique de rayon r_j et de longueur L et $V_{sph} = \frac{4}{3}\pi.r_{sph}^3$ le volume d'une sphère de rayon r_{sph} . La sphère et le cylindre de volume identique sont liés par la relation suivante :

$$\pi.r_j^2.L = \frac{4}{3}.\pi.r_{sph}^3 \quad \Rightarrow$$

$$d_{sph} = \sqrt[3]{1,5.d_j^2.\lambda_{opt}} \quad 3-9$$

Cette relation (Seifert et Phillips, 1997) exprime le diamètre d'une goutte en fonction de la longueur d'onde optimale et du diamètre du jet de liquide.

Selon Serp (2000) l'approche théorique qu'on vient de décrire fournit seulement la fréquence optimale pour la formation de gouttes, ce qui ne correspond pas nécessairement à la fréquence optimale pour la formation de billes en vue de l'application dans un procédé d'immobilisation. Ceci parce que si la fréquence calculée est très haute, les billes formées sont doubles, à cause du contact entre les gouttes qui sont en train de pénétrer dans la solution de gélification et les billes récemment formées dans cette même solution. D'autre part si la fréquence calculée est très basse on observe la formation de billes satellites, comme illustré dans la Figure 3-5.

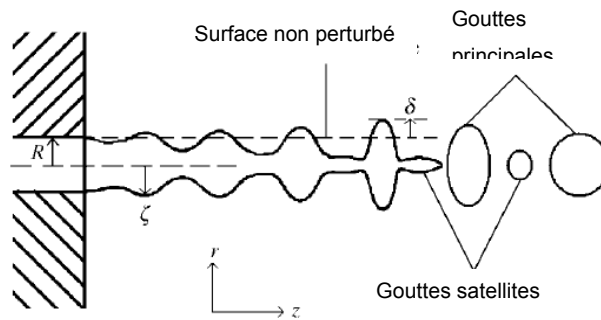


Figure 3-5 Formation de gouttes principales et de gouttes satellites par déstabilisation de la colonne liquide (Chuech et Yan, 2005)

La formation des gouttes satellites n'est pas envisagée dans la théorie linéaire de Rayleigh qui fournit seulement une bonne approche de la fréquence optimale pour de petites amplitudes. Avec l'augmentation de l'amplitude, les effets non linéaires deviennent plus importants et introduisent des écarts significatifs par rapport aux théories linéaires comme celle de Rayleigh. Pour décrire la formation des gouttes satellites des théories non linéaires se sont développées (Yuen, 1968 ; Eggers, 2005;) cependant la complexité des équations hydrodynamiques a limité pendant beaucoup d'années leur développement (Chuech et Yan, 2005). La complexité de ces théories dont la discussion dépasse l'objectif de ce travail, nous apportera cependant des

informations qualitatives notables. Il existe deux-points importants à retenir (Seifert et Phillips 1997) :

1. La dimension des gouttes satellites diminue avec l'augmentation de la longueur d'onde
2. Pour des viscosités élevées les filaments qui forment les gouttes satellites sont plus fins.

Aussi, selon Serp et al. (2000), les valeurs de fréquence calculées en faisant appel à la théorie de Weber sont une première approche du procédé d'immobilisation avec des fluides visqueux ; en fournissant des valeurs indicatives elles permettent d'initier une recherche empirique pour définir les conditions optimales de production de billes.

Cette brève introduction théorique au procédé de formation de gouttes permet de percevoir que plusieurs paramètres influençant le procédé existent (Heinzen et al., 2010) :

- Le diamètre des buses (d_n) - définit la gamme de diamètre des gouttes. Normalement les gouttes ont presque le double du diamètre des buses.
- La vitesse du fluide (v_n) - très basse mouille les buses, très haute induit la formation de gouttes satellites
- La viscosité, tension superficielle et densité - de ces trois paramètres la viscosité est celui qui a le plus grand impact dans la formation des gouttes. Plus la viscosité est haute, moins la fréquence nécessaire pour former des gouttes est grande.
- La fréquence - pour un diamètre de buses, un débit et des propriétés physiques du fluide donnés, il est possible de former des gouttes dans une gamme de fréquence de $\pm 20\%$ à $\pm 40\%$ de la valeur estimée par la théorie de Weber
- L'amplitude - bien que la théorie de Rayleigh ne tienne pas compte de l'amplitude de la vibration, ce paramètre intervient dans la formation correcte des gouttes. Plus la valeur de la viscosité est importante, plus l'amplitude appliquée pour déstabiliser la colonne de liquide doit être importante.

Les théories présentées jusqu'ici ont été développées pour estimer la formation de gouttes à partir de buses monofluide (avec seulement une couche). En réalité le procédé d'immobilisation utilisé dans ce travail fait appel à des buses bi-fluide. Les informations bibliographiques sur l'utilisation de buses bi-fluide sont rares. Berger (2001) a réalisé une étude sur les conditions opératoires optimales avec des buses bi-fluide, en utilisant une solution d'alginate à 4% dans la couche externe et de l'huile de tournesol dans la couche interne. Berger a créé une carte donnant les limites de débits des deux couches et les limites de fréquence à l'intérieur desquelles il est possible de former des billes de forme et de dimension définies et reproductibles. Ces limites définissent les surfaces hachurées dans la Figure 3-6.

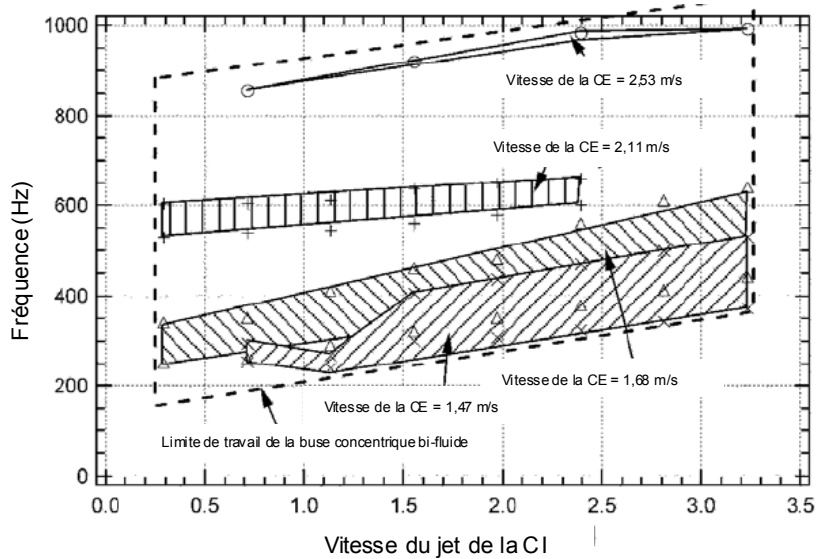


Figure 3-6 Limites d'opération pour une buse bi-fluide (Berger, 2001)

Berger a constaté que les variations dans le débit de la couche externe sont ce qui a le plus grand impact dans la formation des gouttes.

○ Évaluation des conditions de formation des gouttes

Dans cette partie du travail, on a évalué les conditions optimales pour la formation des billes double couche avec des buses de différents diamètres et en faisant varier le débit total et la relation couche interne/couche externe. L'alginate utilisé a été l'Alg1 à la concentration de 1,6 %. La couche interne contenait 22,5 g de levure (matière sèche) par litre d'alginate.

Le choix d'une fréquence de vibration de 93 Hz est issu des travaux préliminaires sur la formation des gouttelettes par stimulation vibratoire, réalisés dans le laboratoire de Proenol pendant l'année 2002. Ces résultats ont fait l'objet d'un rapport interne - Antunes et al., 2002 - disponible au près de la société Proenol.

Essai G10

Cet essai a pour but la sélection du débit optimal pour la formation de billes en maintenant constants les paramètres suivants :

- Diamètre buses $d_n = 1,0$ mm
- Relation de débits $Q_{CI}/Q_{CE} = 1,5$
- Fréquence vibration = 93 Hz
- $\eta_{CI} = 1,43$; $\eta_{CE} = 1,57$

Les critères d'évaluation de la qualité des billes ont été la sphéricité et le centrage de la couche interne. L'évaluation a été réalisée par observation visuelle à l'aide d'une loupe binoculaire.

Pour qualifier les billes formées deux classes ont été utilisées: Bonne ou Mauvaise qualité, selon que les billes sont aptes ou non pour intégrer un produit commercial. Le classement Bon implique une bonne sphéricité des billes formées avec la couche interne centrée dans la couche externe.

Le débit total Q_T a varié entre 5 et 10 kg/h/buse dans des accroissements non uniformes comme présenté dans le Tableau 3-2 .

Tableau 3-2 – Débit massique total et vitesses utilisés dans l'essai G10, évaluation de la qualité des billes formées.

Q_T (kg/h heure)	v_n (m/s)	Qualité billes	Commentaires
5,0	1,7	Mauvaise	Billes très allongées. Le faisceau ne se casse pas.
5,5	1,9	Mauvaise	Billes très allongées. Le faisceau ne se casse pas.
6,1	2,1	Bonne	Bonne séparation, billes rondes
7,5	2,6	Bonne	Bonne séparation, billes rondes
8,5	3,0	Mauvaise	Quelques billes avec la couche externe irrégulière.
9,2	3,2	Mauvaise	Quelques billes ovales et couche externe irrégulière
10,0	3,5	Mauvaise	Quelques billes ovales et couche externe très irrégulière

Dans la Figure 3-7 on présente des photographies des billes pour chacun des débits essayés.

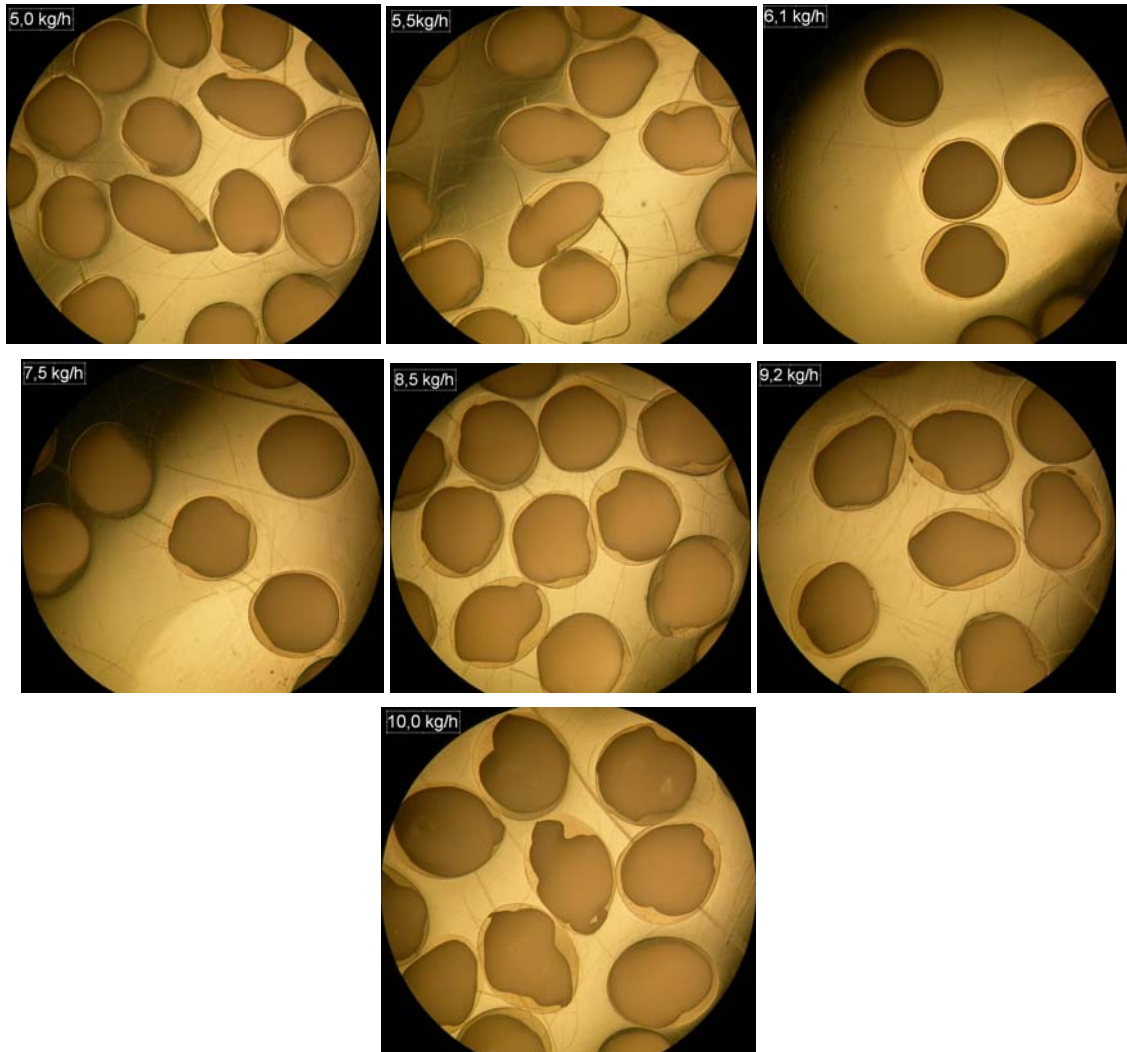


Figure 3-7 Photographies des billes produites dans l'essai G10 avec différents débits.

De l'analyse des photographies de la Figure 3-7, on constate que pour les conditions utilisées il est seulement possible de former des billes (avec la couche interne correctement centrée dans l'externe) pour des débits compris entre 6,1 et 7,5 kg/h. Avec le débit de 8,5 kg/h, les billes ne présentent plus une bonne sphéricité et la couche externe est irrégulière. Pour les débits de 5,0 et 5,5 kg/h, les billes sont très allongées et elles ne se séparent pas complètement les unes des autres, en gardant entre elles un fil d'alginate gélifié.

Bien que les images ne comportent pas d'échelle, le grossissement a été le même pour toutes les photographies ce qui permet de conclure qu'au fur et à mesure que le débit total augmente, la dimension des billes formées, comme attendu, augmente.

Essai G12

Dans cet essai, on a aussi cherché les conditions optimales pour la formation de billes mais cette fois avec des buses de plus grand diamètre (1,2 mm) et en faisant varier seulement le

débit de la couche externe (QCE) entre 2,5 et 5,5 kg/h. La variation du débit de la couche externe modifie le débit total et aussi la relation Q_{CI}/Q_{CE} qui lors de l'essai G10 était constante.

Les paramètres suivants ont été maintenus constants pendant l'essai :

- Diamètre buses $d_n = 1,2$ mm
- Fréquence vibration = 93 Hz
- $\eta_{CI} = 1,43$; $\eta_{CE} = 1,57$
- QCI = 3,7 kg/h

Il faut noter que les viscosités de l'alginate utilisé pour la couche interne et de celui utilisé pour la couche externe étaient égales à celle de l'essai G12. Le débit total Q_T a varié entre 6,1 et 9,2 kg/h/buse dans des accroissements non uniformes comme présenté dans le Tableau 3-3.

Tableau 3-3 – Débit, vitesse et relation de débits employés à l'essai G12, évaluation de la qualité des billes.

Q_T (kg/h)	v_n (m/s)	Q_{CI}/Q_{CE}	Qualité billes	Commentaires
6,1	1,5	1,5	Mauvaise	Billes très allongées. Le faisceau ne se casse pas.
6,7	1,6	1,2	Mauvaise	Billes très allongées. Le faisceau ne se casse pas.
7,4	1,8	1,0	Mauvaise	Billes très allongées. Le faisceau ne se casse pas.
7,9	1,9	0,9	Mauvaise	Billes très allongées. Le faisceau ne se casse pas.
8,6	2,1	0,75	Mauvaise	Billes très allongées.
9,2	2,2	0,67	Bonne	Bonne sphéricité, mais avec CI dans quelques cas presque dans la limite de l'externe.

Dans la Figure 3-8, on présente des photographies des billes pour chacun des débits essayés.

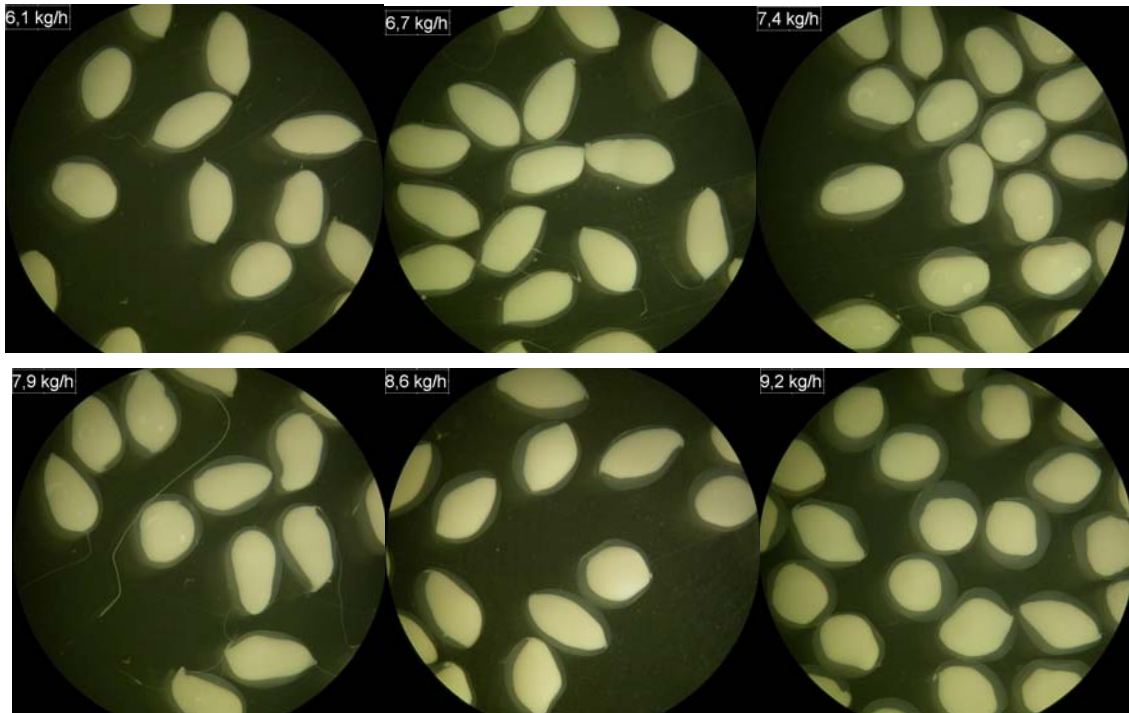


Figure 3-8 Photographies des billes obtenues avec de différents débits à l'essai G12.

Pour les buses de 1,2 mm de diamètre, la formation de billes de bonne qualité est seulement possible avec le débit de 9,2 kg/h. Une observation visuelle soignée montre qu'il existe quelques billes légèrement allongées, avec la couche interne qui touche presque la limite de la couche externe, ce qui place ces billes dans le seuil d'acceptation. Pour des débits inférieurs ou égaux à 8,6 kg/h on constate que les billes sont toutes allongées, et dans quelques cas la séparation des gouttes ne se réalise pas complètement, conduisant à la formation de billes allongées avec des fils les prolongeant. Cette situation peut éventuellement être minimisée en augmentant la distance entre les buses et la solution de gélification.

Le changement du diamètre des buses de l'essai G10 pour le G12, modifie les conditions optimales pour la formation de billes. Dans le procédé d'immobilisation développé, le *shaker* fonctionne seulement à la fréquence de 93 Hz, donc le paramètre qui est plus facile et rapide à manipuler est le débit. Ainsi celui-ci a été le paramètre modifié de sorte qu'on produise des billes de bonne qualité. Pour les buses de 1,0 mm de diamètre le débit optimal se situait entre 6,1 et 7,5 kg/h. Pour les buses de 1,2 mm le débit optimal se situait au minimum à 9,2 kg/h.

Dans le contexte de l'essai G10, on a évalué aussi l'influence de la relation Q_{CI}/Q_{CE} sur la qualité des billes formées. Pour cela, on maintient le débit total constant dans les 9,2 kg/h et on a modifié la relation des débits (Q_{CI}/Q_{CE}) entre 0,6 et 1,5.

Les photographies suivantes (Figure 3-9) montrent l'impact de ce changement sur les billes formées.

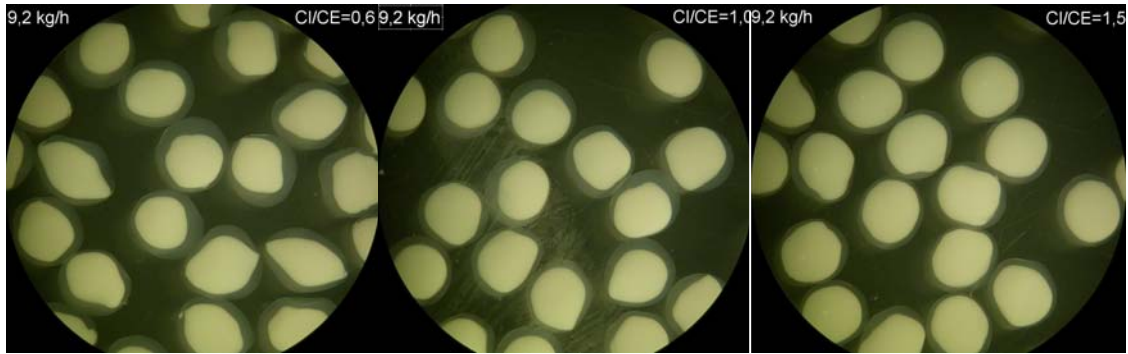


Figure 3-9 Photographies des billes obtenues pendant l'essai G12 avec un débit total 9,2 kg/h et en faisant varier la relation Q_{CI}/Q_{CE} entre 0,6 et 1,5.

Quand la relation Q_{CI}/Q_{CE} passe de 0,6 à 1,0, on observe que les billes sont plus sphériques et la couche interne est plus ronde mais encore légèrement excentrique. Quand on passe de 1,0 à 1,5, les billes gardent la forme sphérique et la couche interne devient plus centrée. Comme attendu, on observe une réduction de la couche externe et une augmentation de la couche interne. Cette expérience vient démontrer que la proportion des débits de couche interne et de couche externe a aussi une influence sur la qualité des billes formées, spécialement dans la façon dont la couche interne se distribue.

D'un point de vue d'application œnologique la relation $Q_{CI}/Q_{CE} = 1,5$ pourra avoir l'avantage d'introduire un plus grand nombre de cellules (pour un même nombre de billes) dans le procédé fermentaire comparativement avec les autres relations étudiées. Néanmoins, il n'est pas garanti que cette augmentation du nombre de cellules se traduise par une augmentation effective de la vitesse de fermentation. Il existe donc le risque que les cellules du centre de la bille soient l'objet de carences nutritionnelles dues à une augmentation des limitations diffusionnelles causées par l'augmentation du nombre de cellules à l'intérieur de la bille. D'autre part les cellules de la périphérie peuvent consommer les substrats en ne permettant pas qu'ils arrivent jusqu'au centre ou alors qu'ils arrivent en quantité insuffisante.

- Calcul de la fréquence optimale pour formation de gouttes

Pour estimer la fréquence optimale de formation des gouttes, on fait appel à la théorie de Rayleigh modifiée par Weber afin d'inclure l'effet de la viscosité (voir relation 3-3).

Pour calculer le diamètre du jet (d_j) une corrélation entre la raison d_j/d_n et le nombre de Weber a été établie expérimentalement. Pour cela, on a photographié pour différents débits, le jet d'une solution d'alginate à 1,6 %, immédiatement à la sortie des buses de 1,2 mm. Avec un programme de traitement d'image, on a mesuré le diamètre du jet. À titre d'exemple la photographie de la Figure 3-10 montre 3 jets à la sortie des buses.



Figure 3-10 Jets de solution d'alginate à la sortie de 3 buses de 1,2 mm de diamètre, avec un débit de 9,3 kg/h heure dans chaque buse.

Avec les mesures réalisées, il a été possible de créer le graphique de la Figure 3-11 qui corrèle d_j/d_n en fonction du nombre de Weber. Dans cette figure, on a aussi inclus la corrélation trouvée par Brandenberger et Widmer (1998).

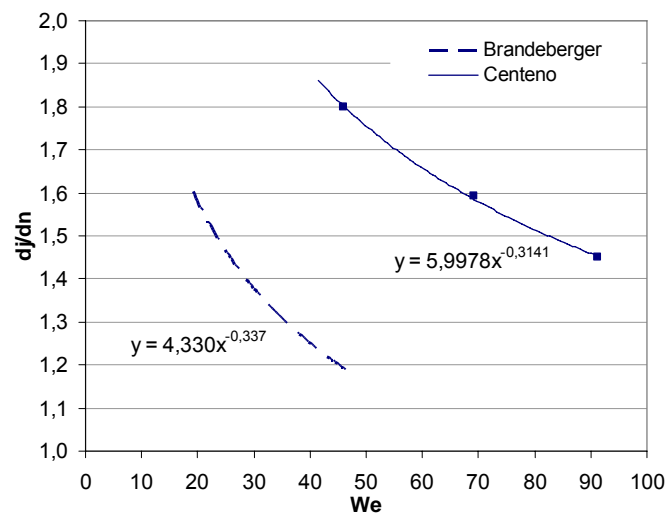


Figure 3-11 Corrélation entre le rapport du diamètre du jet à celui de la buse (d_j/d_n) et le nombre de Weber déterminé dans ce travail (—) et par Brandenberger (- - -).

On constate que la corrélation obtenue est légèrement différente de celle déterminée par Brandenberger et Widmer pour des buses de 200 μm de diamètre avec une solution d'alginate.

La viscosité de l'alginate a été déterminée en faisant appel à la relation 3-8. K et n ont été déterminés pour différentes concentrations d'alginate par mesure de la viscosité apparente et de la vitesse de cisaillement. La Figure 3-12 présente les valeurs de K et de n calculées.

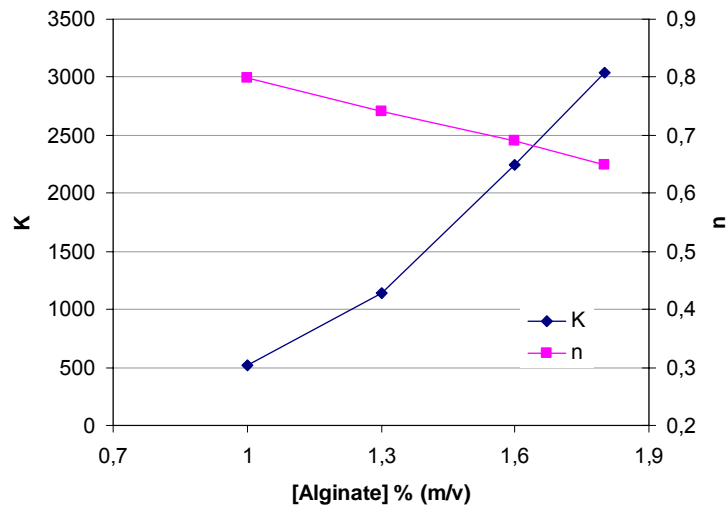


Figure 3-12 Valeurs de K et de n calculées pour des solutions avec différentes concentrations d'alginate (Alg 1).

À partir des données présentées et en utilisant les valeurs du procédé associées aux essais G10 et G12, il a été possible de calculer la fréquence optimale pour la formation de gouttes. Les graphiques de la Figure 3-13 présentent la fréquence optimale calculée pour la formation de gouttes avec des buses de 1,0 et de 1,2 mm, en fonction du débit massique d'alginate par buse. Les limites définies par les lignes fines autour de la ligne pointillée représentent une variation de $\pm 40\%$ autour de la fréquence optimale calculée. On a aussi représenté la fréquence et le débit utilisés dans les essais G10 et G12.

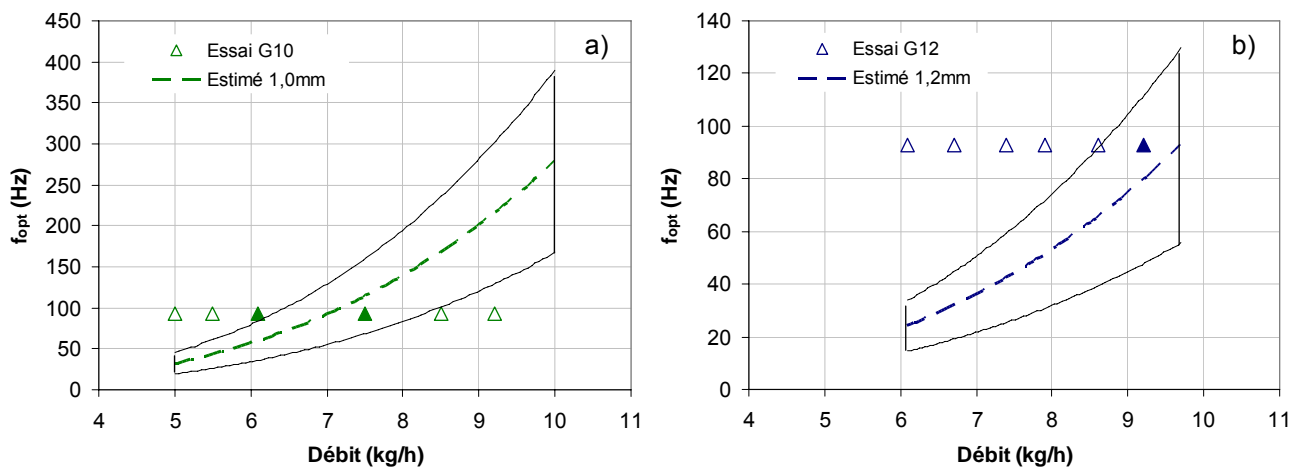


Figure 3-13 Fréquence optimale estimée pour la formation de billes en fonction du débit avec des buses de a) 1,0 mm et de b) de 1,2 mm en utilisant les conditions des essais G10 et G12, respectivement, avec variation de $\pm 40\%$ (lignes fines). Les points (\blacktriangle) et (\triangle) représentent la fréquence et le débit des essais G10 et G12 où la formation des billes a été respectivement bonne et mauvaise.

Les points où il a été possible de former des billes de bonne qualité sont proches des conditions de débit et de fréquence optimales mais ne coïncident pas exactement. On constate que c'est seulement pour les points de fonctionnement qui sont à l'intérieur des limites définies que l'on a produit des billes de bonne qualité. Ces résultats confirment les constatations de Heinzen et al. (2010), selon lesquelles il est possible de produire des billes dans un intervalle de $\pm 20\%$ à $\pm 40\%$ de la fréquence optimale estimée par les relations 3-2 et 3-3.

Ces résultats confirment que la théorie de Rayleigh modifiée par Weber est une bonne approche du procédé de formation de gouttes, et qu'elle peut être utilisée pour estimer les conditions opératoires optimales de formation de gouttes.

Il y a néanmoins un paramètre important qu'on n'a pas pris en compte dans les calculs mais qui a une grande influence dans le procédé de formation de gouttes ; c'est l'amplitude de la vibration. Par exemple, des viscosités élevées rendent difficile la formation des billes, en obligeant le *shaker* à travailler avec des amplitudes plus grandes. Néanmoins si l'amplitude nécessaire pour qu'on forme des gouttes est très grande le *shaker* travaille en effort et tend à chauffer, avec le risque d'être endommagé. En outre, des amplitudes élevées sont fréquemment accompagnées de formation de vibrations parasites qui nuisent à la formation de billes.

- Distribution de débit par les buses

Comme on l'a démontré, un des paramètres qui a une forte influence sur la qualité des billes formées est le débit d'alginate qui passe dans les buses, ainsi que la relation entre le débit de la couche interne et celui de la couche externe. Au point 2.3.1, il est rapporté que l'alginate de la couche interne et de la couche externe est distribué par les buses avec l'aide d'un diffuseur de débit, présenté dans la Figure 2-5 (1). Ce diffuseur est fondamental pour la distribution homogène du débit dans les différentes buses. Si la distribution n'est pas homogène, il y a le risque que quelques buses aient des débits trop élevés ou trop bas, en limitant ainsi la formation de billes de bonne qualité. Pour évaluer si la distribution de débits est effectivement homogène, on a mesuré en double, le débit en sortie de chaque buse du diffuseur de la couche interne et du diffuseur de la couche externe. Les résultats sont présentés dans les figures suivantes.

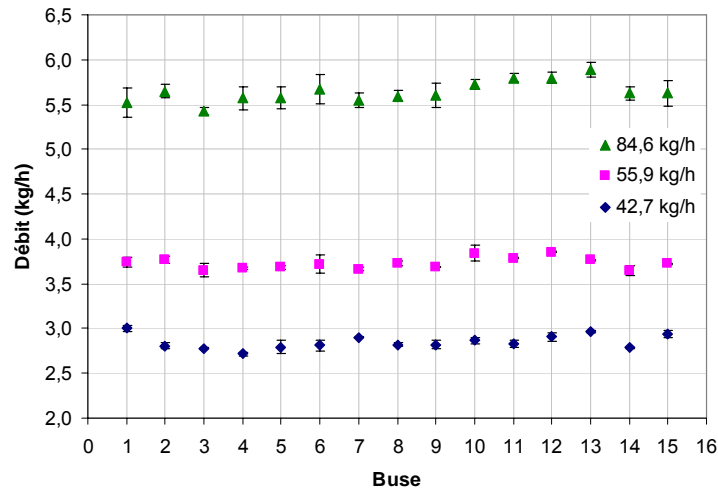


Figure 3-14 Distribution du débit par les 15 buses du diffuseur de la couche interne, pour différents débits totaux : 42,7 kg/h ; 55,9 kg/h et 84,6 kg/h.

Comme on peut le constater sur la Figure 3-14, il existe de petites variations de débit entre les différentes buses du collecteur de la couche interne mais ces variations ne dépassent pas 5% de la valeur du débit moyen.

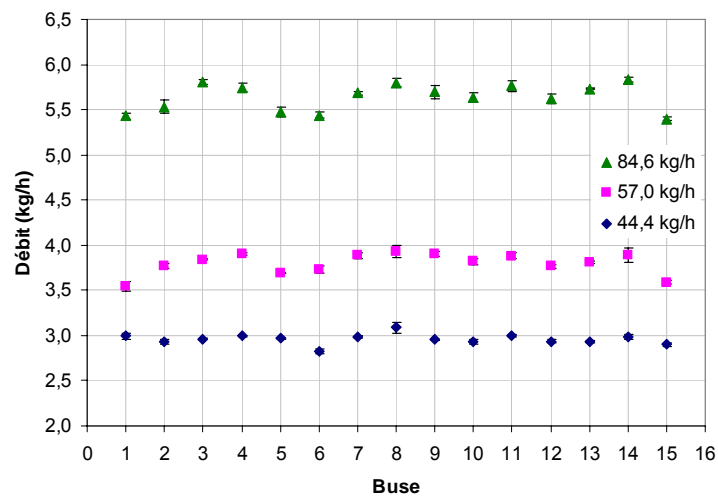


Figure 3-15 Distribution du débit par les 15 buses du diffuseur de la couche externe, pour différents débits totaux : 44,4 kg/h ; 57,0 kg/h et 84,6 kg/h.

Pour le diffuseur de la couche externe (Figure 3-15), la variation de débit entre les buses semble être plus importante que pour celui de la couche interne. En outre, cette variation est d'autant plus élevée que le débit augmente. L'écart par rapport au débit moyen dépasse les 5% seulement pour la situation où le débit total est 57 kg/h. Dans ce cas la variation peut être de 6,7%. On constate aussi que les buses 1, 6 et 15, présentent des débits systématiquement plus bas quand le débit total est de 57,0 kg/h et de 84,6 kg/h. Ces différences peuvent être dues à de petites variations dans la fabrication des buses. Ceci soulève une question qui est la

nécessité de définir des tolérances lors de la fabrication des buses de manière à ce que des différences entre ces dernières ne causent pas d'interférence dans le procédé.

Les variations de débit constatées peuvent aider à comprendre quelques phénomènes observés dans la formation des gouttes. Par exemple les buses 1 et 15 forment toujours des gouttes légèrement plus en bas que les autres.

Cette petite expérience a permis de valider la configuration et la géométrie du diffuseur. En ce qui concerne la fabrication des buses, il reste l'idée qu'elle peut être améliorée à travers la définition de tolérances.

3.1.3. Réaction de gélification

L'équipement utilisé pour la réaction de gélification a déjà été décrit en détail dans le point 2.3.3. L'alginate de sodium et le calcium sont les deux réactifs qui participent à la réaction de gélification. Pour compenser la consommation de calcium et la dilution due à la synérèse, on a utilisé un système qui mesure et contrôle la conductivité dans le réservoir de gélification. Ce système part du principe que la conductivité est directement proportionnelle à la concentration de calcium. Cette hypothèse a été confirmée expérimentalement comme illustré sur la Figure 3-16.

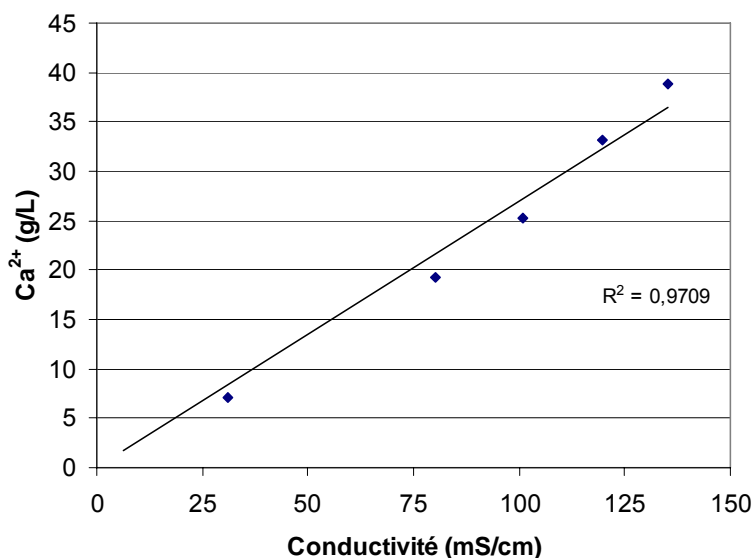


Figure 3-16 Conductivité d'une solution aqueuse de chlorure de calcium en fonction de la concentration de calcium.

Pendant le procédé d'immobilisation la conductivité est maintenue constante à 100 mS/cm ce qui correspond selon le graphique précédent Figure 3-16 à 26 g Ca^{2+} /L.

La fabrication d'un lot de levures immobilisées peut nécessiter environ 9 h. Pendant cette période il y a libération des ions Na^+ provenant de la solution d'alginate et qui sont substitués par des ions Ca^{2+} . Afin de connaître l'évolution des ions Na^+ et Ca^{2+} pendant les 9 h

d'immobilisation, on a rassemblé et analysé des échantillons de la solution de gélification, pris à différents temps. La Figure 3-17 montre l'évolution de ces deux ions pendant l'immobilisation.

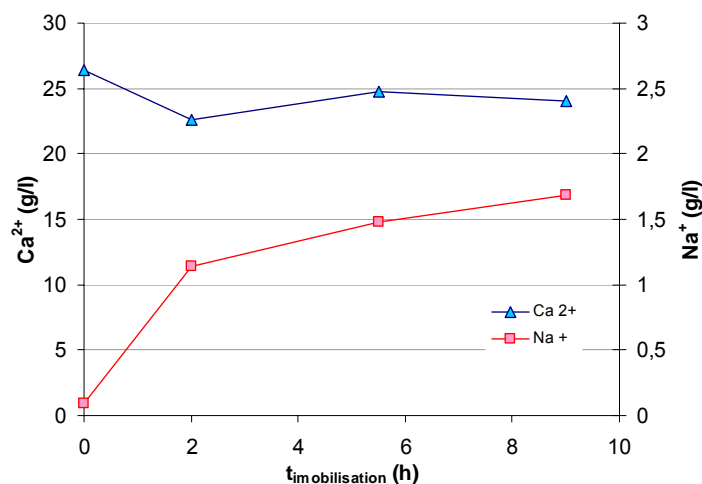


Figure 3-17 Évolution de la concentration des ions Na^+ et Ca^{2+} pendant le procédé d'immobilisation.

On observe que la concentration en calcium se maintient sensiblement constante pendant le procédé d'immobilisation avec des valeurs qui oscillent entre 22 et 25 g/L. La concentration en sodium augmente pendant le procédé en passant d'une valeur de l'ordre de 0,1 g/L au début à 1,6 g/L à la fin de l'immobilisation, ce qui montre qu'il existe une accumulation de sodium pendant l'immobilisation. Dans les deux premières heures, il y a une accumulation très rapide de sodium (0,52 g/L/h) dans le réservoir. Après ce moment, l'accumulation devient plus lente (0,07 g/L/h) jusqu'à la fin du procédé. À la fin, la concentration de sodium est 15 fois inférieure à celle du calcium. L'accumulation de sodium pourrait être préoccupante si les valeurs étaient du même ordre de grandeur de celles du calcium. Dans cette situation le sodium pourrait entrer en compétition avec le calcium pour la réaction de gélification, en empêchant que celle-ci se produise dans sa totalité et conduisant à la production de billes peu gélifiées et en conséquence moins résistantes d'un point de vue mécanique. À la limite cette éventuelle réduction de résistance pourrait permettre que pendant la seconde fermentation en bouteille les levures se multiplient et sortent de la bille.

3.1.4. Séchage

Le séchage est réalisé dans un séchoir en lit fluidisé comme décrit dans le point 2.3.1 La déshydratation est liée au transfert de l'eau des billes vers un courant d'air chaud. L'étape de séchage est un point important du procédé d'immobilisation, dans la mesure où elle exige un contrôle strict de la température du lit, surtout pour qu'elle ne dépasse pas la limite qui peut induire la mort des cellules. D'autre part, si la température est basse, le séchage est trop long et les coûts énergétiques associés au temps d'opération du ventilateur augmentent.

Avant la déshydratation, l'eau existant dans les billes représente environ 90 % de la masse des billes ($g_{\text{eau}}/g_{\text{échantillon humide}}$). À la fin du séchage les billes contiennent environ 11 à 13 % d'eau.

Le graphique de la Figure 3-18, qui représente l'humidité absolue des billes en fonction du temps de déshydratation, montre la courbe de séchage pour deux lots de levures immobilisées. L'humidité absolue des billes est calculée par rapport à la masse sèche par la relation suivante:

$$HA = \frac{m_w}{m_s}$$

où m_w représente la masse d'eau et m_s représente la masse de solide anhydre.

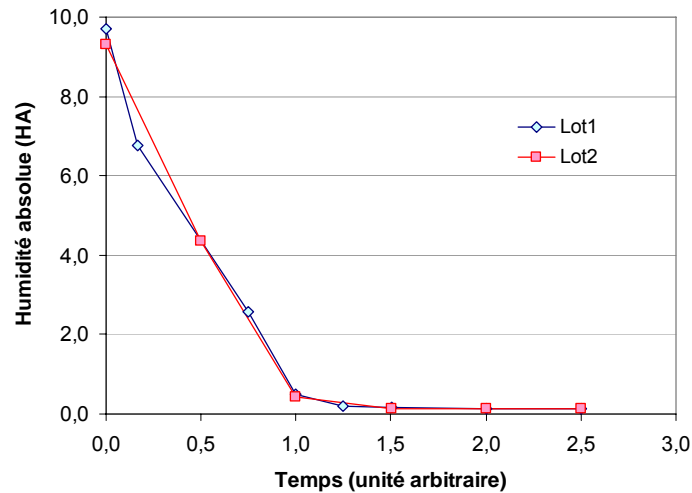


Figure 3-18 Courbe de séchage de deux lots de levures immobilisées

La courbe de séchage, montre que jusqu'au temps 1,0 la variation de l'humidité absolue en fonction du temps est linéaire. Cela veut dire que dans cette période la vitesse de déshydratation est constante. Ainsi la première partie du séchage est appelée séchage à vitesse constante. L'énergie fournie au système est utilisée pour évaporer l'eau libre qui se trouve à la surface des billes. Le graphique de la Figure 3-19 montre que la température de l'air à l'entrée est bien supérieure à la température du lit et néanmoins la température du lit augmente peu.

Une fois évaporée l'eau libre et donc la phase de séchage à vitesse constante finie, la variation de l'humidité absolue au cours du temps est substantiellement plus lente ($t > 1,0$). Le séchage entre dans une seconde phase dont les mécanismes sont complexes et dépendent de la diffusion de l'eau à travers les pores des billes et aussi de l'interaction des molécules d'eau avec l'alginate et avec les levures. Dans cette seconde phase, la température du solide est très proche de la température de l'air à l'entrée du séchoir, comme on le constate dans la Figure 3-19. Il faut noter qu'à la fin du séchage à vitesse constante la température d'entrée dans le séchoir est réduite pour éviter d'endommager les cellules.

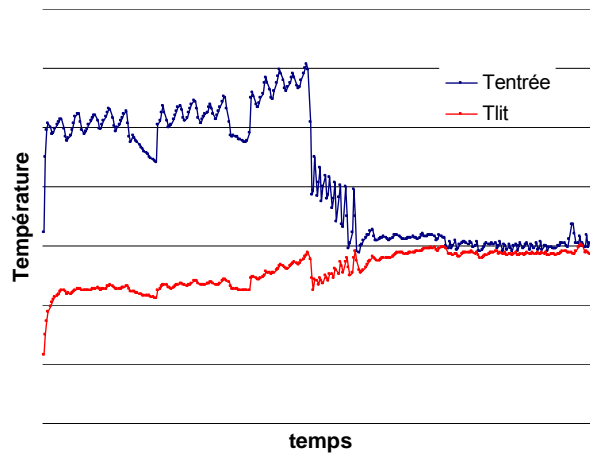


Figure 3-19 Évolution de la température du lit et de la température d'entrée au cours d'un séchage.

La Figure 3-20 montre l'aspect des billes avant et après le séchage.

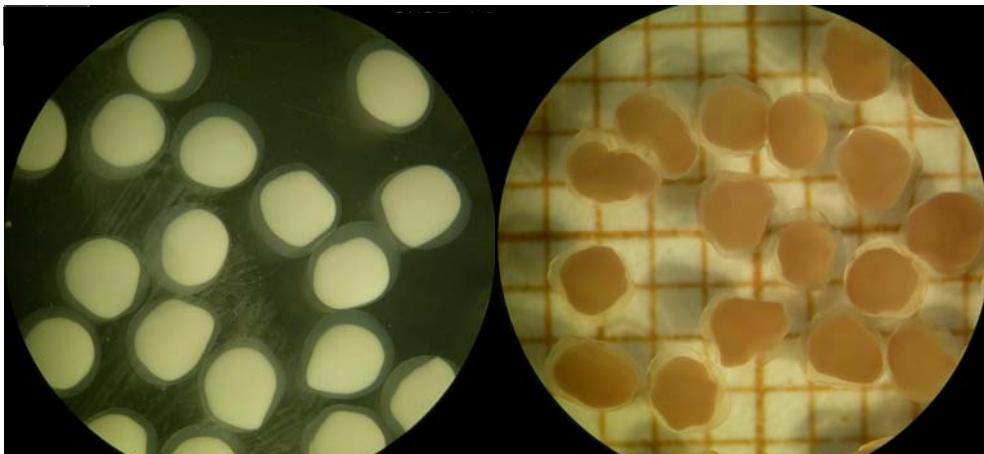


Figure 3-20 Aspect des billes avant et après le séchage observées dans la loupe binoculaire.

Ces essais nous amènent à conclure que les billes d'alginate avec des levures à l'intérieur ont des courbes de séchage classiques et identiques à ce qui est décrit dans la bibliographie (Strumillo et Kudra, 1986) pour d'autres matériels du secteur alimentaire.

3.2. Expérimentations d'immobilisation

A partir des informations présentées en 3.1, on a réalisé plusieurs essais d'immobilisation avec différentes conditions opératoires en utilisant les levures QA23 et G2. Les levures résultant de ces essais ont été testées dans des expériences de fermentation alcoolique et malo-alcoolique qui seront présentées dans les chapitres 4, 5 et 6. Le Tableau 3-4 résume les conditions de chacun des essais d'immobilisation. Chaque essai correspond à une formulation

d'immobilisation différente et aura son propre code afin d'être facilement identifiable pendant le travail.

Tableau 3-4 – Conditions opératoires des plusieurs essais d'immobilisation réalisés

Paramètre	Essai/Formulation				
	FES	FE1	FE2	FE3	FE4
Souche de levure	QA23	QA23	QA23	G2	QA23
Diam buses (mm)	1,2	1,2	1,0	1,2	1,5
Fréquence (Hz)	93	93	93	93	93
Référence de alginate	Alg1	Alg1	Alg1	Alg1	Alg1 + Alg2
Viscosité alginate CE	1,56	1,67	1,55	1,98	1,04
Viscosité alginate CI	1,42	1,46	1,42	1,87	0,74
Débit (kg/h/buse)	9,2	9,2	6,1	9,2	9,2
Q_{CI}/Q_{CE}	0,6	1,5	1,5	0,6	0,6
Conc. levures dans l'alginate ($g_{levures}/L$)	22,0	22,0	22,0	23,5	26,0
Conductivité sol. gélification (mS/cm)	105	105	105	105	105

L'essai FES sera considéré comme l'essai de référence. L'essai FE1 diffère du FES dans la relation des débits de la couche interne et de la couche externe (Q_{CI}/Q_{CE}). Il y a des légères modifications dans la viscosité et dans la concentration de levures d'un essai à l'autre mais elles sont dues à taille du procédé utilisé. En effet, on ne réussit pas à maintenir les viscosités rigoureusement égales d'un essai sur l'autre. De toutes façons, ces variations minimales n'ont pas d'impact ni sur le déroulement du procédé ni sur le produit final.

L'essai FE2 diffère du FE1 dans le diamètre des buses utilisées : 1,0 mm au lieu de 1,2 mm. Comme nous l'avons vu précédemment cette modification oblige à diminuer le débit dans les buses afin de maintenir la bonne qualité de gouttes formées.

Les levures encapsulées issues des essais FES, FE1 et FE2 ont été testées dans la production de vins effervescents.

L'essai FE3 diffère du FES par la levure utilisée qui a été la G2. La viscosité est légèrement supérieure à celle du FES mais cela est dû à l'utilisation d'un lot d'alginate différent qui avait

une viscosité supérieure. Néanmoins un tel fait a été considéré d'impact négligeable dans la qualité des billes formées.

Le produit avec la formulation FE3 a été utilisé pour réaliser la désacidification de moûts.

Finalement, on a réalisé l'essai FE4 qui diffère de l'essai des FES sur plusieurs points :

- on utilise un mélange de deux alginates (Alg1 et Alg2). Comme l'Alg 2 a une viscosité très basse, la viscosité du mélange diminue aussi.
- les levures sont mélangées à la couche externe et la couche interne est constituée seulement d'alginate
- Le rapport Q_{CI}/Q_{CE} passe de 0,6 à 1,5.
- La concentration de levures est augmentée à 26g/L.

Pendant la production, on a observé la formation de billes satellites qui ne représentent pas un problème majeur pour l'utilisation prévue du produit mais qui montrent que les conditions opératoires d'immobilisation pour cette formulation peuvent être optimisées.

Le produit de cet essai (FE4) est destiné à la fermentation alcoolique de moûts dans un fermenteur qui opère en continu.

Pour cette utilisation, il n'est pas requis de retenir les cellules dans les billes. Au contraire, il y a intérêt à ce que les levures se propagent dans le milieu liquide de sorte que la population dans la fermentation soit la plus élevée possible. Ainsi le passage des cellules dans la couche externe devient intéressant. De façon à obtenir un gel moins fort, on a changé pour un alginate avec moins d'acide guluronique. Cette modification permet que la propagation des cellules à l'intérieur des billes se fasse plus facilement lors de la mise en œuvre.

Le Tableau 3-5 présente les caractéristiques des levures immobilisées produites avec les différentes formulations.

Tableau 3-5 – Caractéristiques analytiques des levures immobilisées produites avec les différentes formulations (* AB - Activité biologique).

Paramètre	Essai/Formulation				
	FES	FE1	FE2	FE3	FE4
Souche de levure	QA23	QA23	QA23	G2	QA23
Nb billes/g	402	392	458	438	360
Humidité résiduelle (pour cent)	12,0	10,9	13,2	12,7	11,3
a_w	0,47	0,50	0,49	0,50	0,48
Cellules viables/bille ($\times 10^6$)	7,2	11,4	9,7	8,6	14,4
Cellules viables/g ($\times 10^9$)	2,9	4,5	4,4	3,9	5,2
Viabilité (pour cent)	99,7	98,5	99,0	98,0	99,8
AB* au T8 ($\text{g}_{\text{glucose}}/\text{L}$)	0,10	0,07	0,05	-	0,04
Levures de contamination (ufc/g)	<10	<10	<10	<10	-

Le comptage du nombre de billes par gramme permet d'avoir une idée de la dimension des billes en supposant que la densité ne soit pas trop modifiée. Ainsi plus le nombre des billes par gramme sera élevé, plus faible sera la dimension des billes.

Des résultats présentés ci-dessus, il ressort que, indépendamment de la formulation utilisée et de la souche de levure (QA23 ou G2), le procédé d'immobilisation développé permet de maintenir des taux de viabilité élevés (>98%). De plus, on constate que pour la souche QA23, l'activité biologique au T8 est toujours inférieure à $0,13 \text{ g}_{\text{glucose}}/\text{L}$, ce qui prouve que la levure est métaboliquement active et capable de réaliser la FA. On observe aussi que les comptages des levures libres ont donné toujours des résultats inférieurs à 10 ufc/g. Cette valeur est très satisfaisante et tranquillisante pour les utilisations qui ne tolèrent pas de levures contaminantes comme c'est le cas de la seconde fermentation en bouteille (vins effervescents méthode traditionnelle).

Comparaison FES - FE1

L'augmentation de la relation $Q_{\text{CI}}/Q_{\text{CE}}$ s'est traduite par une augmentation du pourcentage de couche interne dans les billes conformes. L'augmentation de cellules observée dans la couche interne est conforme à ce que l'on attendait. En ce qui concerne les autres paramètres, on n'observe pas des différences significatives.

Comparaison FES - FE2

On observe que la principale différence entre les levures immobilisées résultant de ces deux formulations est dans le nombre de billes par gramme, supérieur dans la FE2. Ceci veut dire que les billes de la FE2 sont plus petites. Ceci est dû à la différence dans le diamètre des buses utilisées : 1,2 mm dans la FES et 1,0 mm dans la FE2. La diminution du diamètre des buses a obligé à réduire le débit de la formulation FE2. En conséquence, la dimension des billes formées diminue ce qui est confirmé par les résultats.

Comparaison FES - FE3

Dans des termes d'immobilisation ces deux formulations diffèrent dans la levure utilisée. Les données analytiques montrent que les résultats sont très semblables.

Comparaison FES - FE4

Les deux formulations sont très différentes et donc les caractéristiques du produit final sont aussi distinctes. Néanmoins il faut ressortir que l'augmentation du diamètre des buses de 1,2 à 1,5 mm, conduit à la formation de billes de plus grand diamètre, bien que le débit total n'ait pas été modifié. Le fait d'avoir augmenté la concentration de cellules dans l'alginate conjointement avec l'augmentation de la relation Q_{CI}/Q_{CE} a conduit à une multiplication par deux de la population cellulaire par bille.

Ces expériences ont permis de démontrer que la modification de quelques paramètres opératoires comme le diamètre des buses ou la relation des débits entre la couche interne et la couche externe a un impact prévisible dans les caractéristiques des levures immobilisées sèches. En outre la formulation FE4 a mis en évidence l'importance d'estimer préalablement les conditions opératoires optimales pour la formation des billes et d'approcher de ces valeurs pendant la production. Autrement on peut arriver à ce qui s'est vérifié dans cet essai ou il y a eu la formation de gouttes satellites.

3.3. Reproductibilité du procédé d'immobilisation

La reproductibilité du procédé d'immobilisation est une condition indispensable pour que les levures immobilisées puissent avoir du succès comme produit commercial. En vérité c'est un point clé sur lequel est basée la confiance des utilisateurs.

Il y a déjà quelques années que la formulation FES a été utilisée dans la production industrielle de levures immobilisées. Les graphiques de la Figure 3-21 présentent l'évolution de quelques paramètres analytiques dans la période comprise entre les années 2007 et 2010. Chaque point est la moyenne d'un minimum de 100 lots fabriqués selon la formulation FES. L'écart type a été calculé avec un intervalle de confiance de 95%.

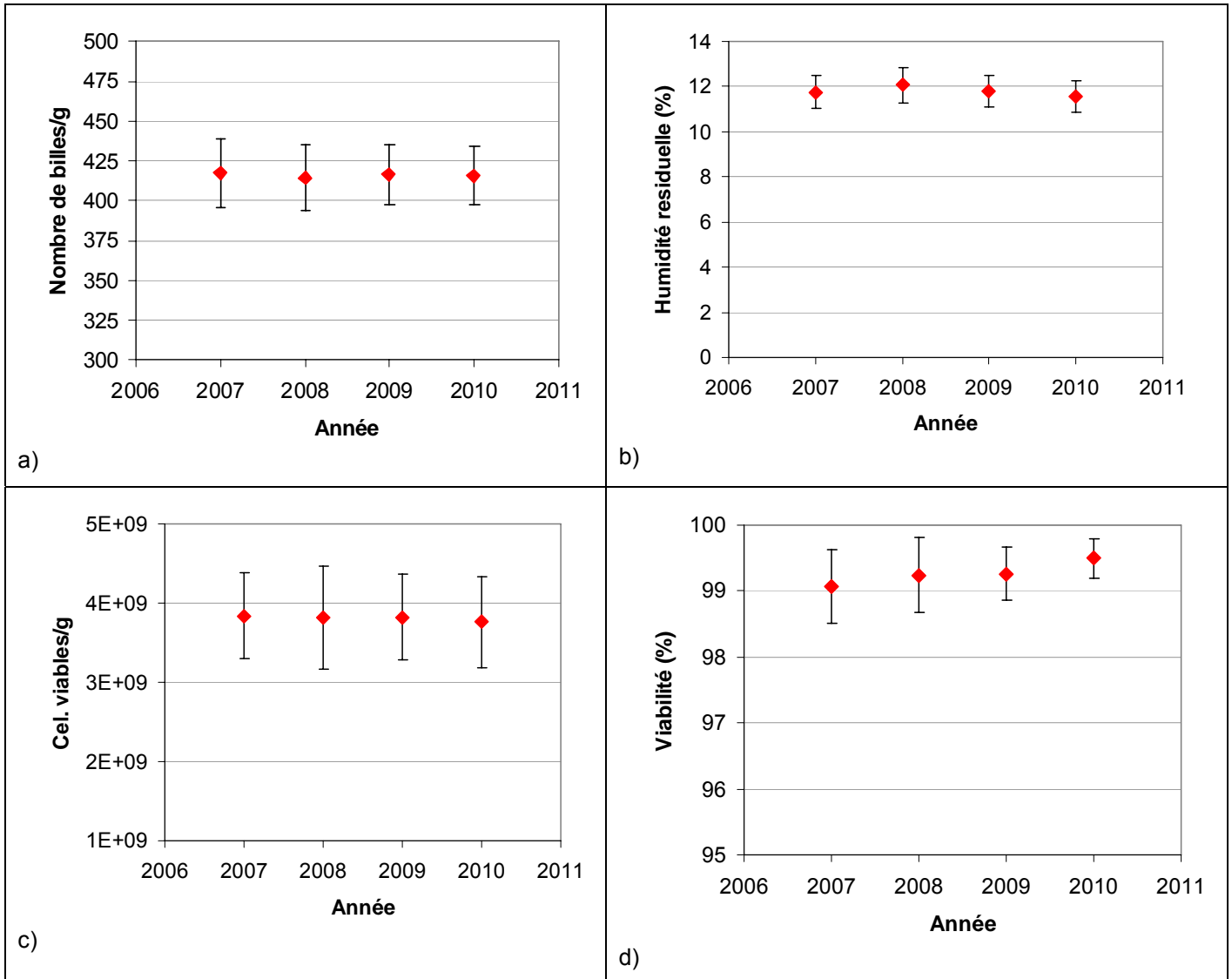


Figure 3-21 Évolution de la moyenne : a) du nombre de billes/g ; b) de la humidité résiduelle ; c) des cellules viables/g et d) de la viabilité de lots produits dans les années de 2007 à 2010. La formulation utilisée a été la FES et chaque point est au minimum la moyenne de 100 lots différents.

On constate qu'au cours de ces 4 années étudiées, les différents paramètres ont maintenu une valeur moyenne sensiblement constante, ainsi que l'écart type. La viabilité a augmenté de 99,1 % à 99,5% et son écart type a baissé légèrement, néanmoins nous pensons qu'une telle différence est très petite et que donc elle ne traduit pas une amélioration effective de l'état des levures. Un paramètre important et qui n'est pas représenté graphiquement, est l'activité biologique aux T8. La valeur de ce paramètre a été toujours égale $0,08 \pm 0,03 \text{ g}_{\text{glucose}}/\text{L}$. Il est ainsi prouvé que le procédé d'immobilisation développé est parfaitement reproductible pour les aspects analysés.

3.4. Conclusion

Dans ce chapitre nous avons présenté le *modus operandi* adopté pour réaliser la mise au point d'un procédé industriel de production de levures immobilisées en alginate de calcium.

La théorie linéaire de formation de gouttes proposée par Rayleigh et ultérieurement modifiée par Weber s'est montrée un outil approprié pour estimer les conditions opératoires de formation de gouttes, en vue de l'immobilisation de cellules de levure en alginate de calcium. Étant donné que la prévision obtenue est seulement une orientation et ne tient pas compte de phénomènes comme la formation de gouttes satellites, il faut toujours une recherche complémentaire, empirique, pour trouver les conditions exactes. Cela ne met pas en cause la valeur des estimations obtenues.

L'utilisation de buses bi-fluide a permis de produire des billes avec deux couches distinctes, facilement identifiables par observation à la loupe. La modification de la relation entre les débits respectifs des deux couches (Q_{CE}/Q_{CI}) permet de modifier l'épaisseur de chacune d'elles dans les billes. Nous avons aussi montré que le rapport entre les débits des deux couches a une influence sur la qualité des billes formées.

Pour que la formation de gouttes puisse être réalisée dans des quantités industrielles nous avons mis au point un distributeur qui assure sensiblement le même débit à chaque buse bi-fluide. La configuration et la géométrie de ce distributeur ont été validées. Néanmoins, pour sa fabrication, qui est sous traitée, il sera nécessaire de définir les tolérances acceptables.

Nous avons aussi discuté l'influence des matières premières dans le processus d'immobilisation. Malgré que sa qualité et son état physiologique soient fondamentaux pour son utilisation ultérieure, la levure n'a pas, en elle-même, un impact significatif dans le processus d'immobilisation. L'alginate, au contraire, est la matière première qui a le plus grand impact dans le processus d'immobilisation. Son choix doit être soigné car il doit réunir des propriétés physiques adaptées non seulement à l'immobilisation mais aussi à l'utilisation future des cellules immobilisées. Sur un plan très pratique, nous avons aussi montré que le choix du fabricant est important, surtout en ce qui concerne la viscosité de l'alginate, mais également au regard de la reproductibilité des lots.

Nous avons aussi vérifié que le système de contrôle de la concentration en calcium par la mesure de la conductivité de la solution de gélification est capable de maintenir cette concentration sensiblement constante durant un cycle de production.

Enfin, l'analyse de la courbe de séchage a montré que la déshydratation des billes est un processus qui se déroule en deux phases ; la première, appelée séchage à vitesse constante, est contrôlée par des phénomènes thermiques tandis que la suivante est contrôlée essentiellement par des mécanismes de diffusion. Pendant cette étape, l'aspect des billes est substantiellement modifié. En fonction de l'alginate utilisé et de la nature du milieu de réhydratation, les billes pourront reprendre ou non leur forme initiale.

En définitive, quatre paramètres principaux du procédé d'immobilisation et de séchage ont été définis et leur impact analysé. Un procédé industriel de fabrication de levures immobilisées, parfaitement reproductible, a été mis au point.

DEUXIEME PARTIE

MISE EN ŒUVRE EN ŒNOLOGIE

PRISE DE MOUSSE

4. Prise de mousse

4.1. Bibliographie

4.1.1. Généralités sur la « prise de mousse »

La production de vins effervescents comprend deux phases distinctes :

1. l'élaboration du vin tranquille qui peut être blanc, rosé ou rouge et qui s'appelle le vin base.
2. la refermentation de ce vin tranquille dans un récipient fermé, qui peut être une bouteille ou une cuve. Le récipient étant clos, cette fermentation est accompagnée d'une augmentation de la pression.

Pour la seconde phase, il existe donc plusieurs méthodes distinctes pour transformer le vin de base en vin effervescent (Hardy, 2003).

Les méthodes de fermentation en bouteille, malgré de petites différences, possèdent un tronc commun qui suppose :

- Addition de sucre, levures et adjuvants de remuage au vin base. Dans la méthode ancestrale le sucre vient du vin de base, dont la fermentation a été interrompue.
- Fermentation en bouteille, désignée couramment par prise de mousse, qui entraîne la consommation des sucres et la production d'éthanol, de dioxyde de carbone et la formation d'un dépôt de levure.
- Elevage en bouteille : 9 ou 15 mois selon la méthode
- Rassemblement du dépôt dans le col de la bouteille. Cette étape est appelée clarification ou remuage. Le temps nécessaire pour y parvenir est variable selon la technologie et les connaissances de chaque producteur et peut varier entre 48 h comme l'annonce Freixenet et jusqu'à 6 semaines selon Divies et Cachon (2005).
- Le dépôt est enlevé du col de la bouteille après sa congélation. Quand la bouteille est ouverte, le dépôt congelé est poussé dehors grâce à la surpression existante à l'intérieur de la bouteille. Cette étape est appelée dégorgement.
- Addition de la liqueur d'expédition
- Bouchage, museletage et habillage

La production de dioxyde de carbone entraîne une surpression à l'intérieur de la bouteille, qui dépend du sucre initialement ajouté au vin de base, mais qui normalement va jusqu'à 5 à 6 bars.

Les méthodes de production de vin effervescent en cuve peuvent être discontinues (méthode Cuve Close) ou continue (méthode Russe).

Dans la méthode cuve close, la cuve fonctionne comme une bouteille géante, dans laquelle on apporte le vin de base, le sucre et les levures. Normalement la fermentation s'écoule à la température de 20°C et elle ne dure pas plus de 10 jours. Une fois la fermentation finie, le vin est refroidi jusqu'à -2°C et est filtré à basse température puis dirigé vers une cuve tampon jusqu'au moment de l'embouteillage (Hardy, 2003). Bien sur ces opérations ont lieu sous une contre pression de gaz carbonique. Cette méthode est très utilisée en Italie et en Allemagne, ainsi qu'aux États-Unis d'Amérique.

Dans la méthode continue, le vin et son complément en sucre et en levures alimentent une série de cuves où se fait la fermentation. À l'intérieur des cuves, on met des anneaux, faits de divers matériaux comme la porcelaine, le polyéthylène, les copeaux de chêne sur lesquels les levures se fixent et réalisent la fermentation. Cette méthode est un exemple de l'utilisation de cellules immobilisées par adsorption sur un support. La méthode continue a été utilisée pendant plusieurs années par une société portugaise d'Azeitão, mais a été retirée du service récemment. Au-delà des avantages associés à la fermentation alcoolique en continu, le système avait l'avantage de produire des vins avec des arômes normalement associés à un contact prolongé avec les lies (Kunkee et Bisson, 1993), c'est-à-dire des arômes typiquement associés à l'autolyse des levures. Comme le vin est en contact avec des cellules de différents âges et dans différents états physiologiques, les processus qui normalement ont lieu en bouteille se produisent finalement (Martynenko et Gracheva, 2003), notamment l'autolyse de levures.

4.1.2. Applications des levures immobilisées à la prise de mousse en bouteille

L'utilisation de levures immobilisées pour la seconde fermentation en bouteille de vins effervescents a été évaluée par plusieurs auteurs (Da Silva et al., 2007 ; Yokotsuka et al., 1997 ; Lemonnier, 1992 ; Godia et al., 1991 ; Divies et al., 1988 ; Fumi et al., 1988). Les avantages que la technologie d'immobilisation de levures peut apporter aux producteurs de vins effervescents sont essentiellement les suivants:

- Réduction du temps et des coûts de production grâce à la suppression du remuage
- Inoculation directe des levures ; il n'est plus nécessaire de préparer les fastidieux pieds-de-cuve
- Meilleure gestion de l'espace en cave : le flux des bouteilles est considérablement réduit et les équipements de remuage deviennent superflus
- Plus grande flexibilité de production, car la suppression du remuage permet une réponse rapide à des commandes non prévues.

Différentes méthodes ont été proposées pour l'immobilisation de levures pour la réalisation de la seconde fermentation en bouteille, notamment par inclusion (Da Silva et al., 2007 ; Yokotsuka et al., 1997 ; Godia et al., 1991 ; Divies et al., 1988 ; Fumi et al., 1988) et par emprisonnement physique grâce à des membranes (Lemonnier, 1992 ; Spooner, 1973)

Divies et Cachon (2005) ont reporté qu'en faisant appel à l'immobilisation dans des membranes le temps nécessaire pour conclure une fermentation en bouteille est le double de celui nécessaire avec les levures libres, en partant de la même population initiale de levures. Dans cette méthode, le paramètre critique est le transfert de masse qui modifie la vitesse de réaction en raison de l'augmentation du nombre de cellules à l'intérieur de la membrane qui à son tour modifie les coefficients de diffusion. Des essais menés par Lemonnier et Duteurtre (1989) avec des levures immobilisées en membranes (cartouche Millispark) font état des conclusions suivantes :

- les prises de mousses sont complètes mais sont plus lentes avec le Millispark qu'en levures libres, vraisemblablement par des raisons diffusionnelles
- les vins obtenus ne présentent pas de différences analytiques
- lors de la dégustation par un jury entraîné, il n'a pas été mis en évidence de différences significatives, et il a été noté dans plusieurs cas un effet positif du Millispark sur la qualité de la mousse.

Malgré ces résultats positifs et encourageants, la technologie des levures immobilisées en membranes ne s'est pas développée dans l'industrie des vins effervescents, ceci probablement en raison du coût élevé des membranes et de l'équipement nécessaire pour la mise en œuvre.

La méthode privilégiée pour l'immobilisation de levures en vue de la production de vins effervescents en bouteille est l'inclusion dans un gel d'alginate. Godia et al. (1991) et Yokotsuka et al (1997) ont réalisé des essais avec des cellules immobilisées dans des billes de gel d'alginate avec et sans capsule extérieure. Les deux ont conclu que la couche extérieure d'alginate est fondamentale pour restreindre la propagation de cellules dans le vin. Godia et al. ont confirmé l'absence de cellules par mesure de la turbidité et aussi par comptage en boîte de Pétri. Néanmoins Yokotsuka et al. (1997) ont détecté dans leurs essais la présence de cellules dans le vin à des niveaux de l'ordre de 10^2 à 10^3 cel/mL mais sans que cela ne cause de turbidité détectable visuellement. Par observation au microscope Godia et al. (1991) ont constaté une croissance significative de cellules à la frontière entre la couche interne et la couche externe. D'une part cette observation confirme que la couche extérieure retient effectivement les cellules mais d'autre part elle prouve qu'il existe une croissance non homogène des levures à l'intérieur de la bille et que celles qui sont les plus proches de la périphérie, avec un accès facilité aux éléments nutritifs se multiplient préférentiellement. Cette croissance hétérogène traduit probablement des limitations au transfert de masse vers l'intérieur de la bille. Ces deux auteurs ont aussi conclu que plus la quantité de cellules ajoutées par bouteille est élevée, plus le nombre de cellules qui se propagent dans le vin est faible.

Fumi et al. (1988) ont comparé la cinétique de fermentation de levures libres et celle de levures immobilisées par mesure de la pression de dioxyde de carbone formé au cours du temps. Ils ont constaté qu'il n'a pas y eu de changements significatifs dans le processus et que les cinétiques avec des levures libres ou immobilisées sont semblables. D'autre part Divies et Cachon (2005) ont reporté que des ajustements dans le nombre de billes ajoutées à chaque

bouteille (dose) et des ajustements dans la dimension des billes permettent de réduire le temps de fermentation de moitié. La quantité de billes par bouteille joue un rôle technique important car elle permet d'ajuster les temps de fermentation en donnant à l'œnologue l'assurance d'une fermentation sure mais, en même temps la quantité doit être raisonnée en fonction des coûts. Bien sur, des quantités plus élevées confèrent sécurité et rapidité à la fermentation mais elles font aussi monter les coûts d'utilisation.

Colagrande et Fumi (1989) ont constaté que la présence de constituants structuraux de l'alginate dans le vin était négligeable pour des quantités de billes humides inférieures à 14 g/bouteille. Les mêmes auteurs ont aussi constaté que l'immobilisation provoque un enrichissement des cellules en acides nucléiques, en polysaccharides structuraux (mannanes et glucanes) et de réserve (tréhalose et glycogène). Ces variations par rapport aux cellules libres sont un indice d'un métabolisme modifié. Contrairement à ce qu'on pouvait supposer, la présence d'une quantité plus élevée de polysaccharides dans les cellules immobilisées n'a pas influencé la teneur en polysaccharides du vin mousseux en fin de fermentation.

Martynenko et Gracheva (2003) mentionnent des travaux qui prouvaient qu'une fois la fermentation finie, les levures immobilisées perdaient 100% de leur viabilité plus rapidement que les levures libres (6 mois pour les levures immobilisées contre 9 à 12 mois pour les cellules libres). Après une année et demie de contact avec les lies, le vin produit avec les levures immobilisées avait une teneur plus élevée en acides aminés probablement en raison d'une autolyse précoce. Aussi, Colagrande et Fumi (1989) ont observé que 12 mois après le tirage, il y avait une différence au niveau des acides aminés et des composés volatils mais les auteurs ne précisaient pas dans quel sens était la différence observée. Plus tard, Yokotsuka et al. (1997) constatent que 21 mois après le tirage, les acides aminés totaux dans le vin étaient très semblables tant pour les fermentations avec les levures libres que pour celles avec les immobilisées.

Pour évaluer la qualité sensorielle des vins produits avec des levures immobilisées dans de l'alginate de calcium plusieurs auteurs (Tataridis et al., 2005 ; Yokotsuka et al., 1997; Colagrande et Fumi, 1989 ; Fumi et al., 1988) ont réalisé des dégustations avec des vins effervescents produits avec cette technologie. Tous ont conclu que d'un point de vue sensoriel les vins étaient semblables à ceux produits avec les levures libres. Malheureusement il n'existe pas d'informations disponibles sur l'évolution du profil sensoriel des vins au cours du temps. Du point de vue physico-chimique, il y a aussi très peu d'informations sur l'évolution des vins produits avec les levures immobilisées après 2 ou 3 ans.

Il est important de remarquer que la totalité des travaux mentionnés pour la seconde fermentation en bouteille portent sur des levures immobilisées dans des gels d'alginate non déshydratés. Selon Divies et Cachon (2005) les plus grands problèmes pour généraliser cette technologie sont liés aux temps de conservation courts (10 à 15 jours à 4°C) des levures non déshydratées et à l'investissement nécessaire pour développer l'équipement pour doser les levures dans le vin.

Précédemment, on a vu que le séchage modifie les propriétés de la matrice d'alginate (réduction de la porosité) et aussi des cellules. L'utilisation d'alginate avec une haute teneur d'acide guluronique conduit à ce que les billes, une fois réhydratées dans le vin, ne récupèrent pas la forme qu'elles avaient avant le séchage. Et même les cellules ne seront pas dans le même état physiologique. Tous les essais relatés dans la bibliographie font référence à l'utilisation de levures immobilisées humides, avec des temps de vie forcément courts. On peut alors affirmer, que pour le passage à l'échelle industrielle, il reste à valider une importante étape associée à une des restrictions mentionnées dans la bibliographie du chapitre 1 : c'est la stabilité microbiologique (conservation). En outre le transport de levures humides est nettement plus coûteux vu qu'on paye le transport d'eau. Il est aussi important d'avoir présent à l'esprit que, en raison des modifications physiologiques qui se produisent dans la levure pendant le séchage, elle pourrait ne pas avoir le même comportement que celui qu'elle avait avant déshydratation. Ces modifications pourraient avoir un impact sur plusieurs paramètres comme par exemple la vitesse de fermentation, la production de composés volatils, l'autolyse des levures. A ce jour, rien de ceci n'est décrit dans la bibliographie.

En ce qui concerne l'équipement pour doser les levures dans le vin, Proenol a développé et commercialise des machines doseuses de levures encapsulées sèches qui opèrent avec des cadences qui vont de 1000 jusqu'à 21000 bouteilles/h. La dose de levure dans chaque bouteille peut être réglée dans l'intervalle de 1,0 à 2,0 g.

4.1.3. Applications des levures immobilisées à la prise de mousse en cuve

La méthode continue Russe est à présent la seule méthode de production industrielle en cuve qui fait appel à la technologie des cellules immobilisées. Malgré ses avantages économiques cette méthode est très peu diffusée (Kunkee et Bisson, 1993). Ce peut être lié au fait de ne pas avoir un bon contrôle sur l'activité des microorganismes et à la difficulté d'assurer une multiplication correcte des levures quand la fermentation se fait sous pression (Divies et Deschamps, 1986). Pour contourner cette limitation Divies et Deschamps (1986) ont déposé un brevet en faisant appel à des levures immobilisées dans des gels d'alginate pour la production en continue des vins effervescents. Selon Martynenko et Gracheva (2003) l'expérience d'utilisation de levures immobilisées par inclusion pour des fermentations de vins effervescents produits en continu est limitée à quelques publications. Les mêmes auteurs affirment que ces travaux n'ont pas eu de développement, en raison peut-être, de la faible résistance mécanique des gels utilisés (alginate, carragenates, gélatines et autres polymères).

En ce qui concerne l'emploi de cellules immobilisées pour les fermentations en méthode Cuve Close, la bibliographie est aussi très insuffisante. Fumi et al. (1989) ont proposé l'utilisation d'un fermenteur externe à la cuve où le vin a fermenté. Le fermenteur contenait des levures immobilisées dans des billes d'alginate. Le vin était aspiré par la partie inférieure de la cuve, traversait le fermenteur et était réintroduit dans la cuve par la partie supérieure. Ils ont expérimenté deux configurations de distribution des billes dans le fermenteur : lit fixe et billes

distribuées sur 5 assiettes perforées placés à différentes hauteurs. La seconde option a montré une cinétique de fermentation significativement plus rapide, probablement parce que dans le lit fixe il se formait des canaux préférentiels qui diminuaient le temps de contact du vin avec les billes. Comme contrôle ils ont utilisé des levures libres. Les résultats d'analyses chimiques du vin contrôle et du vin avec des levures immobilisées n'ont pas montré de variations significatives. Ils ont aussi réalisé un essai de préférence avec 8 dégustateurs, et il n'a pas été possible de distinguer les vins. Bien que les auteurs considèrent que le procédé de fermentation est continu il est en réalité globalement discontinu.

Bien que les premières études sur l'utilisation des levures immobilisées en alginate de calcium pour la production des vins effervescents datent de la fin des années 80, très peu de travaux ont été réalisés pour connaître l'influence du passage à l'échelle industrielle. Il est probable que le premier paramètre modifié systématiquement est le vin de base. Il est aussi certain que plus on testerait de vins de base différents, plus il y aurait une probabilité importante d'en trouver un qui posséderait une cinétique différente de celle attendue. La question est de savoir quelle est l'amplitude des variations sur la vitesse de fermentation pour des vins de base présentant des caractéristiques semblables de pH, azote assimilable, SO_2 libre, acidité volatile, etc. Aussi, il est vraisemblable que la température a une influence sur la cinétique de fermentation avec les levures immobilisées, mais cela non plus n'a pas été évalué dans la bibliographie. La réalité nous montre que la plage de températures de fermentation de vins mousseux peut aller de 10°C (en Champagne) jusqu'à 20°C. Le processus d'autolyse des levures immobilisées n'est pas connu et n'a pas non plus été étudié.

Un des objectifs de ce travail est d'apporter des informations sur l'influence du vin de base et de la température sur le déroulement de la fermentation alcoolique en bouteille avec des levures immobilisées en alginate de calcium.

4.2. Matériel et Méthodes

4.2.1. Vin de base

Au cours de ce travail, différents vins de base ont été utilisés. Les vins ont été acquis auprès de producteurs qui les avaient produits et/ou sélectionnés spécifiquement pour l'élaboration de vins effervescents. Le Tableau 4-1 résume les principales caractéristiques analytiques des différents vins de base utilisés.

Tableau 4-1 – Caractéristiques physico-chimiques des différents vins de base utilisés pour la prise de mousse.

Vin de base	MF	TN	MM	991X	J64	ES	PT	IT
Álcool (%)	11,5	11,2	11,7	11,0	10,6	12,0	10,9	11,0
pH	3,05	2,94	2,93	3,19	3,03	3,23	2,93	3,05
SO2 libre (mg/L)	11,0	6,4	8,0	6,4	7,0	12,8	3,2	3,2
SO2 total (mg/L)	61,4	51,0	57,6	-	49,0	-	-	-
Glucose+ Fructose (g/L)	0,5	0,6	1,8	0,4	-	0,16	1,52	0,77
Acide Malique (g/L)	1,4	2,6	2,0	-	-	-	-	-
Azote assimilable (mg/L)	14,0	15,4	9,8	124,6	> 100	22,4	30,8	78,4
Acide volatile (g/L)	0,23	0,17	0,25	-	-	-	-	-
Acide Totale (g/L)	6,23	7,50	7,05	-	4,4	5,3	-	-

Les lieux d'origine des vins et les cépages utilisés pour les produire sont présentés ci-dessous ::

- TN – Portugal | Touriga Nacional
- MF – Portugal | Malvasia Fin
- MM – Portugal | Pinot Noir et Chardonnay
- 991X – France | Chardonnay
- J64 – France | Chardonnay
- ES – Espagne | Méconnue
- PT– Portugal | Méconnue
- IT – Italie | Méconnue

4.2.2. Formulation des billes

Les billes utilisées sont constituées de cellules de levures *Saccharomyces cerevisiae* encapsulées dans de l'alginate ; ces billes sont bicouches et formulées suivant les conditions opératoires FES, FE1 et FE2 décrites au paragraphe 3.2.

Pour résumer, dans la formulation FES, qui est le standard, le débit de la couche externe représente 60% du débit total. Déjà dans la formulation FE1, le débit de la couche externe représente seulement 40% du débit total. La diminution du débit de la couche externe a été compensée par une augmentation du débit de la couche interne afin de maintenir le débit total égal dans les deux formulations. En pratique le passage de la formulation FES à la formulation FE1 se traduit dans une réduction de l'épaisseur de la couche externe, et conséquemment une augmentation de l'interne.

Le débit total alimenté aux buses bi-fluide peut varier dans un intervalle dont les limites sont définies par la qualité des billes formées. La réduction du débit total conduit à la formation de billes plus petites ce qui contribue à augmenter la surface de contact, pour une dose d'inoculation identique. Dans la FES et dans la FE1 le débit total employé est éloigné des valeurs minimales qui peuvent dégrader la formation des billes. Ainsi on a choisi de créer une autre formulation, la FE2, avec un débit restreint au minimum c'est-à-dire au débit qui permette encore la formation de billes sans compromettre leur qualité. Le débit total dans la formulation FE2 a été réduit de 34% comparativement avec les formulations FES et FE1.

4.2.3. Filtration stérile du vin de base

Pour une utilisation correcte des levures immobilisées pour la production des vins effervescents, il est indispensable que les levures ainsi que le vin soit exempts de contaminants. En effet, le développement de microorganismes contaminants à l'intérieur de la bouteille créerait une turbidité que seule une clarification par remuage (dans des pupitres ou dans des gyropalettes) pourrait éliminer. Comme un des principaux avantages des levures immobilisées est précisément la suppression de cette étape de remuage, toute turbidité qui apparaîtrait dans les bouteilles enlèverait toute la valeur de ce procédé pour l'élaboration des vins effervescents.

Le test de contrôle réalisé sur les lots de levures immobilisées est décrit dans le paragraphe 2.4.6. Ce test permet de garantir que les niveaux de contamination décelés sont parfaitement acceptables pour la production de vins effervescents. En ce qui concerne le vin, une filtration stérilisante effectuée immédiatement avant l'embouteillage et l'inoculation permet d'atteindre le niveau de propreté microbienne requis.

Au laboratoire, la filtration est réalisée avec le système présenté dans la Figure 4-1.



Figure 4-1 Système de filtration par des cartouches. 1 - Réservoir de vin ; 2 - Pré-filtre de 0,50 μm porosité nominale ; 3 - Filtre final de 0,45 μm porosité absolue ; 4 - sortie du système de filtration directement pour la bouteille.

Le vin placé dans le réservoir (1) est dirigé vers les filtres (2,3) par pressurisation du réservoir avec de l'air comprimé. À la sortie (4) du filtre final (3) le vin est envoyé dans la bouteille. Ce système permet de remplir une seule bouteille à la fois. Pour contrôler le colmatage des filtres, il existe deux manomètres qui indiquent la perte de charge observée.

Après chaque utilisation, le système (filtres compris) est lavé avec de l'eau chaude et désinfecté avec une solution à base d'acide peracétique et de peroxyde d'hydrogène à la concentration 2%. Avant chaque utilisation le système est stérilisé en autoclave à 121°C pendant 15 min. Après la stérilisation, on réalise l'essai de point de bulle pour évaluer l'intégrité du filtre.

Les bouteilles utilisées dans les essais en laboratoire sont des bouteilles dites « champenoises » de 750 mL ; elles aussi sont lavées et stérilisées à 121°C pendant 15 min.

Dans les essais à l'échelle industrielle, la pré-filtration du vin a été réalisée conformément au protocole interne des caves et la filtration finale a été faite avec des cartouches stérilisantes de 0,45 μm de taille de pores. Cette dernière filtration est faite en ligne avec l'embouteillage. Les bouteilles ont été utilisées telles que fournies, sans aucun processus de nettoyage ou de désinfection particulier.

4.2.4. Mise en bouteille (tirage laboratoire)

Dans les cas où le vin est traité avec des levures autolysées (Fermaid 2133), celles-ci sont ajoutées 24 h avant le tirage. Ensuite le vin reste au repos jusqu'à l'addition des éléments nutritifs (azote ammoniacal et thiamine).

Le jour du tirage en laboratoire, on réalise systématiquement les corrections suivantes :

- Addition de 0,3 mg/L de thiamine

- Ajustement de l'azote assimilable à 100 mg/L avec du phosphate de diammonium (DAP)
- Ajustement des sucres (glucose + fructose) à 24 g/L grâce à une solution mère à 840 g/L.

Pendant l'addition des éléments nutritifs et du substrat, le vin est doucement agité de façon à garantir une bonne homogénéisation.

On procède ensuite à la filtration, au remplissage, à l'inoculation avec les levures immobilisées et au bouchage des bouteilles. Avant l'inoculation, on vérifie que la différence de température entre le vin et les levures est inférieure à 10°C. Comme avec les LSA, un écart supérieur entraîne une forte perte de viabilité des levures.

Après embouteillage, les bouteilles sont placées, pour la fermentation, en chambre à température contrôlée. Dans ce travail, deux chambres ont été utilisées: l'une à la température de $14 \pm 1^\circ\text{C}$ et l'autre à $10 \pm 1^\circ\text{C}$.

4.2.5. Mesure de la pression des vins effervescents

L'appareil permettant de mesurer la pression dans les bouteilles de vins effervescents s'appelle aphromètre. La Figure 4-2 présente un de ces équipements pour des bouteilles munies d'une capsule.

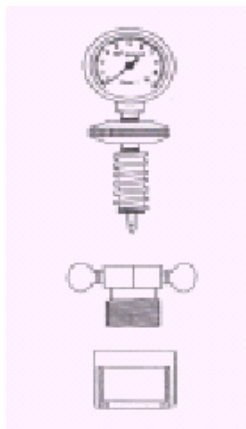


Figure 4-2 Aphromètre pour capsules

L'aphromètre est constitué d'une aiguille qui, après avoir percé la capsule, communique la pression au manomètre. Après insertion de l'équipement et agitation de la bouteille la pression est mesurée dans le manomètre. La pression est exprimée en bar.

Les mesures sont toujours prises à la température de fermentation et ensuite corrigées pour obtenir la pression à la température de 20°C, à l'aide d'un coefficient disponible dans les tables de l'OIV (consulter références bibliographiques - OIV 2011).

4.2.6. Dosage enzymatique de l'acide L-malique

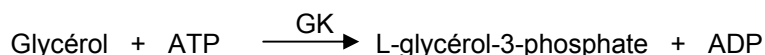
Comme celui du glucose et du fructose, le dosage de l'acide malique a été réalisé grâce à un analyseur enzymatique automatique de la marque Horiba modèle ABX Pentra 400. Les kits enzymatiques utilisés sont de la marque Megazyme (référence K-LMALAF).

La détection de l'acide L-malique requiert deux réactions enzymatiques. La première réaction, catalysée par l'enzyme L-malate deshydrogenase (L-MDH) vise à oxyder l'acide malique en oxaloacetate, avec production de NADH. Pour éviter la « perte » du NADH du à la réversibilité de la réaction il faut, dans une deuxième étape, convertir l'oxolacetate en L-aspartate et en 2-oxoglutarate, avec l'aide de la glutamate-oxaloacetate transaminase. La quantité de NADH formée est mesurée par absorbance à 340 nm et est proportionnelle à la quantité d'acide L-malique en solution. La relation entre l'absorbance mesurée et la concentration de l'acide L-malique est établie avec une courbe de calibration. La gamme de détection de la méthode est comprise entre 0,1 et 5,0 g/L d'acide L-Malique.

4.2.7. Dosage enzymatique du glycérol

Le glycérol a également été déterminé en utilisant un analyseur enzymatique automatique de la marque Horiba modèle ABX Pentra 400. Les kits enzymatiques utilisés sont de la marque Megazyme (référence K-GCROLGK).

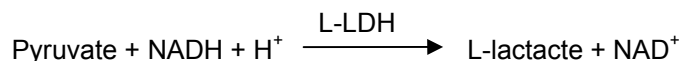
Le glycérol est phosphorylé par l'adenosine-5-triphosphate (ATP) en L-glycérol-3-phosphate dans une réaction catalysée par l'enzyme glycerokinase (GK).



Ensuite l'ADP formé dans la réaction est reconverti en ATP par le phosphoenolpyruvate (PEP) avec l'aide de l'enzyme pyruvate kinase (PK), en produisant du pyruvate.



En présence de l'enzyme L-lactate désydrogenase (L-LDH) et du NADH, le pyruvate est réduit à L-Lactate, accompagné de la production de NAD⁺



La quantité de NADH consommée lors de la réaction est mesurée par la diminution de l'absorbance à 340 nm et est proportionnelle à la quantité de glycérol présente dans l'échantillon.

4.2.8. Dosage de l'azote assimilable

La somme de l'azote ammoniacal (NH_4^+) et de l'azote α -aminé (NH_3^+) existant dans le moût est la principale source d'azote utilisée par les levures dans le vin ; elle constitue l'azote assimilable.

L'azote assimilable a été déterminé par le dosage au formol : l'azote ammoniacal et l'azote α -aminé, après neutralisation à pH 8, vont se combiner avec le formaldéhyde. Les protons libres ainsi formés vont être neutralisés par une solution de soude.

À 100 mL de l'échantillon, on ajoute NaOH 1 N jusqu'à que le pH soit égal à 8. Ensuite on ajoute 25 mL de formaldéhyde à pH 8 et on mélange bien pendant 5 mn. La solution obtenue est titrée avec NaOH 0,1 N jusqu'à pH 8.

L'azote est déterminé en multipliant le volume de NaOH 0,1N consommé par 28.

4.2.9. Détermination de l'acidité totale

L'acidité totale est la somme des acides organiques volatils (ac. acétique) et des acides fixes (ac. tartrique, malique lactique, citrique et succinique) dosables à pH 7 par l'addition d'une base forte. Le dioxyde de carbone et le soufre libre ne sont pas pris en compte dans cette analyse.

Si l'échantillon est trouble, il doit être filtré ou centrifugé. Pour les vins, le dioxyde de carbone doit être enlevé à l'aide d'un bain à ultra sons.

À 10 mL de l'échantillon, on ajoute 30 mL d'eau desionisée. Par la suite, on ajoute NaOH 0,1 N jusqu'à pH 7.

Comme l'acide tartrique est le principal acide présent dans le vin l'acidité peut être exprimée en grammes d'acide tartrique par litre de solution ; elle est alors déterminée à l'aide de l'expression suivante :

$$AT = 75 \times N \times V / v$$

ou N représente la normalité de la solution de NaOH, v – le volume d'échantillon, et V –le volume de NaOH consommé.

4.2.10. Dosage de l'anhydride sulfureux libre et total

Le dioxyde de soufre est très utilisé en œnologie en raison de ses propriétés antioxydantes et antiseptiques qui permettent une meilleure conservation des raisins, des moûts et des vins. Ajouté au vin le SO_2 réagit avec de nombreux composés avec lesquels il forme des combinaisons plus ou moins stables, c'est le SO_2 combiné. Quand il est en concentration excédentaire, le restant non combiné s'appelle SO_2 libre. L'ensemble des différentes formes, libre et combinée, constitue le SO_2 total.

Le dosage du dioxyde de soufre a été fait par la méthode de Ripper double. Le dioxyde de soufre libre est dosé par titrage iodométrique direct. Le dioxyde de soufre combiné est dosé, à

la suite, par titrage iodométrique après hydrolyse alcaline. Ajouté au dioxyde de soufre libre, il permet d'obtenir le dioxyde de soufre total.

Cette méthode est dument décrite dans le Recueil des Méthodes Internationales d'Analyses des Vins et des Moûts, 2011, vol 2, édité par l'OIV.

4.2.11. Dosage de l'alcool

Il est possible de déterminer la teneur en alcool d'une solution hydro-alcoolique par la mesure de sa température d'ébullition après correction de la pression. Ainsi l'alcool dans les vins a été déterminé à l'aide d'un ébulliomètre. Mais, les erreurs d'analyse pourront être significatives si le vin contient des quantités résiduelles de sucres (plus de 4 g/L).

4.2.12. Dosage des polysaccharides

La détermination des concentrations en polysaccharides dans le vin a été sous-traitée à l'Instituto de Fermentaciones Industriales de Madrid.

4.2.13. Evaluation de l'hygiène des chaines par bioluminescence

Le recours à la technique de la bioluminescence pour contrôler l'hygiène des surfaces dans l'industrie, devient de plus en plus fréquent. Cette technique est basée sur la mesure de l'intensité de la lumière émise résultant de la réaction de la luciferine avec l'adenosine-5-triphosphate (ATP) en présence de l'enzyme luciférase et de l'oxygène.

Initialement la luciferine est activée par ATP pour former l'adenylate de luciferine qui se lie à l'enzyme luciférase avec libération de deux phosphates. Par la suite l'adenylate de luciferine forme par oxydation l'oxyluciferine, en libérant une molécule d'AMP. Finalement la décarboxylation de l'oxyluciferine laisse la molécule dans un état excité, qui pendant la relaxation produit un photon dans le spectre de la radiation visible. Si la concentration d'ATP est limitante, la mesure de l'intensité lumineuse est directement proportionnelle à la quantité d'ATP présente dans milieu réactionnel.

Comme l'ATP est une spécificité des organismes vivants dans la mesure où toutes les cellules vivantes produisent et consomment de l'ATP, sa présence est la preuve de vestiges de vie, au moins récents, puisque l'ATP n'est pas détruite immédiatement par le décès cellulaire. Ainsi la détection d'ATP par bioluminescence est une façon de connaître le niveau de contamination dans des équipements de production.

Actuellement il existe divers luminomètres qui permettent de mesurer l'intensité de la lumière émise dans la réaction de luminescence. Quelques uns plus complexes et puissants sont orientés pour la recherche et peuvent servir, par exemple, pour l'étude détaillée des voies métaboliques, d'autres plus simples et portables sont plus adaptés au secteur industriel, notamment pour la détection de micro-organismes contaminants de surface. Ces appareils ne

fournissent pas la concentration d'ATP mais seulement une mesure de l'intensité lumineuse - relative light units (RLU). Plus grande est la mesure de l'intensité lumineuse plus grand est le niveau de contamination. Néanmoins, il est important de faire ressortir que pour les applications de contrôle de l'hygiène ce ne sera pas une bonne pratique que d'établir une corrélation entre l'intensité lumineuse et le nombre de cellules présentes dans l'échantillon dans la mesure où la quantité d'ATP existante dépend du micro-organisme lui-même mais aussi de son état physiologique. Des cellules de levure peuvent contenir 100 fois plus d'ATP par cellule que celles d'une bactérie (Lonvaud-Funel et al., 2010)

Dans ce travail, on a utilisée la bioluminescence pour le contrôle de l'hygiène des chaînes de tirage des vins effervescents, préalablement à l'embouteillage avec des levures immobilisées. Le luminomètre était de la marque Biotrace. Si la valeur était inférieure à 300 RLU la désinfection était approuvée, autrement on désinfectait encore une autre fois cette partie de l'équipement.

4.3. Expérimentations

Les expériences réalisées dans ce chapitre ont été conçues et réalisées non seulement pour augmenter les connaissances sur l'utilisation des billes Proelif® (Levures *Saccharomyces cerevisiae* encapsulées dans de l'alginate) dans les vins effervescents mais aussi pour répondre à des questions ou sollicitations provenant d'industriels du secteur. Ainsi les essais de prise de mousse relatés ont été conduits non seulement en laboratoire mais aussi en site industriel.

Ces essais réalisés avec les levures immobilisées ont eu pour objectif d'évaluer :

1. l'influence du vin de base sur la cinétique de fermentation
2. l'évolution de la viabilité des levures pendant la fermentation
3. l'influence de la température sur la cinétique de fermentation
4. l'influence de la dose de levures immobilisées
5. l'influence des débits du procédé d'immobilisation
 - rapport des débits de la couche externe (CE) et de la couche interne (CI)
 - débit total alimenté aux buses bi-fluide, qui conditionne la taille des billes.
6. les performances fermentaires et les caractéristiques sensorielles en comparaison avec un procédé utilisant des levures libres
7. l'influence de l'addition d'activateurs de fermentation.

○ Essai FB1

Dans cet essai, trois vins provenant du Portugal désignés par MF, TN et MM sont utilisés. Le diagramme suivant (Figure 4-3) résume l'essai FB1, en précisant les analyses réalisées et les objectifs visés.

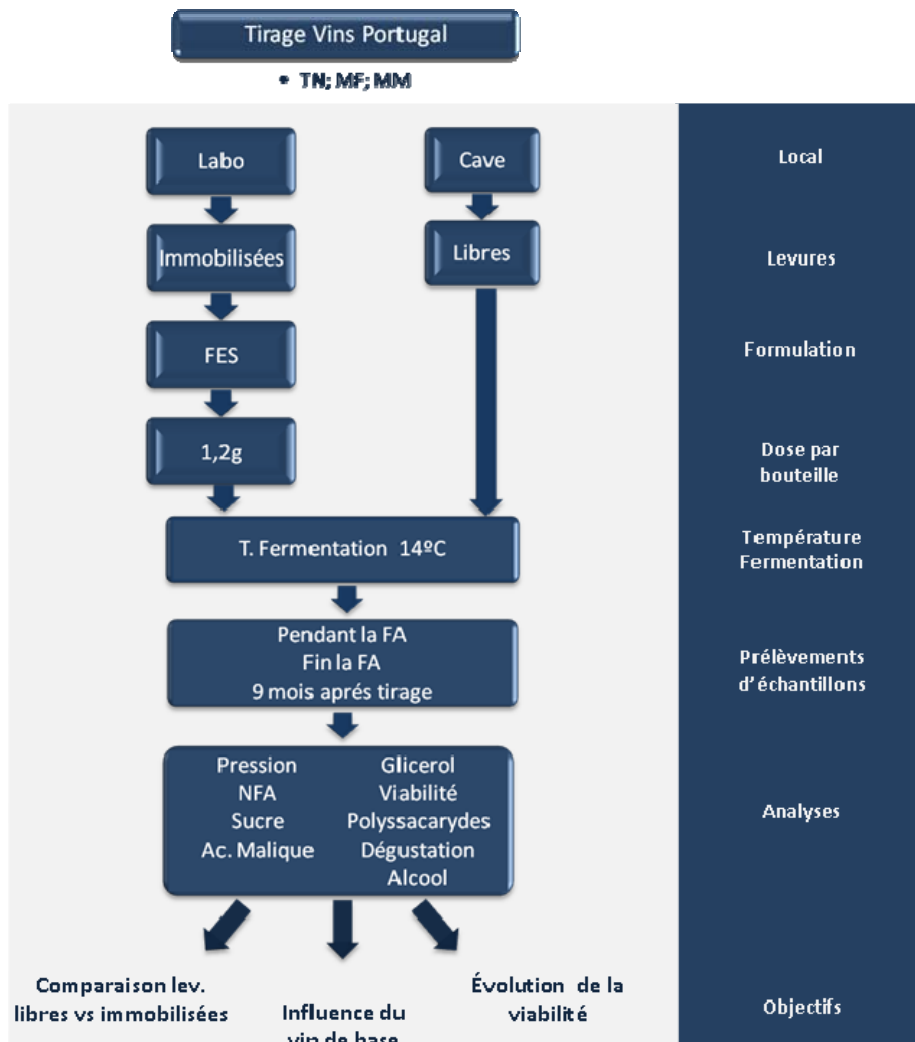


Figure 4-3 Diagramme représentatif de l'essai FB1

Pour chaque vin, on a réalisé un tirage avec des levures immobilisées et un autre avec des levures libres. Le tirage avec des levures immobilisées a été réalisé au laboratoire. 26 bouteilles de chaque vin ont été inoculées à raison de 1,2 g /bouteille de levures immobilisées issues d'un lot produit dans les conditions type (FES).

Le tirage avec des levures libres a été réalisé dans une cave du nord du Portugal productrice de vins effervescents. La souche de levures utilisée dans le tirage a été la QA23. La préparation de l'inoculum, les corrections nutritionnelles du vin, le dosage des sucres et l'embouteillage ont été réalisés conformément au protocole interne de la cave. De ce tirage industriel de plusieurs milliers de bouteilles, 12 bouteilles de chaque vin ont été tirées au sort et portées au laboratoire.

Les bouteilles avec les levures libres et avec les levures immobilisées ont fermenté à la température de 14°C dans la chambre froide des installations de Proenol.

Dans une bouteille de chaque série de vin inoculé avec des levures immobilisées, on a placé un aphromètre pour suivre quotidiennement l'évolution de la pression. Périodiquement sont aussi réalisées des mesures de la pression dans des bouteilles inoculées tant avec des levures immobilisés que libres.

9 mois après le tirage, on a analysé les paramètres suivants:

- Sucres résiduels
- Acidité volatile
- Alcool
- Glycérol
- Ac. malique
- Polysaccharides totaux

En complément des analyses physico-chimiques, on a réalisé une dégustation descriptive avec la Comissão Vinicola da Região dos Vinhos Verdes (CVRVV). Le panel de dégustation était constitué par 13 dégustateurs entraînés pour les vins effervescents. Dans l'essai dit « descriptif », les dégustateurs doivent décrire les caractéristiques ressenties lors de la dégustation des vins. Pour faciliter l'analyse, il est fourni une fiche qui liste les caractéristiques sensorielles les plus communes, avec une échelle de notation de zéro à six pour chacune d'elles. Les vins les mieux jugés obtiennent une note plus élevée. Avant cette analyse, le vin élaboré avec des levures libres a été clarifié et dégorgé.

○ Essai FB2

L'essai FB2 a été réalisé avec un vin fourni par un producteur de la région de Champagne (France) - 991X. Notre intérêt (et celui du partenaire) était de connaître le comportement des levures immobilisées dans des fermentations à basse température. En effet sa cave, comme celles d'une grande partie des producteurs en Champagne est la plupart de l'année à des températures proches de 10°C. Comme cette cave s'étend sur quelques kilomètres, il est extrêmement coûteux de réguler la température en faisant appel à des systèmes de climatisation. Pour que ce producteur, mais aussi les autres soumis à des conditions semblables, puissent à l'avenir utiliser de façon systématique un produit comme les levures immobilisées, ils doivent avoir la garantie que les fermentations soient effectives, même à basse température.

Pour évaluer l'impact que des températures de l'ordre de 10°C peuvent avoir sur la cinétique de fermentation avec des levures immobilisées, on a établi le programme de travail présenté dans la Figure 4-4. Ce programme a servi aussi pour évaluer les effets de différentes formulations d'immobilisation et doses d'inoculum.

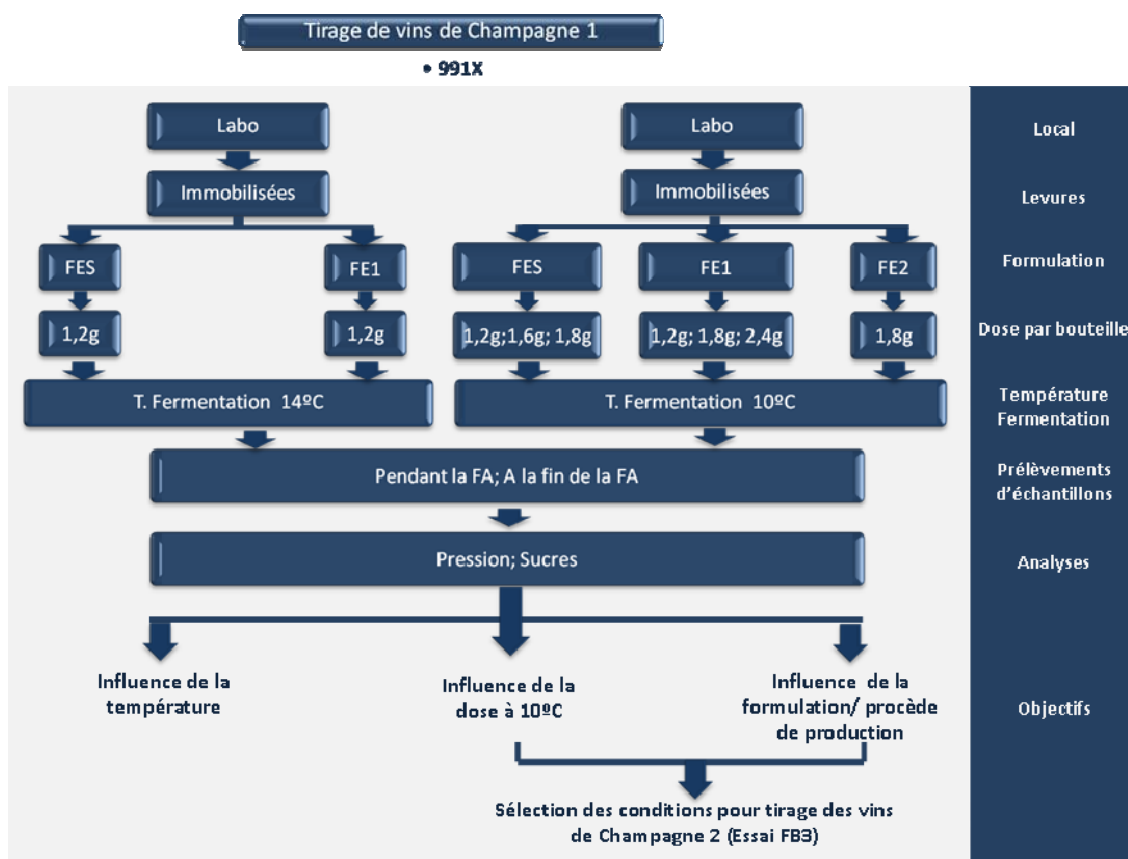


Figure 4-4 Diagramme représentatif de l'essai FB2

Les essais ont été tous réalisés à l'échelle du laboratoire.

Dans chaque bouteille un aphromètre permet de suivre l'évolution de la pression, et en conséquence de la fermentation, au cours du temps. À la fin de la fermentation, une analyse des sucres résiduels est réalisée.

Cet essai a permis de sélectionner les meilleures conditions (dose d'inoculum et formulation de production) à utiliser dans l'essai FB3.

○ Essai FB3

Comme l'essai précédent, celui-ci aussi a été réalisé avec un vin de la région de Champagne (J64) mais cette fois dans les conditions industrielles. On a réalisé un tirage de 19000 bouteilles avec des levures immobilisées et de 20000 bouteilles avec des levures libres.

Le tirage a été réalisé dans les installations d'un producteur de Champagne. Dans le tirage avec les levures libres la souche utilisée a été la QA23. L'addition d'inoculum et de la liqueur de tirage au vin a été faite conformément au protocole interne du producteur.

La filtration et la désinfection de la ligne d'embouteillage ont été exécutées afin de garantir les conditions d'asepsie nécessaires pour l'utilisation des levures encapsulées. Le contrôle de l'hygiène de la ligne a été réalisé par bioluminescence.

La cadence d'embouteillage a été de 15000 bouteilles par heure et le dosage de levures immobilisées a été réalisé avec une doseuse construite spécifiquement à cet effet à une cadence maximale de 18000 b/h.

Le diagramme de la Figure 4-5 résume le schéma de travail.

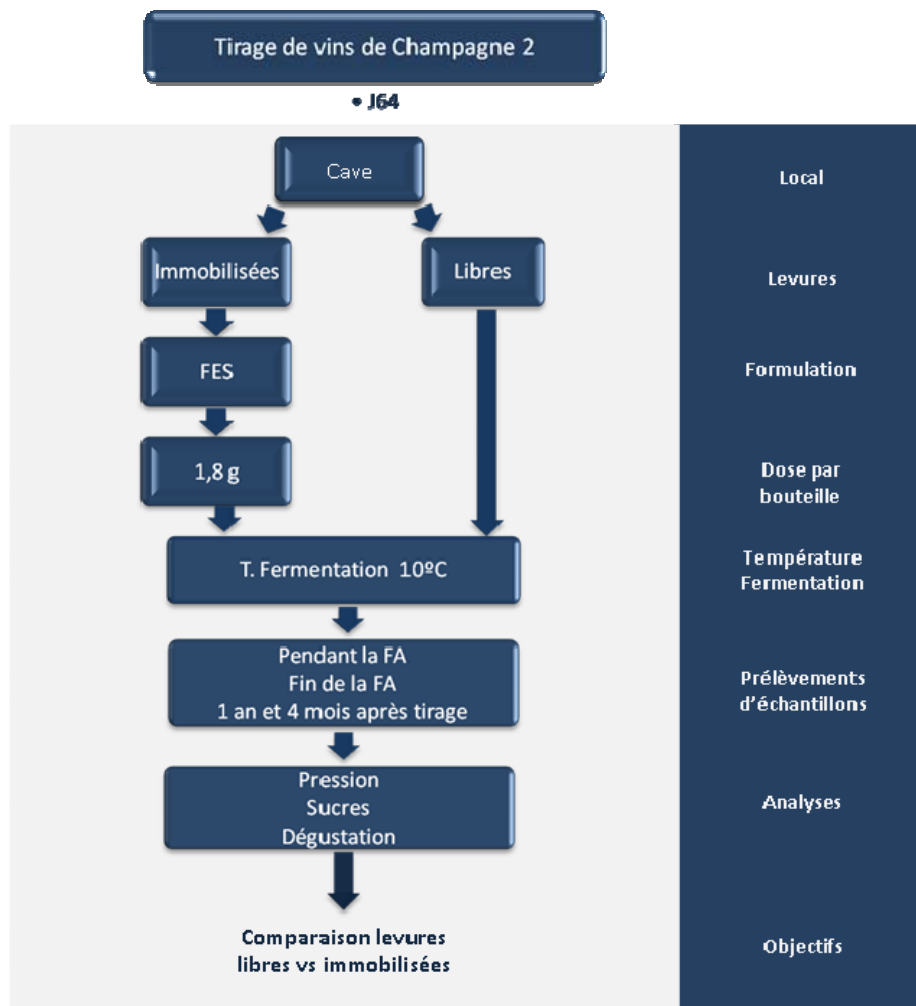


Figure 4-5 Diagramme représentatif de l'essai FB3

La formulation d'immobilisation et la dose d'inoculum à utiliser dans cet essai ont été sélectionnées en fonction des résultats cinétiques obtenus dans l'essai FB2. La souche de levure utilisée a été la QA23 et la quantité d'inoculum a été fixée à 1,8 g/bouteille (soit approximativement 10^7 cellules/mL). L'addition de sucre est celle conforme au protocole interne de la société.

La fermentation avec les levures libres et avec les levures immobilisées s'est déroulée dans la cave du producteur à une température de 10°C. Au cours du temps des mesures périodiques de la pression dans les bouteilles ont été réalisées, jusqu'à ce que la fermentation arrive à sa fin, c'est-à-dire jusqu'à ce que la pression soit stable entre 2 intervalles de temps.

Une année et quatre mois après le tirage, les vins obtenus avec les levures immobilisées et les levures libres ont fait l'objet d'une analyse sensorielle confiée à un laboratoire externe

indépendant. La dégustation a été réalisée selon Norme ISO11035 en utilisant les descripteurs communément acceptés et quantifiables. La dégustation a été divisée en 4 phases : phase visuelle ; phase aromatique ; phase gustative et phase retro nasale.

Le panel de dégustation était constitué par 8 dégustateurs professionnels. Les résultats de l'expertise ont été traités avec le programme statistique XLSTAT en faisant recours à l'analyse en composantes principales.

- Essai FB4

Avec l'essai FB4, on a voulu évaluer l'impact de l'addition d'activateurs de fermentation au vin de base dans les 48 h précédant le tirage. Cet essai a porté sur trois vins provenant de différents pays (Espagne ; Portugal et Italie). La Figure 4-6 présente le schéma de travail utilisé.

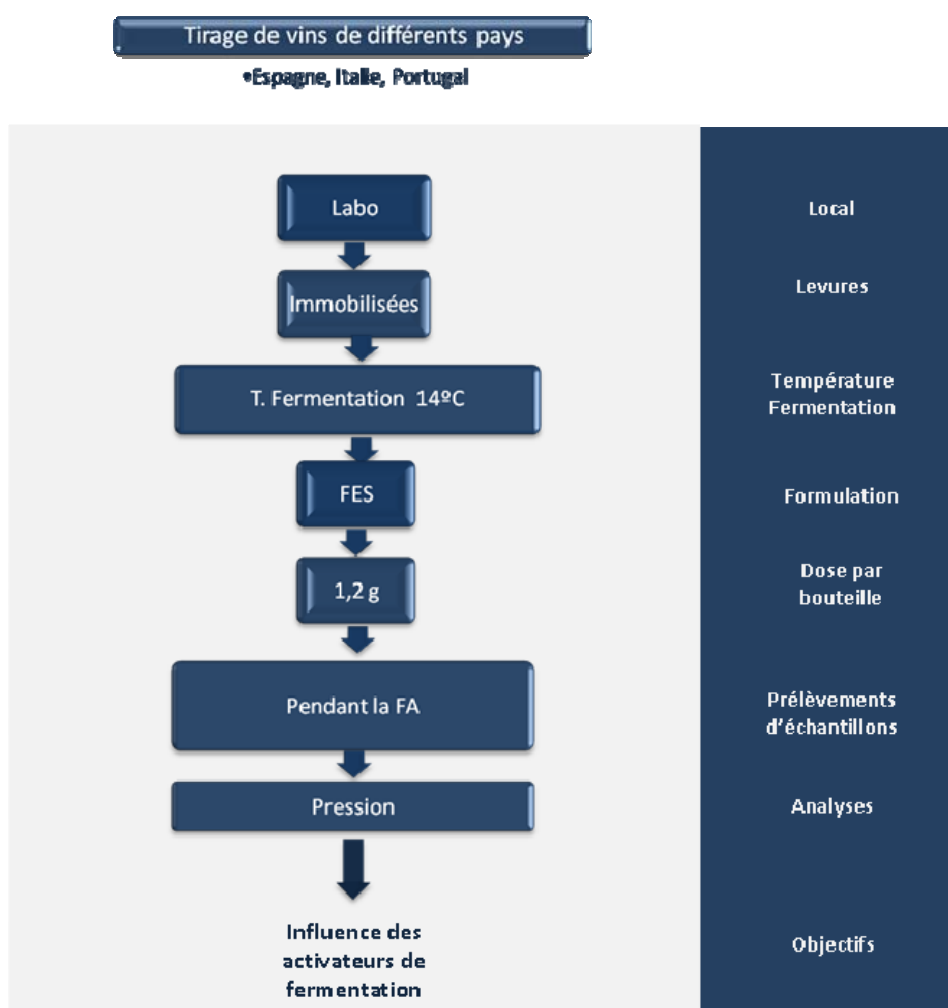


Figure 4-6 Diagramme représentatif de l'essai FB4

L'essai a été réalisé au laboratoire. 48h avant le tirage, chaque vin de base a été divisé en deux lots. L'un d'eux a reçu un apport d'activateur de fermentation (Fermaid 2133) à la dose de 35 g/hL, l'autre lot restant sans activateur.

La fermentation a été réalisée avec des levures encapsulées produites conformément à la formulation standard. La dose d'inoculum par bouteille a été de 1,2 g.

Après tirage les bouteilles ont été placées, pour la prise de mousse, dans un local à la température de 14°C.

4.4. Résultats et discussion

Les résultats de prise de mousse obtenus en utilisant des levures immobilisées et des levures libres sont présentés ci-dessous

4.4.1. Influence du vin de base sur la cinétique de fermentation

La sélection soignée du vin de base est sans aucun doute un des points les plus importants pour l'élaboration de vins effervescents de qualité (Hardy, 1985). Les caractéristiques du vin de base conditionnent non seulement les propriétés sensorielles du produit final mais elles influencent aussi le déroulement de la seconde fermentation dans la bouteille.

Les paramètres physico-chimiques qui sont pris en compte et souvent corrigés par les œnologues sont l'azote assimilable, le pH, le SO₂ libre et le degré alcoolique. Évidemment, il existe d'autres paramètres qui interviennent aussi au cours de la seconde fermentation. Néanmoins, il est impossible de les mesurer tous parce que beaucoup d'entre eux exigent des techniques analytiques avancées qui ne sont pas disponibles dans la majeure partie des laboratoires d'œnologie (ex : mesure d'acides gras saturés ; évaluation de la qualité de l'inoculum à travers la quantification de protéines intracellulaires). Et parfois même certains paramètres faciles à détecter sont impossibles à corriger (exemple : l'acide acétique).

Normalement une bonne gestion de la nutrition pendant la première fermentation, l'existence de conditions équilibrées (pH > 3,0 ; alcool <11,5% ; SO₂ libre <15mg/L et la température de fermentation > 13°C) et la mise en œuvre d'un inoculum correctement préparé, permettent de minimiser l'impact de la variabilité associée au vin de base et donc de réaliser les secondes fermentations avec sécurité. Néanmoins la variabilité existe et l'œnologue ne réussit pas toujours à avoir un vin dans les conditions idéales, c'est pourquoi il est important d'avoir une notion de l'impact que la nature du vin de base peut avoir sur le déroulement de la seconde fermentation avec des levures immobilisées.

L'essai FB1 permet de comparer l'évolution de la fermentation en bouteille pour 3 vins effervescents distincts, notés TN, MF et MM, tous inoculés avec un lot de levures FES. La Figure 4-7 montre l'évolution de la pression au cours du temps pour ces 3 vins.

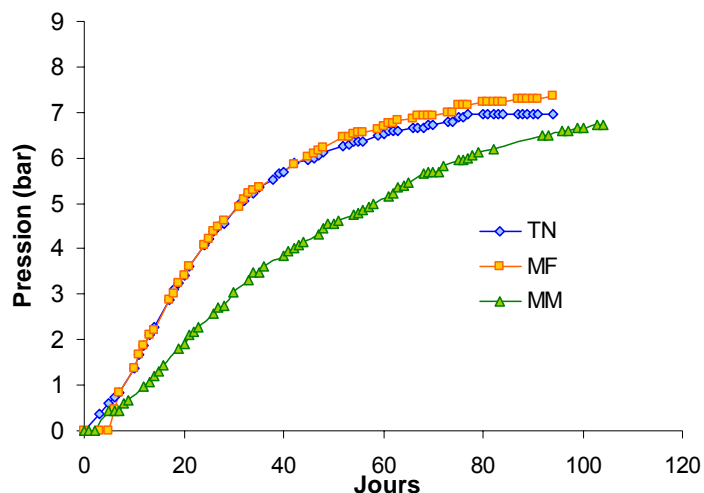


Figure 4-7 Évolution de la pression dans la bouteille au cours du temps pour les vins TN, MF et MM (Essai FB1 ; FES ; Dose = 1,2 g/bouteille ; T_{ferm} = 14°C)

On observe que les vins MF et TN ont des cinétiques de fermentation très similaires, différant seulement à la fin où le vin MF finit avec 0,3 bar de plus de pression que le TN. Cette légère différence est probablement due à une dose de sucre légèrement supérieure. Le vin MM présente un profil de fermentation plus lent ; il faut au moins 10 jours de plus pour atteindre une valeur de pression comparable à celle de TN.

Le fait que le vin base MM présente une concentration en sucre résiduel 3 fois supérieure aux deux autres, est déjà une indication que ce vin est plus difficile à fermenter, pour des raisons méconnues.

La consommation des sucres pour chacun des vins est présentée dans la Figure 4-8.

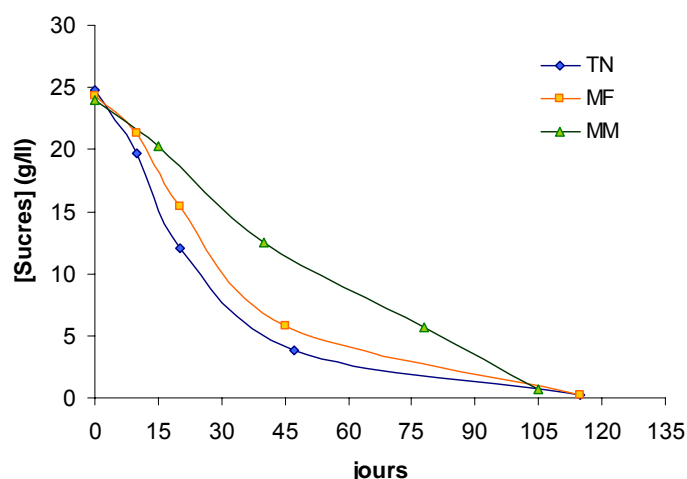


Figure 4-8 Evolution des sucres au cours du temps pour les vins TN, MF e MM. (Essai FB1; FES ; Dose = 1,2 g/bouteille ; T_{ferm} = 14°C).

À partir de la Figure 4-8, on observe que les profils de consommation des sucres pour les vins TN et MF sont très semblables, comme nous l'avons observé pour le profil d'évolution de la pression. La consommation de sucres dans le vin MM est plus lente.

Ces résultats prouvent que le vin de base influence la cinétique de la seconde fermentation en bouteille même en utilisant les levures immobilisées. Cette observation est valable même pour des vins où les conditions de fermentation sont apparemment équilibrées.

4.4.2. Evolution de la viabilité

Lors de cet essai, afin de suivre l'évolution de la viabilité des levures au sein des billes, des échantillons de billes ont été prélevés à divers temps de fermentation.

La Figure 4-9 présente les résultats de la mesure de la viabilité en fonction du temps.

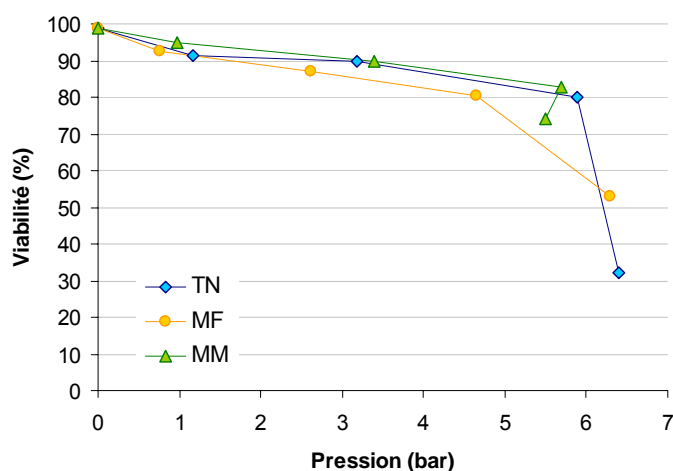


Figure 4-9 Évolution de la viabilité des levures immobilisées pendant la fermentation des vins TN, MF et MM (Essai FB1 ; FES, Dose = 1,2 g/bouteille ; T_{ferm} = 14°C)

On observe dans tous les vins que la viabilité des levures diminue linéairement depuis le début de la fermentation jusqu'à ce que la pression dans la bouteille soit approximativement de 6 bars. Quand cette pression est atteinte, ce qui coïncide avec l'épuisement des sucres et donc la fin de fermentation, on observe une perte de viabilité très rapide.

4.4.3. Influence de la température

Dans cette partie du travail, nous avons cherché à connaître l'influence exercée par les faibles températures (10°C) sur les cinétiques de fermentation par des levures immobilisées.

Pour cela on a utilisé le vin 991X qui après embouteillage et inoculation (essai FB2) a été mis en fermentation à deux températures différentes : 14 et 10°C. On a suivi l'évolution de la pression au cours du temps pour chacune des températures. Les résultats sont présentés dans la Figure 4-10.

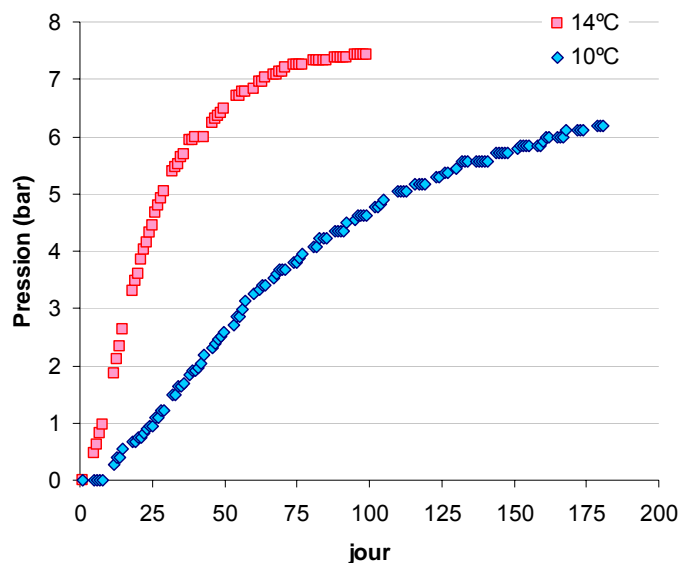


Figure 4-10 Évolution de la pression au long du temps pour fermentation dans bouteille à la température de 10°C et de 14°C. (Essai FB2, vin 991X ; FES ; dose = 1,2 g/bouteille)

Sur le graphique de la Figure 4-10, on constate que dans la fermentation à 10°C l'évolution de la pression, et en conséquence la consommation des sucres, est considérablement plus lente que dans la fermentation qui se déroule à 14°C.

La fermentation à 14°C s'est achevée en 95 jours avec une valeur de sucre résiduel de 0,4 g/L tandis que la fermentation à 10°C présentait encore 6,5 g/L après 180 jours.

Ainsi, des températures de l'ordre de 10°C réduisent considérablement la vitesse de fermentation des levures immobilisées pouvant même empêcher que la fermentation se réalise dans sa totalité, laissant le vin avec un taux de sucre résiduel élevé. Du point de vue légal ceci peut entraîner des difficultés pour la mise en marché du vin. Par exemple, le champagne Brut Nature doit contenir moins de 3,0 g/L de sucre résiduel.

Après 134 jours, on a ouvert une des la bouteille qui fermentait à 10°C et on a mesuré la pression et la viabilité des levures encapsulées. La pression était de 5,4 bar et la viabilité de 70%. Notons que la pression mesurée est parfaitement en accord avec la mesure présentée dans la Figure 4-10 (134 jours ; 5,1 bar), ce qui confirme la reproductibilité des fermentations.

La viabilité n'est aussi pas très différente des résultats obtenus au paragraphe 4.4.2 pour une pression de 5,4 bar. Ce résultat montre que malgré la température de 10°C qui entraîne des fermentations plus lentes, les levures maintiennent des niveaux de viabilité proches de ceux obtenus à la température de 14°C.

4.4.4. Influence de la dose de levures immobilisées

Les fermentations à 10°C inoculées avec la dose usuelle de levure immobilisée (1,2 g/bouteille) se sont avérées manifestement lentes et présentent un risque de laisser un taux élevé de

sucres résiduels. Afin d'améliorer la vitesse de fermentation à cette température nous avons pensé augmenter la quantité de levures. A cette fin, nous avons réalisé des essais avec des doses de levure immobilisées supérieures à l'usuel - essai FB2. Les doses expérimentées ont été de 1,6 et 1,8 g par bouteille, la dose de 1,2 g étant maintenue comme contrôle.

Les résultats des cinétiques fermentaires obtenues sont présentés dans la Figure 4-11.

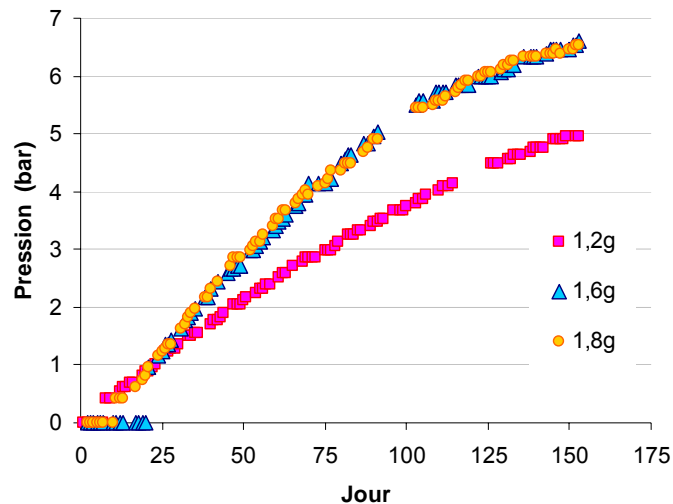


Figure 4-11 Évolution de la pression au cours du temps pour de différentes doses d'inoculum de levure immobilisé. (Essai FB2 ; FES ; vin 991X ; dose = 1,2 ; 1,6 et 1,8 g/bouteille ; T_{ferm} = 10°C)

On constate que l'augmentation de la dose de 1,2 à 1,6 g/bouteille contribue à accroître la vitesse de fermentation de façon significative. Après 153 jours de fermentation la pression avec 1,6 g est de 32 % supérieure à celle obtenue avec 1,2 g.

Cependant l'augmentation de 1,6 g à 1,8 g/bouteille ne semble pas avoir d'effet sur la cinétique. Ceci est sûrement dû au fait que la différence de dose n'est pas très élevée : seulement de 0,2 g/bouteille contre 0,4 g/bouteille qui existent entre 1,2 g/bouteille et 1,6 g/bouteille.

Précisons que le retard (20 jours) de montée en pression observé avec la dose de 1,6 g/bouteille était dû à une fuite dans l'aphromètre. Après réparation, la fuite a été éliminée et la pression est montée immédiatement.

Malgré l'augmentation des doses de 1,2 à 1,8 g/bouteille la vitesse de fermentation reste lente. Du graphique de la Figure 4-11, nous pouvons observer qu'après 150 jours les pressions n'étaient pas encore stables ce qui veut dire que la fermentation n'était pas encore terminée. Ceci est confirmé par la mesure des sucres résiduels au jour 157 :

- 1,2 – 5,9 g/L de sucre
- 1,6 – 2,4 g/L de sucre
- 1,8 - 2,1 g/L de sucre

Afin de compléter les résultats obtenus ci-dessus, l'essai a été répété mais avec une formulation d'immobilisation différente (FE1) et avec des doses de 1,2 g/bouteille, 1,8 g/bouteille et une dose plus importante de 2,4 g/bouteille. Dans la Figure 4-12 les résultats de cet essai sont présentés.

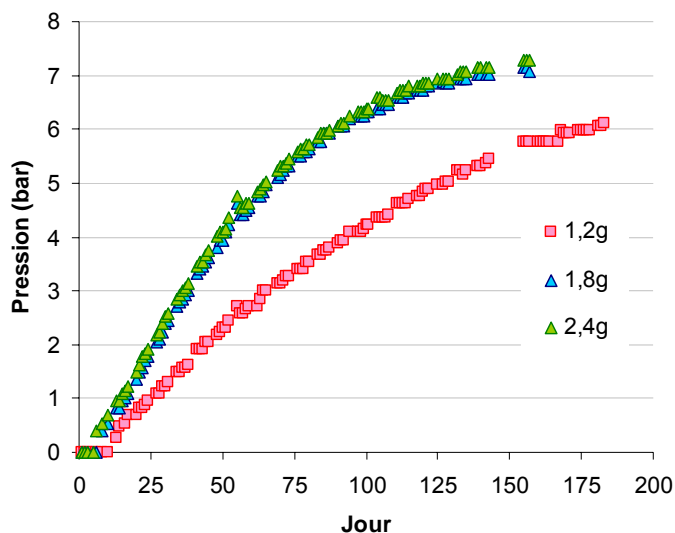


Figure 4-12 Évolution de la pression au cours du temps pour différentes doses d'inoculum de levure immobilisé. (Essai FB2 ; vin 991X ; FE1 ; dose = 1,2 ; 1,8 et 2,4 g/bouteille ; T_{ferm} = 10°C)

Sur la Figure 4-12, on observe qu'avec la dose de 1,2 g/bouteille, la vitesse de fermentation est nettement inférieure à celles obtenues aux doses supérieures. On constate aussi que l'augmentation de 1,8 à 2,4 g/bouteille n'a pas d'effet sur la vitesse de fermentation ; les deux courbes de pression sont parfaitement superposables.

La mesure des sucres présentée dans le tableau suivant vient encore une fois corroborer les mesures de la pression.

Tableau 4-2 – Sucres mesurés à la fin de l'essai FE1 ; vin 991X

Dose (g/bouteille)	Temps de fermentation (jours)	Sucres (g/L)
1,2	183	2,5
1,8	157	0,5
2,4	157	0,5

Les résultats obtenus montrent qu'à 10°C et à la dose de 1,2 g/bouteille les fermentations sont très lentes. Il faut aussi constater que des doses de levure immobilisée supérieures à 1,6 g/bouteille n'apportent pas de bénéfice supplémentaire d'un point de vue cinétique.

On constate par ailleurs que dans ce deuxième essai les sucres ont été complètement dégradés, situation qui ne s'observe pas dans le premier essai. Comme nous verrons dans le point suivant cette différence s'explique par une formulation d'immobilisation différente.

4.4.5. Influence des débits du procédé d'immobilisation

L'essai FB2 a permis aussi d'évaluer l'impact que quelques paramètres du processus peuvent avoir sur la performance des levures immobilisées pendant la seconde fermentation. Les paramètres évalués ont été

- le rapport des débits CE/CI : comparaison FES-FE1
- le niveau de débit total (CE+CI) :

(CE : couche externe ; CI couche interne)

La modification de ces paramètres affecte les caractéristiques physiques du produit final dans la mesure où l'épaisseur de la couche externe est conditionnée par le rapport des débits de la couche externe et de la couche interne. Pour un même débit total, plus le pourcentage du débit de la couche externe est grand, plus l'épaisseur de cette couche dans le produit final est grande. En outre, la dimension des billes est dépendante du débit total, donc plus ce débit est grand, plus les billes sont grandes.

○ Relation débits CE \ CI

Les produits réalisés en utilisant les deux formulations FES et FE1 ont été inoculés dans le vin 991X avec une dose de 1,8 g/bouteille. Les bouteilles ont fermenté à 14°C et à 10°C. La Figure 4-13 montre l'évolution de la fermentation pour chaque formulation, aux différentes températures.

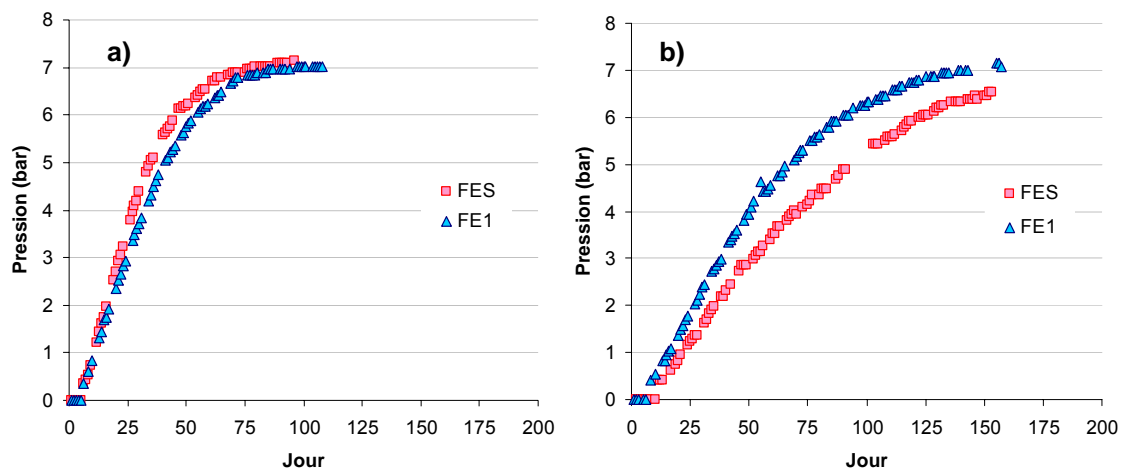


Figure 4-13 Évolution de la pression pour les formulations FES et FE1 à la température de a) 14°C et de b) 10°C (Essai FB2, vin 991X ; dose 1,8 g/bouteille)

À partir de la Figure 4-13-a, on observe que la réduction de la couche externe ne modifie pas le temps total pour réaliser une fermentation à 14°C. On constate aussi que le profil d'évolution de la pression est très semblable pour les deux formulations.

Par contre dans les fermentations qui se déroulent à 10°C les résultats se présentent différemment (voir Figure 4-13-b). La formulation FE1 a été nettement plus rapide que la FES. En 150 jours la FE1 a fini la fermentation tandis que dans la même période de temps la formulation FES n'avait pas encore stabilisé la pression. Ces observations ont été confirmées par la mesure des sucres résiduels : ils étaient encore de 2,1 g/L dans la formulation FES au lieu de 0,5 g/L dans la formulation FE1.

○ Débit total

Les fermentations avec la FE2 ont été réalisées seulement à la température de 10°C. La Figure 4-14 illustre l'évolution de la pression au cours du temps non seulement pour la FE2 mais aussi pour les FES et FE1 à 10°C.

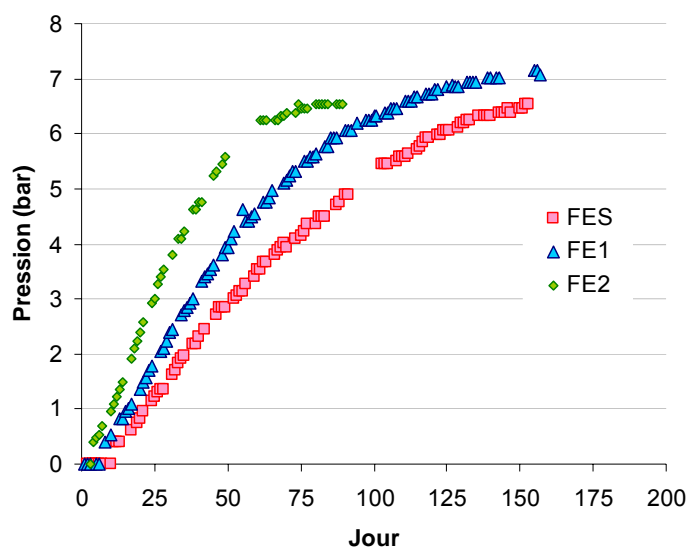


Figure 4-14 Évolution de la pression au cours du temps pour les formulations FES, FE1 et FE2 à la température de 10°C. (Essai FB2, vin 991X dose 1,8 g/bouteille)

On constate que la fermentation avec le produit issu de la formulation FE2 présente un profil de fermentation significativement plus rapide que celles issues des autres formulations. La pression s'est stabilisée à 6,5 bars et non à 7 bars comme on pouvait l'attendre, mais c'est vraisemblablement dû à un dosage des sucres plus faible au départ. En effet, la teneur en sucre résiduel de 1,0 g/L permet de considérer la fermentation comme finie. En définitive, la fermentation a été conclue en 80 jours, ce qui est presque la moitié du temps observé pour la formulation FE1 (150 jours).

Ces résultats prouvent que le débit total, ainsi que le rapport de distribution entre couche externe et interne, ont une influence sur déroulement de la fermentation à la température de

10°C. A la température de 10°C des billes avec peu de couche externe et de dimensions plus petites conduisent à une cinétique de fermentation plus rapide.

Ces deux caractéristiques du produit final, l'épaisseur de la couche externe et la dimension des billes, ont donc une importance sur le déroulement des fermentations en bouteille.

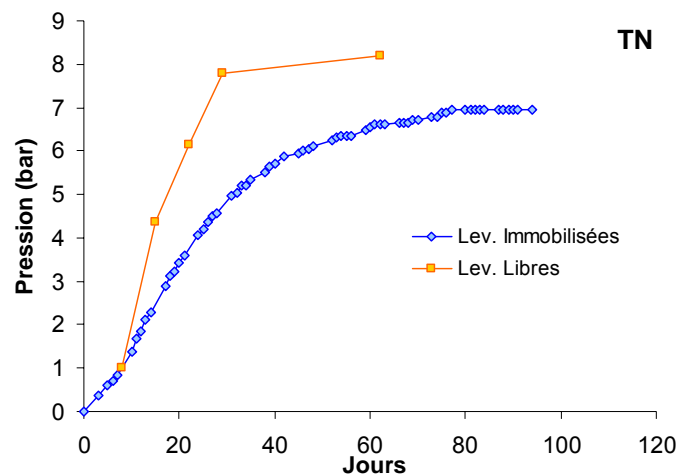
On a pu constater avec ces essais que les paramètres opératoires de production évalués ont une influence dans la performance du produit final.

4.4.6. Comparaison avec des levures libres

Sur la majeure partie des marchés toute nouvelle technologie qui a la prétention d'être une alternative aux existantes, est inévitablement comparée avec elles. Le cas des levures immobilisées pour la production de vins effervescents ne fait pas exception. La production de vins effervescents en faisant appel à des levures libres pour la réalisation de la seconde fermentation en bouteille se fait depuis plusieurs siècles. Avec le passage des années et le manque d'alternatives, la méthodologie de production avec des levures libres s'est enracinée non seulement dans les caves mais aussi dans l'esprit des producteurs. Pour cette raison, et indépendamment des avantages d'assouplissement et de simplification du processus productif que les levures immobilisées peuvent apporter, elles doivent être comparées avec les levures libres. Il faut ainsi démontrer que techniquement les levures immobilisées permettent de produire des vins effervescents de qualité semblable à ceux produits avec les levures libres.

Ainsi les mêmes vins ont été mis en fermentation (14°C) soit avec les levures immobilisées (1,2 g/bouteille soit $4\text{-}5 \cdot 10^6$ cell/mL) soit avec des levures libres ($2\text{-}4 \cdot 10^6$ cell/mL).

La Figure 4-15 présente l'évolution de la pression au long du temps pour les vins TN, MF et MM (Essai FB1) fermentés avec des levures immobilisées et avec des levures libres.



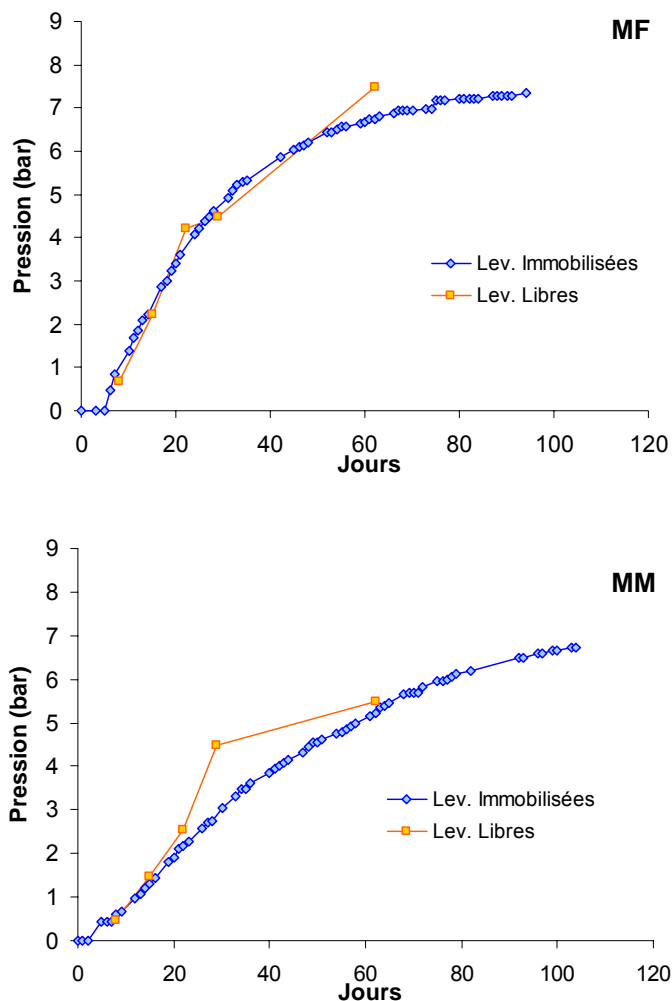


Figure 4-15 Évolution de la pression au cours du temps pour les vins TN ; MF ; MM fermentés avec des levures libres et avec des levures immobilisés. (Essai FB1 ; FES ; Dose = 1,2 g/bouteille ; T_{ferm} = 14°C)

On constate que le vin TN fermenté avec les levures libres a une cinétique de fermentation plus rapide et une pression finale supérieure à celle obtenue avec les levures immobilisées.

Le profil de consommation plus rapide peut s'expliquer par l'inoculation d'une population cellulaire plus élevée. L'inoculum de levures libres a été préparé dans la cave selon le protocole interne de la société productrice de vins. Selon eux l'inoculum est préparé afin de s'obtenir environ $2 \cdot 10^6$ cell/mL, néanmoins il n'existe pas de registres de comptages cellulaires du pied-de-cuve ou pendant la fermentation en bouteille. Il est donc possible que la population inoculée ait été plus élevée que celle inoculée avec les levures immobilisées ($4,5E+06$ cél/ml). On peut aussi penser à l'existence de limitations diffusionnelles à travers la couche d'alginate dans les levures immobilisées, qui conduirait à une fermentation nécessairement plus lente qu'avec des levures libres, mais si ç'était le cas on devrait le vérifier aussi sur les autres fermentations.

La pression finale plus élevée (en cellules libres) est due à un dosage excessif de sucre dans le vin de base et non à une fermentation incomplète de la part de levures immobilisées comme on

pourrait le penser. En effet, la mesure des sucres (Tableau 4-34-3) a confirmé qu'après 3 mois il n'existe pas de sucres résiduels dans le vin TN fait avec des levures immobilisés, ce qui démontre que la fermentation a été complète.

Dans le vin MF (Figure 4-15-b) la vitesse de fermentation a été très semblable jusqu'au 30^{ème} jour. À partir de là, les levures libres ont été plus rapides car la fermentation a été achevée en environ 60 jours tandis que les levures immobilisés ont eu besoin de 20 jours de plus pour atteindre la même pression.

Dans le vin MM (Figure 4-15) la vitesse de fermentation avec des levures libres et avec les levures immobilisées a été identique.

Tableau 4-3 – Sucres résiduels dans les vins TN, MF et MM fermentés avec levures libres et levures immobilisées (mesures réalisées 3 mois après le tirage)

	TN		MF		MM	
	Libres	Immobilisées	Libres	Immobilisées	Libres	Immobilisées
Sucre (g/L)	0,25	0,20	0,33	0,26	1,64	0,67

Indépendamment de la vitesse de fermentation, on constate à partir du tableau 4-3 que 3 mois après le tirage, la concentration de sucres est inférieure à 0,7 g/L pour tous les vins élaborés avec des levures immobilisées, et même inférieure à 0,4 g/L pour deux d'entre eux.

Pour les vins TN et MF les sucres ont été complètement consommés tant par les levures libres que par les levures immobilisées. Dans le cas du MM, qui est le vin qui a présenté une fermentation plus lente, on observe que les levures immobilisées ont consommé le sucre plus complètement que les levures libres qui ont laissé environ 1,64 g/L. Si cette valeur n'est pas très élevée pour un vin effervescent elle est quand même plus élevée que les autres de cet essai.

On a aussi analysé d'autres paramètres chimiques liés directement au processus de fermentation pour voir si on détectait des différences entre les fermentations réalisées avec les levures immobilisées et celles réalisées avec les levures libres. Les graphiques de la Figure 4-16 présentent les résultats de ces analyses pour chacun des vins.

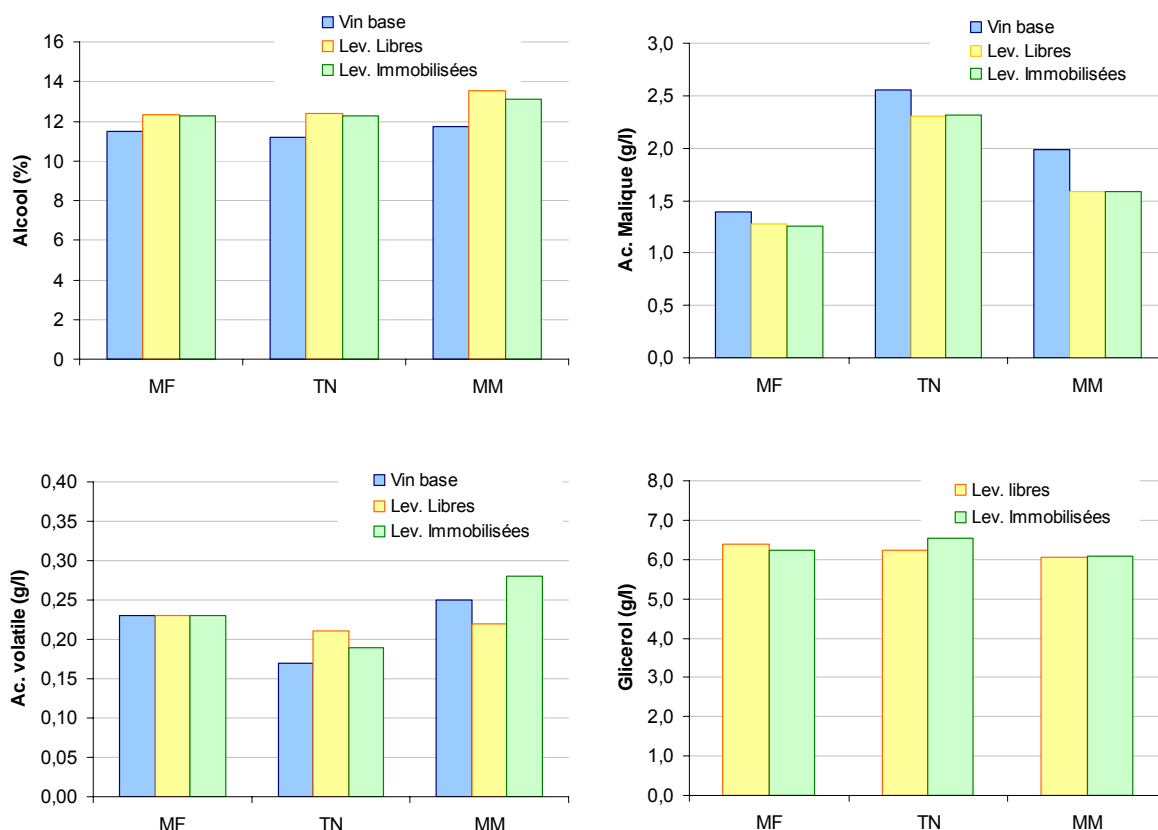


Figure 4-16 Concentrations d'éthanol, d'acide malique, d'acidité volatile et du glycérol mesurées 3 mois après le tirage pour les TN ; MF et MM de l'essai FB1 élaboré avec des levures immobilisés et libres.

Concernant l'éthanol, il n'existe pas de différences entre les vins fermentés avec des levures libres et ceux obtenus avec les levures immobilisées.

En ce qui concerne l'acide malique, on observe une chute de sa concentration par rapport au vin de base mais on n'observe pas des différences entre les vins fermentés avec les levures libres et avec les levures immobilisées. Nous pensons que la diminution de l'acide malique n'est pas due à une consommation par des levures ou d'éventuelles bactéries lactiques de contamination mais doit plutôt être attribuée à la dilution introduite par l'addition de la liqueur de tirage, ainsi qu'à une faible consommation par les levures de fermentation (libres ou immobilisées). En effet, d'une part, la mesure a été réalisée avant l'addition de la liqueur de tirage. D'autre part, s'il existait des bactéries lactiques (ou des levures de contamination) dans les bouteilles inoculées avec les levures immobilisées, elles seraient à l'origine d'un trouble ou d'un dépôt, ce que l'on n'observe pas.

En ce qui concerne l'acidité volatile, on observe qu'elle ne se modifie pas par rapport au vin de base. Cette affirmation est valable tant pour les levures immobilisées que pour les libres.

De même, les analyses du glycérol ne montrent pas de différences significatives entre les vins produits avec des levures libres et ceux produits avec les levures immobilisées.

Ainsi pour ces 4 paramètres physique-chimiques analysés, on n'a pas trouvé de différence significative entre le vin produit avec les levures immobilisées et le vin produit avec les levures libres.

Plusieurs études ont démontré que pendant le vieillissement sur lattes des vins effervescents il y a des modifications dans la composition chimique du vin dues surtout au phénomène d'autolyse des levures. Les principaux changements connus sont l'augmentation de la concentration d'acides aminés, la diminution des protéines, la présence de peptides de différentes tailles et l'augmentation de la concentration des polysaccharides. La libération des polysaccharides est fonction de la souche de levure, de la température et du temps de vieillissement (Moreno-Arribas et al. 2000).

Les polysaccharides présents dans le vin, ainsi que les composés azotés jouent un rôle primordial sur la qualité de la mousse formée. Moreno-Arribas et al. (2000) ont démontré qu'il existe une relation entre la hauteur maximale de la mousse formée et la concentration des polysaccharides dans le vin. Ce paramètre joue donc un rôle important dans l'aspect final du vin et il doit être évalué pour les vins mousseux fermentés avec des levures immobilisées.

Les concentrations des polysaccharides totaux dans les 3 vins ont été évaluées et les résultats sont présentés dans la Figure 4-17.

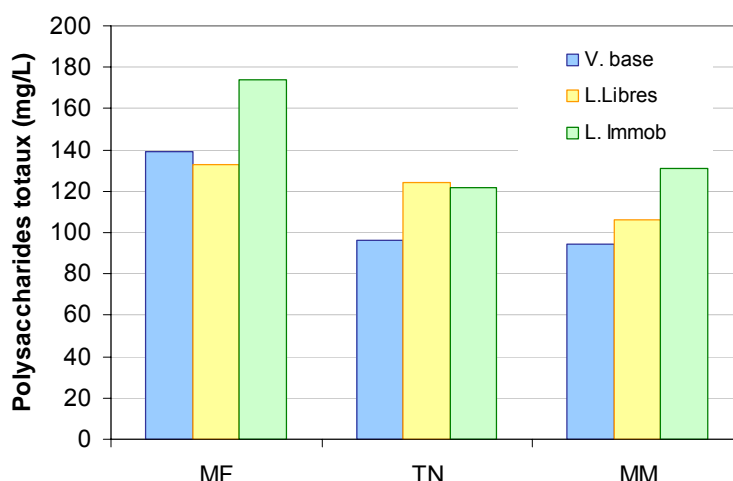


Figure 4-17 Concentrations des polysaccharides totaux dans les vins de base MF, TN et MM, et mesurées 3 mois après la fin de la fermentation alcoolique réalisée avec des levures libres et des levures immobilisées.

Par rapport aux vins de base, on constate que les vins fermentés avec les levures immobilisées présentent toujours une augmentation de la concentration des polysaccharides totaux. Cette augmentation est de 25% pour les vins MF et TN, et de 39% pour le vin MM. Le vin TN fermenté avec les levures libres présente aussi une augmentation significative (29%) mais les autres ont eu des variations inférieures à 10%. Le fait que les vins MF et MM fermentés avec les levures immobilisées possèdent des concentrations supérieures de polysaccharides par rapport aux vins fermentés avec les levures libres peut indiquer que les levures immobilisées ont initié l'autolyse plus tôt.

On peut ainsi conclure que les levures immobilisées libèrent des quantités de polysaccharides égales ou supérieures aux levures libres et que donc la qualité de la mousse ne devrait pas être affecté par ce paramètre.

L'analyse sensorielle est la preuve finale et déterminante de la qualité d'un vin, puisque c'est celle-ci qui permet de connaître le degré d'acceptation du produit de la part du consommateur. Dans cet objectif nous avons confié l'analyse sensorielle des vins à la Comissão Vinicola da Região dos Vinhos Verdes (CVRVV). Les résultats de cette analyse sont exprimés dans la Figure 4-18.

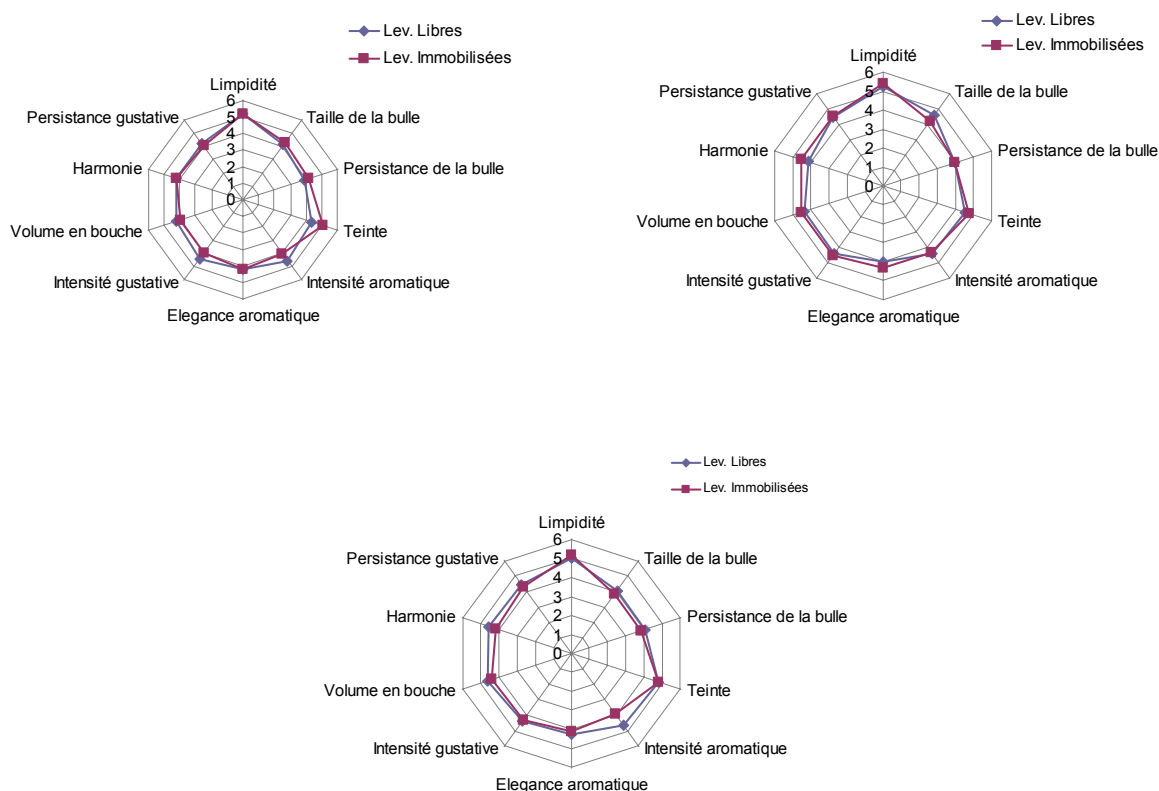


Figure 4-18 Résultats de l'analyse sensorielle pour les vins) MF ; b) TN et c) MM de l'essai FB1 produits avec des levures immobilisés et avec des levures libres.

À partir de la Figure 4-18, on peut conclure que d'une manière générale les vins présentent une bonne qualité, en oscillant entre 4 et 5 points pour presque tous les descripteurs. On observe que les vins fermentés avec les levures immobilisées sont en tous points semblables aux vins fermentés avec les levures libres.

Les résultats que l'on vient de présenter sont relatifs à l'essai FB1 où le tirage avec des levures libres a été réalisé dans une cave et le tirage avec des levures immobilisées a été réalisé au laboratoire, avec les mêmes vins. La levure immobilisée a été produite conformément à la FES, inoculée à la dose de 1,2 g/bouteille. Après tirage les bouteilles inoculées avec les levures

libres et avec les levures immobilisées ont été mises en fermentation dans une chambre réfrigérée à la température de 14°C. Dans ces conditions, nous avons pu conclure que les levures immobilisées ont une performance semblable aux levures libres.

Néanmoins les essais réalisés en 4.3 et 4.4 ont démontré que d'un point de vue de cinétique la dose de 1,2 g/bouteille et la FES ne sont pas les conditions les plus appropriées pour réaliser avec sécurité les fermentations en bouteille à la température de 10°C. Les fermentations sont lentes et à la fin le vin peut présenter un taux de sucres résiduels élevé. On en a conclu que les conditions les plus favorables sont d'utiliser une dose supérieure à 1,6 g/bouteille et la formulation FE2. Afin de comparer la performance de ces nouvelles conditions de production et de mise en œuvre des levures immobilisées, on a réalisé un nouvel essai - FB3.

Dans cet essai FB3 on a réalisé deux tirages industriels du même vin : l'un avec des levures immobilisées et l'autre avec des levures libres. Les fermentations ont été réalisées en cave à une température de 10°C.

La formulation de production employée a été la FE2 et la dose de levures immobilisées a été de 1,8 g/bouteille. En effet, pour minimiser le risque de fermentations lentes et vu le nombre élevé de bouteilles engagé dans l'essai (donc le coût du risque), la dose utilisée a été légèrement supérieure à celle de 1,6 g préalablement identifiée comme en étant la dose à utiliser pour des essais à 10°C. Les résultats du suivi de la fermentation sont présentés dans la Figure 4-19.

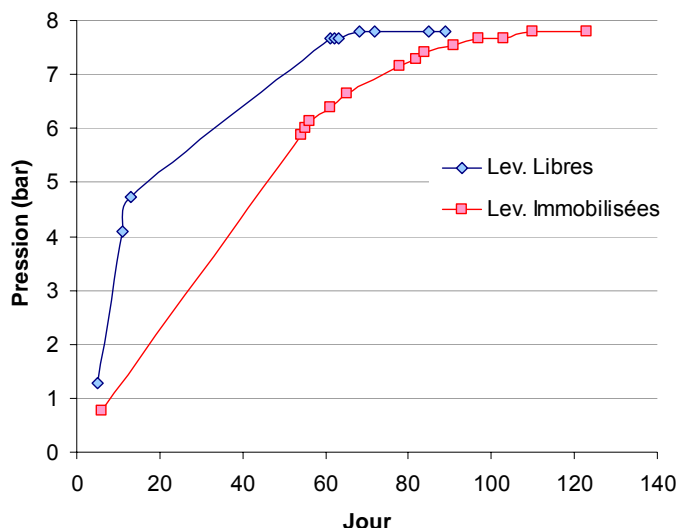


Figure 4-19 Évolution de la pression au cours du temps pour le vin J64 fermenté avec des levures libres et avec des levures immobilisées. La fermentation s'est déroulée en cave à une température proche de 10°C. (Essai FB3 ; vin J64 ; FE2 ; Dose = 1,8g ;)

On constate que les levures libres ont conclu la fermentation en environ 70 jours, tandis que les levures immobilisées ont eu besoin de 110 jours. Comme la population de levures libres inoculées n'est pas connue, il est impossible d'expliquer si une telle différence est due au fait que la population de cellules libres est supérieure à celle des immobilisées. Néanmoins nous

pensons que la population de levures libres ne devait pas être sensiblement supérieure à celle des levures immobilisées car cette dernière avait déjà une valeur importante ($1,1 \times 10^7$ cel/ml) en raison de la dose élevée employée (1,8 g/bouteille). Pour justifier les différences dans les temps de fermentation les explications les plus plausibles s'appuient selon nous sur:

1. l'existence d'éventuelles limitations diffusionnelles des sucres dans le cas des levures encapsulées. Il est important de ne pas oublier que les cellules immobilisées, en sus d'être protégées par une barrière d'alginate qui peut introduire des limitations à la diffusion du sucre, s'accumulent dans une zone très limitée de la bouteille.. Cette situation peut conduire à la formation d'un gradient de sucre à l'intérieur de la bouteille, plus accentué que celui existant avec les levures libres, où les cellules tendent à occuper tout un quart de cercle latéral des bouteilles. Ces deux phénomènes unis peuvent réduire la vitesse de fermentation des levures immobilisées comparativement avec les levures libres.
2. le fait que le producteur où l'essai a été réalisé, prépare un pied-de-cuve où les levures sont adaptées à des fermentations à faibles températures. Le producteur nous a informés que cette adaptation est fondamentale pour garantir une bonne cinétique fermentaire. Les levures encapsulées n'ont pas été soumises à une telle adaptation, ni pendant le processus de fabrication, ni avant l'inoculation. De toute façon, c'est impossible de réaliser une telle adaptation avant l'inoculation car les levures immobilisées sont sous forme sèche et celle ci est la seule forme sous laquelle elles peuvent être dosées dans la bouteille. L'adaptation au froid pendant la production devra être analysée dans l'avenir.

La Figure 4-20 permet de comparer la cinétique de fermentation obtenue en cave avec celle obtenue en laboratoire, pour les mêmes conditions d'immobilisation (FE2) et dose d'inoculation (1,8 g).

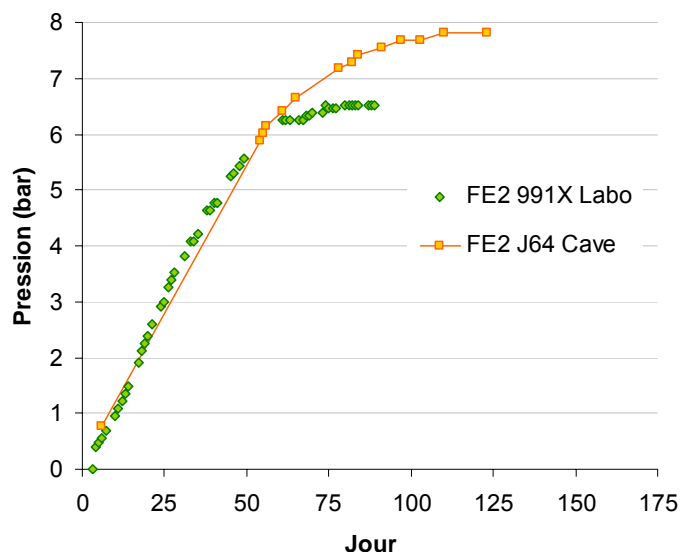


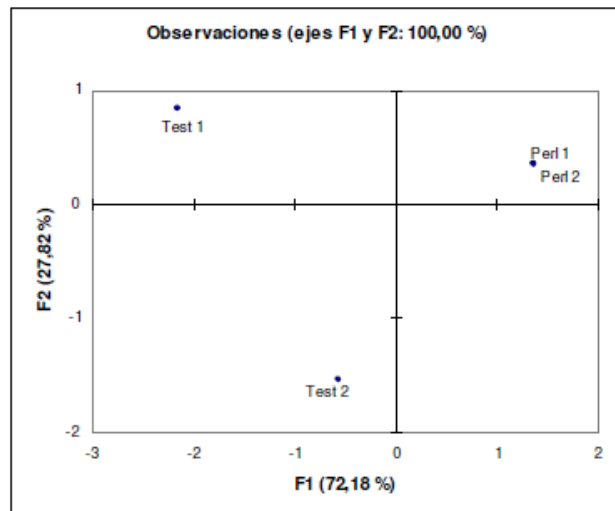
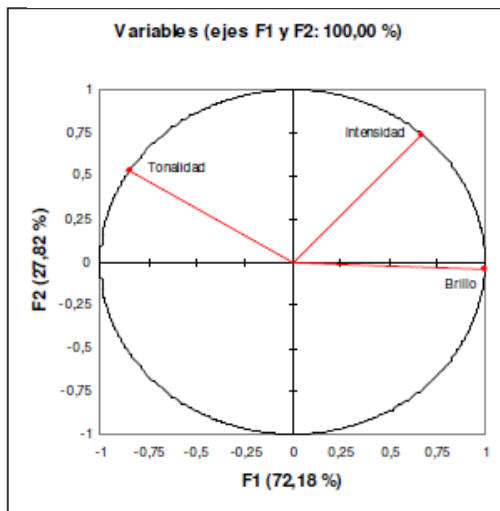
Figure 4-20 Évolution de la pression dans le vin 991X fermenté dans le laboratoire (Essai FB2 ; FE2 ; Dose = 1,8 g/bouteille ; Tferm = 10°C) et le vin J64 fermenté en cave (Essai FB3 ; FE2 ; Dose = 1,8 g/bouteille ; Tferm = 10°C).

Bien que ces deux cinétiques de fermentation aient été obtenues avec des vins différents, il est possible de constater que les profils de pression jusqu'au jour 60 sont très semblables. La fermentation en cave a pris un peu plus temps à finir que celle du laboratoire parce qu'il y avait une concentration de sucre initial supérieure comme le prouve la valeur finale de la pression. Ces résultats valident la formulation FE2 et la dose de 1,8 g/bouteille dans des fermentations industrielles à la température de 10°C.

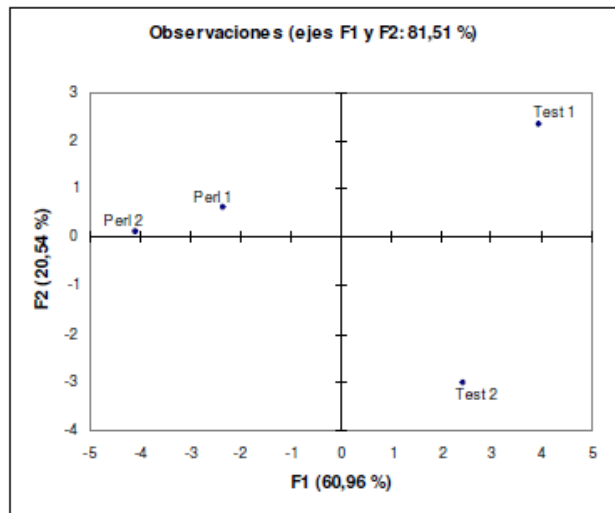
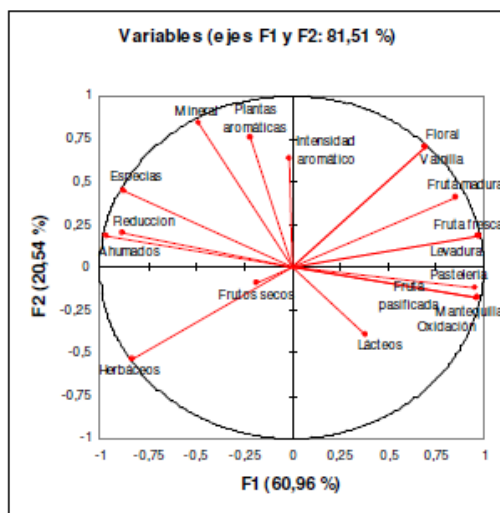
Une année et quatre mois après le tirage, on a réalisé une analyse sensorielle descriptive selon la norme ISO11035 pour les vins fermentés avec des levures immobilisées et libres. Pour chaque vin, on a soumis deux bouteilles à dégustation.

La Figure 4-21 présente les résultats de la dégustation descriptive après avoir été traitée par analyse en composantes principales. Les données provenant des différentes phases de la dégustation ont été traitées séparément.

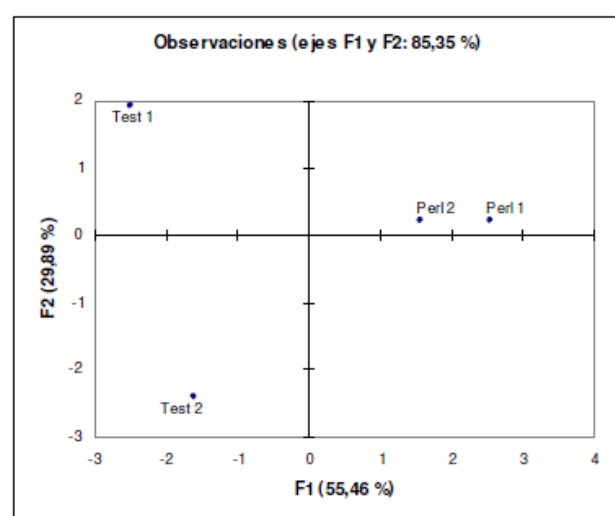
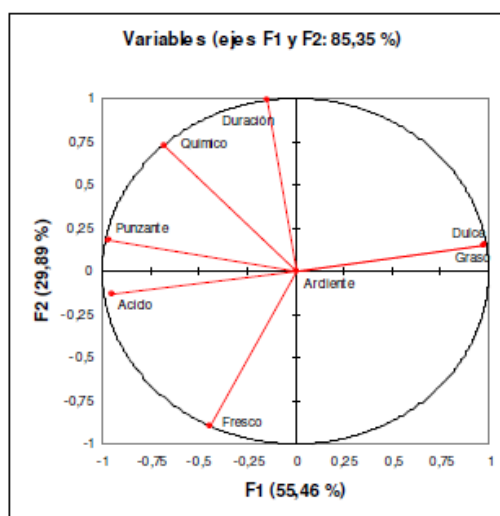
1. Phase visuelle



2. Phase aromatique



3. Phase gustative



4. Phase retronasale

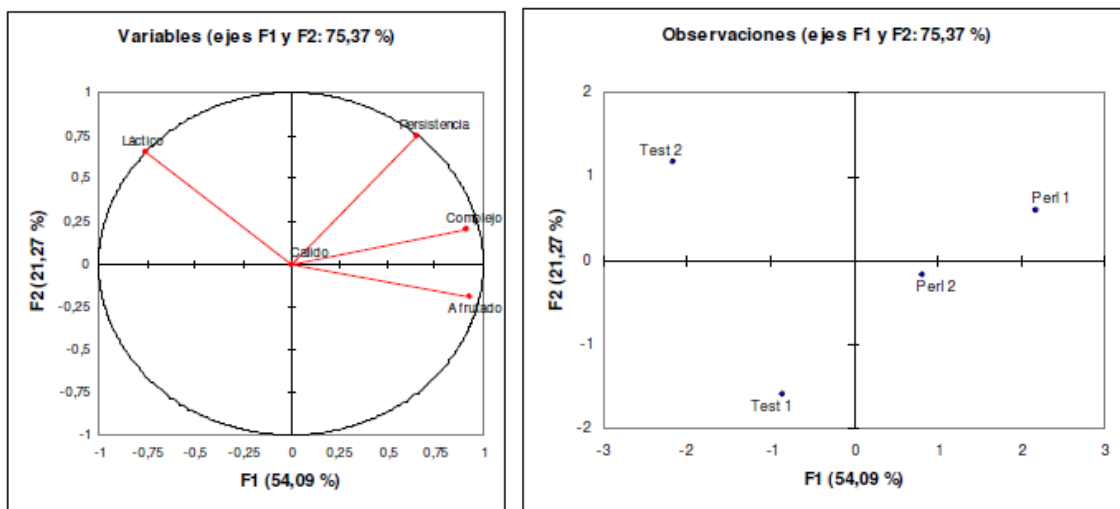


Figure 4-21 Résultats de l'analyse descriptive du vin J 64 réalisé une année et quatre mois après le tirage, Test 1 et 2 - vin fermenté avec des levures libres, Perl 1 et 2 - vin fermenté avec des levures immobilisées (Essai FB3, FE2 ; Dose = 1,8 g/bouteille ; Tferm = 10°C)

On observe que d'une manière générale les bouteilles fermentées avec les levures immobilisées sont plus homogènes que celles fermentées avec les levures libres. Dans la phase visuelle, les échantillons fermentés avec les levures immobilisées présentent plus de luminosité et d'intensité. Dans la phase aromatique il y a une nette séparation entre les deux technologies. Les levures libres ont les vins plus éloignés entre eux, dans une bouteille on perçoit des arômes plus oxydés et laiteux et dans l'autre plus fruités. Les échantillons avec des levures immobilisées tendent plus pour des notes d'herbes aromatiques, de réduction, fumés et minéraux. En bouche, les échantillons avec les levures immobilisées sont encore plus proches entre eux et sont plus homogènes. Ils sont décrits comme ayant plus de volume en bouche, tandis que les échantillons référents aux levures libres ont plus d'acidité et plus de longueur en bouche. Dans la phase retronasale les échantillons avec les levures immobilisées sont plus complexes, fruités et persistants.

Bien que les levures immobilisées induisent une cinétique de fermentation plus lente que les libres les résultats de l'analyse sensorielle montrent que les fermentations avec les immobilisées tendent à être plus homogènes. Ceci peut s'expliquer par le fait que la population cellulaire est très semblable dans toutes les bouteilles inoculées et que depuis le début jusqu'à la fin de la fermentation la population se maintient sensiblement constante (données non présentées). Avec les levures libres c'est difficile de garantir une distribution homogène des cellules dans les bouteilles du début jusqu'à la fin du tirage ; il est donc sur qu'il existe des bouteilles avec une population initiale supérieure à d'autres. En outre, les levures libres se multiplient à l'intérieur de la bouteille sans aucun contrôle externe, ce qui fait qu'elles peuvent atteindre des populations finales distinctes, qui pourront être encore davantage distinctes si les populations initiales sont déjà différentes.

Dans ce cas spécifique, les levures immobilisées conduisent à des appréciations plus favorables ce qui démontre qu'elles contribuent à produire des vins de qualité semblable ou meilleure que les levures libres. Il faut avoir toujours présent à l'esprit que l'état physiologique des cellules au moment de l'inoculation a un impact non seulement sur la performance fermentaire mais aussi sur la qualité sensorielle du vin fermenté.

4.4.7. Influence des activateurs de fermentation

Dans le point 4.4.1, on a prouvé que le vin de base a une influence sur la cinétique de fermentation et que même en maîtrisant certains paramètres de base (pH, SO_2 , alcool, température de fermentation), il peut exister d'autres facteurs pour lesquels les laboratoires d'œnologie ne disposent pas des moyens analytiques nécessaires pour les identifier et qui interviennent dans la performance de la levure, en modulant ainsi les temps de fermentation. Ces facteurs peuvent être liés à des manques nutritionnels ou peuvent être des composés toxiques (produits phytosanitaires, acides gras saturés de chaîne moyenne, etc).

L'expérience acquise par Proenol montre que les producteurs de vin sont de plus en plus soigneux dans la gestion des produits utilisés non seulement à la vigne, dont peuvent provenir les inhibiteurs phytosanitaires, mais aussi dans la gestion de la 1^{ère} fermentation où ils font appel à des produits qui vont des levures sèches actives jusqu'aux autolysats de levures en passant par les sels d'ammonium et enzymes. Néanmoins on constate que pour la 2^{nde} fermentation en bouteille, ces soins et préoccupations ne sont pas si présents.

L'addition d'autolysats de levures au moût est une des façons les plus usuelles d'empêcher des facteurs inhibiteurs de la fermentation, tels que des manques nutritionnels et/ou la présence de composés toxiques, d'intervenir dans la cinétique de dégradation des sucres. Néanmoins une telle pratique n'est pas classique pour la 2^{nde} fermentation en bouteille. Ainsi, l'objectif de cette partie du travail est d'évaluer si l'addition d'un activateur de fermentation peut améliorer (rendre plus rapide) la cinétique de fermentation en bouteille et si elle peut contribuer à atténuer la variabilité existante dans les profils de fermentation entre différents vins.

Dans l'essai FB4 réalisé en laboratoire, on a évalué l'effet de l'addition d'un activateur de fermentation (Fermaid 2133) à 3 vins différents : ES, PT et IT. Les valeurs de pH, de SO_2 libre et d'alcool sont dans la gamme usuelle pour le vin IT. Dans le vin ES l'alcool mesuré est de 12,0 % ce qui est plus élevé que ce que l'on recommande pour l'utilisation des levures encapsulées (11,5 %) et dans le vin PT, le pH est de 2,93 bien au dessous des 3,0 recommandés. Malgré l'existence de ces petits écarts aux valeurs recommandées, on a réalisé les tirages.

Les résultats des cinétiques de fermentation sont présentés dans la Figure 4-22.

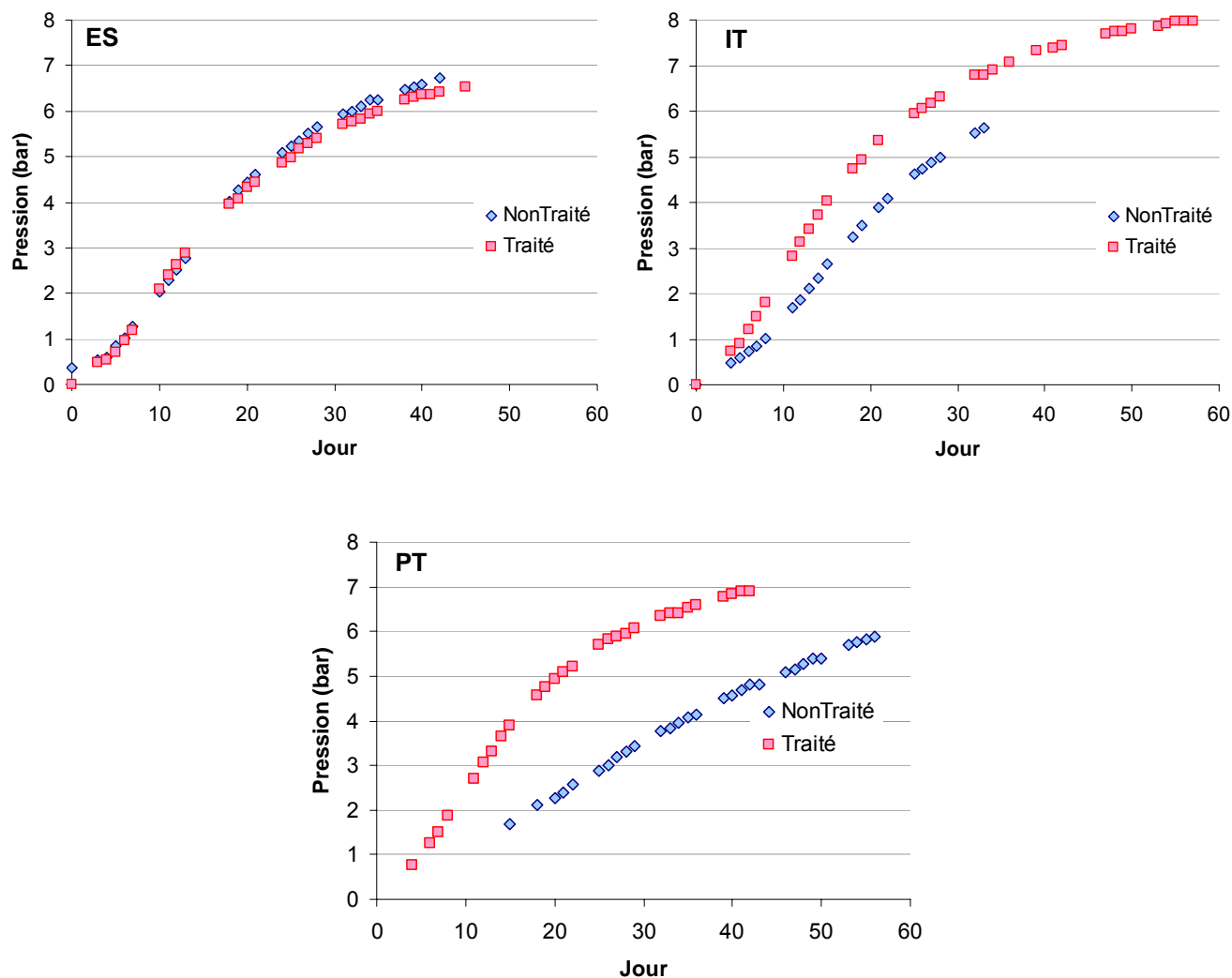


Figure 4-22 Évolution de la pression au cours du temps dans les vins ES, IT et PT fermentés au laboratoire (Analyse FB4 ; FES ; Dose = 1,2 g/bouteille ; T_{ferm} = 14°C). Traité - Vin avec addition d'activateur de fermentation ; Non Traité - Vin sans addition d'activateur de fermentation

On observe que dans le cas du vin ES les profils d'évolution de pression sont parfaitement superposables, ce qui prouve que l'activateur de fermentation n'a pas eu d'effet. Par contre dans les vins IT et PT on constate que le traitement avec l'activateur de fermentation a accéléré l'augmentation de la pression, ce qui traduit une consommation des sucres plus rapide. Cette accélération est plus notable dans le vin PT que dans le vin IT.

En complément de cette analyse entre vin traité et vin non traité pris séparément, il est aussi intéressant de comparer simultanément le profil des 3 vins non traités avec le profil des 3 vins traités.

La Figure 4-23 représente graphiquement l'évolution des 3 vins sans activateur et avec activateur de fermentation.

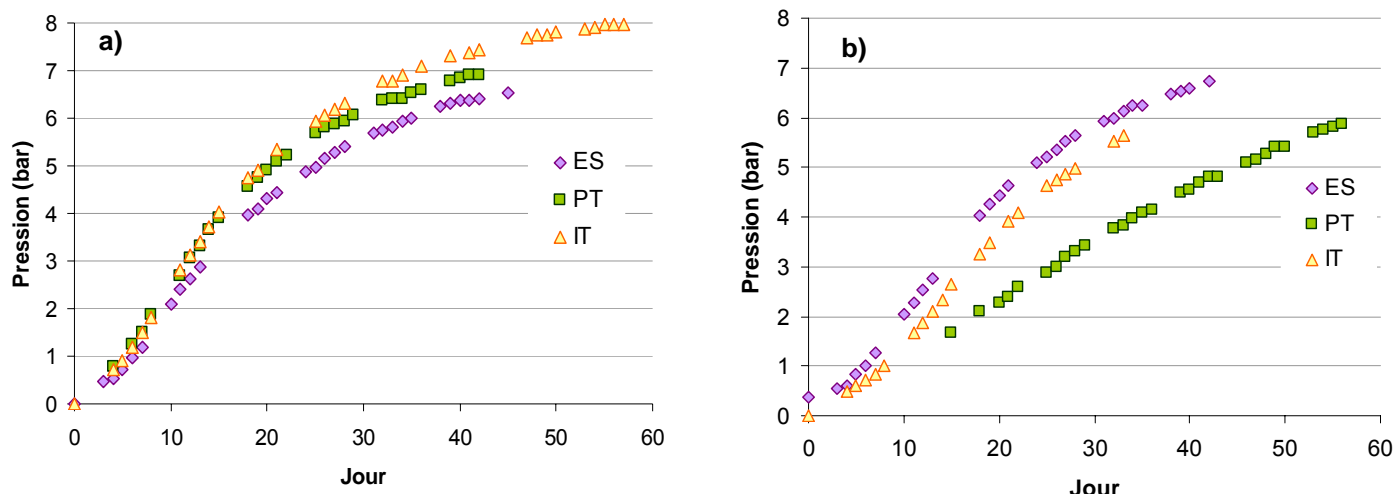


Figure 4-23 Évolution de la pression au cours du temps dans les vins ES, IT et PT fermentés au laboratoire a) Traité - Vin avec addition d'activateur de fermentation b) Non Traité - Vin sans addition d'activateur de fermentation (Analyse FB4 ; FES ; Dose = 1,2 g/bouteille ; T_{ferm} = 14°C).

A partir de la Figure 4-23-b, on constate que les vins sans traitement présentent des profils de fermentation distincts et éloignés entre eux. Avec traitement, les profils deviennent plus proches comme on l'observe dans la Figure 4-23-a. Ainsi on peut conclure que pour les vins essayés l'addition de l'activateur de fermentation diminue la variabilité associée à la consommation des sucres en rendant la performance des levures encapsulées très semblable même si les vins sont initialement différents. En outre, on observe que les vins PT et IT sans traitement étaient plus lents que le ES mais qu'avec le traitement ils se sont devenus légèrement plus rapides.

Les résultats obtenus prouvent que l'addition d'autolysats de levures à des vins pour la seconde fermentation peut avoir un effet positif, dans le sens où la fermentation sera plus rapide et en conséquence plus sûre. Néanmoins, les données dont nous disposons ne permettent pas d'identifier la manière d'action de l'activateur de fermentation. Il reste à savoir si les améliorations constatées dans les vins PT et IT sont dues à la supplémentation en quelque composé important qui manquait pour le métabolisme des levures (comme par exemple des vitamines, acides aminés, oligoéléments) ou si ces améliorations sont imputables à l'adsorption de composés toxiques par des écorces de levure. La porte est donc ouverte à la réalisation de travaux futurs sur ce sujet, qui dépasse la simple évaluation que l'on voulait réaliser dans le présent travail.

4.4.8. Conclusion

À partir des essais réalisés, il est possible de conclure que le vin de base a une influence sur la cinétique de la seconde fermentation en bouteille, même quand les caractéristiques du vin sont apparemment correctes. On a vérifié que pendant la fermentation les levures immobilisées perdent lentement leur viabilité. Vers la fin de la fermentation il y a encore 80 à 85% de cellules viables. Mais quand la pression dépasse les 6 bars qui correspondent à l'épuisement des sucres la perte de viabilité est très rapide.

On a constaté aussi que la température a un effet prononcé dans l'évolution de la fermentation. Des températures de l'ordre de 10°C réduisent drastiquement la vitesse de fermentation par rapport à ce que l'on observe à 14°C. Une façon d'augmenter la vitesse à 10°C passe par l'augmentation de la dose de levure immobilisée. Néanmoins des doses supérieures à 1,6 g/bouteille n'apportent pas d'avantages.

La formulation d'immobilisation a une influence sur l'évolution des fermentations à 10°C. La formulation qui a donné de meilleurs résultats (FE2) a été celle qui a produit des billes plus petites et avec une couche externe plus fine.

Les essais comparatifs avec des levures libres ont prouvé que d'un point de vue cinétique les levures immobilisées peuvent conduire à des fermentations légèrement plus lentes. Les analyses chimiques n'ont pas montré de différences entre le vin produit avec les levures immobilisées et celui obtenu avec les levures libres. Du point de vue sensoriel les vins fermentés à 14°C se sont montrés identiques indépendamment de la levure utilisée. À 10°C le profil sensoriel des vins fermentés avec les levures immobilisés s'est montré plus homogène que celui fermenté avec les levures libres.

On a vérifié que l'addition d'activateurs de fermentation contribue à rendre les cinétiques de fermentation de différents vins, inoculés avec des levures immobilisées, plus homogènes.

***DÉSACIDIFICATION BIOLOGIQUE DES MOÛTS ET
DES VINS AVEC SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE
IMMOBILISÉE***

5. Désacidification biologique des moûts et des vins avec *Schizosaccharomyces pombe* immobilisée

5.1. Bibliographie

5.1.1. L'acidité du vin

L'acidité est un paramètre clé qui contribue non seulement à l'équilibre organoleptique des vins mais aussi à leur stabilité pendant la conservation. En œnologie l'acidité d'un moût ou d'un vin est évaluée par la mesure de l'acidité totale exprimée en équivalent de grammes d'acide sulfurique par litre ou en équivalents de grammes d'acide tartrique par litre. Les composés qui contribuent à l'acidité d'un vin sont les acides organiques qui proviennent du raisin (essentiellement de la pulpe de la baie) ou résultent des phénomènes fermentaires. Présentés selon leur provenance (Palacios et al., 2006), les principaux acides sont :

- Provenant du raisin : l'acide L-tartrique, l'acide L-malique, l'acide citrique, l'acide L-ascorbique, l'acide oxalique et l'acide fumarique.
- Provenant des raisins avec botrytis : l'acide glucuronique, l'acide galacturonique, l'acide gluconique, l'acide mucique et l'acide ceto-gluconique.
- Résultant des processus fermentaires : l'acide L-lactique, l'acide succinique, l'acide pyruvique, l'acide acétique, l'acide citramalique, l'acide glycérique, l'acide diméthylglycérique, l'acide formique et les acides gras saturés et insaturés.

La manque d'acidité se traduit par une manque de brillance et d'arôme ce qui confère au vin un caractère gustatif plat, sans consistance et vide. En contrepartie un excès d'acidité conduit à une agressivité qui peut être négative. Ainsi, pour que le vin soit équilibré il doit présenter une acidité appropriée (Palacios et al., 2006).

Les acides tartrique et malique sont les deux principaux acides du vin et pratiquement ce sont eux qui déterminent l'acidité totale. Si l'acide tartrique prédomine le vin aura un caractère métallique et dur, si c'est l'acide malique, le caractère sera celui de fruit vert.

La concentration en acide malique du moût est variable d'une année à l'autre car elle dépend beaucoup des conditions météorologiques qui précèdent la période de la vendange. Elle dépend aussi de la variété du raisin et du complexe sol-microclimat où est cultivée la vigne. Dans la région du Vinho Verde au nord du Portugal il n'est pas rare de trouver des moûts avec 9 à 10 g/L d'acide malique. Au Canada également, dans la région du Niagara, un cépage rouge très utilisé, le Baco Noir, présente des niveaux d'acide malique très élevés, allant jusqu'à 12 à 15g/L. Dans ces cas extrêmes, pour réussir à produire un vin équilibré, il est indispensable de réduire la concentration de cet acide. Mais ce n'est pas seulement dans des cas extrêmes comme celui-ci qu'il peut être important de procéder à la désacidification. Beaucoup d'œnologues préfèrent enlever/transformer l'acide malique, même quand il est présent à basse

concentration ; en effet, sa consommation non contrôlée par des microorganismes présents dans le vin peut modifier négativement son profil sensoriel. En comparaison avec l'acide malique l'acide tartrique est plus stable vis-à-vis de l'action de bactéries et de levures.

5.1.2. Les outils pour la gestion de l'acidité du vin

À l'heure actuelle il existe deux voies distinctes pour la désacidification des mûts: la voie chimique et la voie biologique.

La désacidification chimique est réalisée en faisant appel au carbonate de calcium, au bicarbonate de potassium ou au tartro-malate de calcium. Le carbonate et le bicarbonate précipitent seulement l'acide tartrique, en n'ayant pas d'effet sur l'acide malique. Le tartro-malate de calcium induit la précipitation des deux acides. Néanmoins, ces sels ont le désavantage de modifier d'autres composantes de la qualité, appartenant à la fraction aromatique. En outre, les vins peuvent devenir vides et secs en bouche (Palacios et al., 2006 ; Ribéreau-Gayon et al., 1998)

La désacidification biologique peut être réalisée tant par des bactéries que par des levures, puisque les deux peuvent agir sur l'acide malique.

▪ Désacidification par des bactéries lactiques

Sans aucun doute, l'utilisation des bactéries lactiques, par la réalisation de la fermentation malolactique (FML), est la méthodologie la plus répandue et utilisée par les œnologues. Dans la FML l'acide malique (dicarboxylique) est décarboxylé en acide lactique (monocarboxylique) par action de l'enzyme malolactique (Lonvaud-Funel et al., 2010). La FML peut être induite par l'inoculation de bactéries lactiques sélectionnées ou réalisée par les bactéries indigènes présentes dans le vin. Outre la diminution de l'acidité des vins qu'elle provoque, la fermentation malolactique est aussi impliquée dans l'augmentation de la complexité du vin et dans la stabilité de la couleur (Palacios et al., 2006). Le résultat peut être apprécié ou au contraire indésirable selon les composés produits et le type de vin concerné. Les producteurs ne sont normalement pas favorables à la réalisation de la fermentation malolactique dans des vins blancs dont l'intérêt aromatique dépend de l'existence de molécules qui sont détruites par les bactéries. En contrepartie, la FML peut être désirée pour des vins blancs de garde caractérisés par des arômes secondaires associés aux bactéries (Lonvaud-Funel et al. 2010). Mais, les FML non contrôlées peuvent conduire à des « maladies » classiques comme celles de la graisse et de l'amertume, ainsi qu'à la production de composés considérés comme à risque pour la santé humaine, comme les amines biogènes.

▪ Désacidification par des levures *Saccharomyces*

Une autre possibilité pour la désacidification consiste à utiliser des levures de vinification du type *Saccharomyces*. Rankine (1966) a montré que des levures *Saccharomyces* ont la capacité à dégrader entre 3 et 45% de l'acide malique existant dans des mûts. Sur cet aspect, on

observe une très grande variabilité dans le genre *Saccharomyces* et certaines souches ne consomment pratiquement pas l'acide malique (Strehaiano et al., 2002)) Taillandier et al. (2001) ont évalué la consommation de l'acide malique par 5 souches commerciales de *S. cerevisiae*. Ces auteurs constatent que la diminution du pH et l'augmentation de la concentration initiale de l'acide malique favorisent la consommation de l'acide malique. Ainsi, en définitive, si quelques levures du type *Saccharomyces* peuvent consommer partiellement l'acide malique, les résultats sont très variables d'une souche à l'autre et dépendent aussi des conditions du milieu. En outre, il n'y a aucune souche qui réussisse une dégradation aussi complète que celle due aux bactéries lactiques.

▪ Désacidification par des levures *Schizosaccharomyces pombe*

Une autre approche qui s'est montrée très intéressante est l'utilisation de levures non *Saccharomyces* présentant une forte activité démalicante ; c'est le cas de *Schizosaccharomyces pombe*. Cette levure a la capacité de consommer l'acide malique en le transformant en éthanol et en dioxyde de carbone. Depuis ces 25 dernières années, *Shz pombe* a été l'objet de plusieurs études en vue de la désacidification de moûts, à l'échelle industrielle. Ces essais ont porté sur la mise en œuvre tant de cellules libres que de cellules immobilisées (Silva et al., 2003 ; Strehaiano et al., 2002 ; Taillandier, 1990).

5.1.3. Généralités sur *Schizosaccharomyces pombe*

Shz pombe est une levure de forme cylindrique de 6 à 8 µm de longueur et 2 à 3 µm de largeur et son mode de reproduction est la scissiparité. Ces caractéristiques morphologiques permettent de la distinguer facilement des autres levures de vinification (Taillandier, 1990)

Shz pombe réalise la fermentation malo-alcoolique (FMA), en transformant l'acide malique en éthanol. Le mécanisme biochimique communément accepté pour la décomposition de l'acide malique est présenté dans la Figure 5-1 et suit les étapes suivantes: l'acide malique est d'abord transformé en pyruvate par l'enzyme malique ; ensuite le pyruvate est intégré dans les réactions de la fermentation alcoolique en étant décarboxylé en éthanal, ce dernier étant à son tour réduit en éthanol (Fleet, 1993).

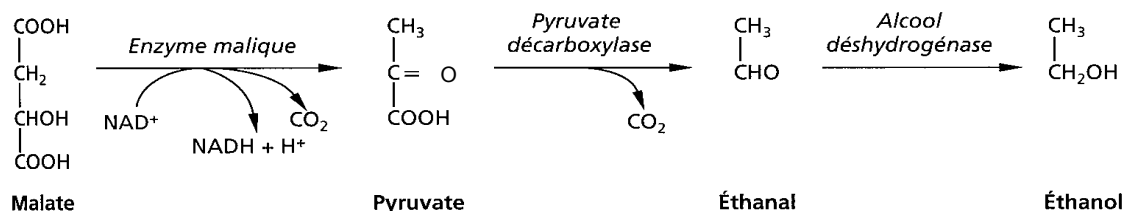


Figure 5-1 Réactions biochimiques de la décomposition fermentaire de l'acide malique par la levure *Shz pombe*.

En termes de bilan, par cette réaction, une molécule d'acide malique donne lieu à deux molécules de dioxyde de carbone et à une d'éthanol (Fleet, 1993). Dans des conditions

d'anaérobiose le rendement maximal théorique d'éthanol est de 0,1% (v/v) par gramme d'acide malique dégradé (Mayer et Temperli, 1963).

Selon Strehaiano et al. (2001) *Shz pombe* présente diverses particularités remarquables :

- Forte résistance à des concentrations élevées en sucre, ce qui rend possible son utilisation dans le moût
- Bonne tolérance aux basses températures, ce qui est essentiel pour la fermentation de moûts blancs
- Résistance exceptionnelle aux antiseptiques usuels en œnologie (anhydride sulfureux, acide sorbique)
- pouvoir alcoogène comparable à la celui des *Saccharomyces*
- capacité à dégrader l'acide malique en éthanol à un niveau élevé (comparativement au *Saccharomyces*)

5.1.4. Aspects cinétiques et métaboliques de *Schizosaccharomyces pombe*

Selon Taillandier et al (1988, 1991a) l'acide malique n'est ni une source de carbone, ni une source d'énergie. L'activité de désacidification n'est pas liée à la quantité de sucre métabolisé, mais à la concentration de biomasse. La consommation de l'acide malique sans consommation de sucres est possible, mais avec perte de viabilité ce qui suggère que le métabolisme de l'acide malique demande de l'énergie. La même observation a été faite par Rosini et Ciani (1993) avec des cellules de *Shz pombe* immobilisées dans l'alginate de calcium. En outre, Taillandier et Strehaiano (1991a) ont vérifié que, même en présence de sucre, l'acide malique ne contribue pas à la formation de biomasse, contrairement à ce qui avait été indiqué par Queiroz et Pareilleux (1990).

Taillandier et Strehaiano (1991a) ont évalué l'effet de la concentration initiale de l'acide malique pour des valeurs comprises entre 0 et 28,6 g/L. Ils ont constaté que même pour des concentrations initiales élevées, l'acide est entièrement métabolisé par les levures et que la vitesse de dégradation (dC_M/dt) était maximale quand la concentration était supérieure à 18,6 g/L. Par contre le taux de croissance spécifique décroissait pour des concentrations de l'acide malique supérieures à 2,2 g/L.

Avec la souche G2, isolé par l'Institut Coopératif du Vin (ICV), Taillandier (1990) a conclu que :

- la température optimale de croissance et de désacidification se place au-dessus de 30°C
- une légère aération contribue à une amélioration importante des vitesses de fermentation
- même si la tolérance à l'éthanol est bonne, la vitesse de désacidification se réduit de 50% dans un milieu avec 10% d'éthanol.

Pour Sousa et al. (1991) une concentration d'éthanol de l'ordre de 7,6% (v/v) est suffisante pour réduire la consommation de l'acide malique et pour des concentrations supérieures la consommation est très réduite. La consommation de sucre souffrirait aussi d'une inhibition semblable pour des concentrations d'éthanol de 7,6%. L'effet de l'éthanol est plus sévère sur la

croissance cellulaire puisque pour 7,6% d'éthanol la croissance était complètement inhibée. Queiroz et Pareilleux (1990) ont obtenu la même valeur d'éthanol pour l'inhibition de la croissance.

Toujours selon Sousa et al., (1995) un autre élément clef est l'inhibition du transport de l'acide malique par l'acide acétique. Les concentrations normalement trouvées après la vinification sont suffisamment hautes pour produire un effet d'inhibition. Par ces raisons, l'auteur recommande que la désacidification avec *Shz pombe* soit réalisée préférentiellement dès, ou avant, le début de la fermentation alcoolique. En ce qui concerne le rôle de l'oxygène, le même auteur montre qu'une anaérobiose stricte est néfaste mais aussi qu'une aération excessive induit une diminution des vitesses de consommation de l'acide malique. Néanmoins, aucune valeur quantitative précise, permettant de fixer les apports d'oxygène à réaliser, n'est donnée (Sousa et al., 1991).

Le pH a aussi un effet sur la croissance et la capacité de désacidification de *Shz pombe*. Le pH optimum de désacidification est proche de 3,5, car c'est à cette valeur que la vitesse de transport est maximale (Osothsilp et Subden, 1986). La vitesse maximale de croissance spécifique de *Shz pombe* dans un milieu sans acide malique est obtenue pour des pH entre 3,0 et 6,0. La présence de 10g/L d'acide malique réduit la vitesse maximale de croissance et la limite à un pH compris entre 3,5 et 4,0 (Queiroz et Pareilleux, 1990).

5.1.5. Fermentation malo-alcoolique de moûts par *Schizosaccharomyces pombe*

L'utilisation de la levure *Shz pombe* pour la désacidification biologique de moûts a été très discutée car, nous l'avons vu, elle possède des caractéristiques (tolérance à de basses températures et à des bas pH, résistance au SO₂ libre, bonne résistance à des concentrations élevées de sucre et bonne capacité de dégrader l'acide malique) qui la rendent particulièrement intéressante pour une utilisation industrielle. Malgré ces avantages deux inconvénients ont été décrits (Taillandier, 1990) et ont certainement limité l'utilisation industrielle de cette espèce de levure :

- Production d'aromes indésirables,
- Vitesse de fermentation lente qui rend l'implantation parfois difficile.

La production d'aromes indésirables est en vérité un point controversé. Si certains auteurs ont constaté que *Shz pombe* confère un caractère désagréable au vin (Benda et Schmitt, 1969 ; Rankine, 1966, Snow et Gallander, 1979) d'autres affirment que rien de tel ne se vérifie (Magyar et Panyik, 1989), et parfois même au contraire la qualité sensorielle serait accrue (Silva et al., 2003 ; Yokotsuka et al., 1993). Strehaiano et al. (2001) observent que ces caractéristiques organoleptiques indésirables apparaissent pendant la phase de la fermentation alcoolique. Selon les mêmes auteurs, les divergences observées sont liées à la souche de levure utilisée et à la manière de l'utiliser. Il faut donc valoriser les aspects positifs en minimisant le risque de perte de qualité du vin. Dans le cas de la souche G2 qui a été très étudiée depuis 1988 et avec laquelle notre laboratoire a eu l'occasion de travailler, des aspects

sensoriels négatifs n'ont jamais été observés si les bons protocoles de mise en œuvre sont respectés.

La difficulté d'implantation de *Shz pombe* dans le milieu à désacidifier est principalement due à la concurrence avec la flore indigène du moût, qui présente toujours des vitesses de fermentation plus élevées (Taillandier, 1990). Pour contourner ce problème on peut réaliser des inoculations mixtes (*Saccharomyces* et *Shz pombe*) avec des pourcentages différents de chaque levure. Cette méthode a l'inconvénient d'être de contrôle difficile en milieu industriel vu que le mélange des levures doit être réalisé avec précision. En outre il est difficile de prévoir comment vont évoluer les deux populations. Une deuxième option est d'inoculer d'abord *Shz pombe*, qui réalise une dégradation partielle de l'acide malique, puis de procéder à son enlèvement par centrifugation ou par filtration avant l'inoculation avec *Saccharomyces*. Il est clair que les étapes supplémentaires de filtration ou de centrifugation rendent le processus « lourd » et peu attrayant. Il reste enfin la possibilité de réaliser des inoculations séquentielles, sans passer par le retrait de la première levure *Shz pombe*. Néanmoins Taillandier et al. (1995) ont observé que *Shz pombe* a un effet inhibiteur sur *Saccharomyces*, effet d'autant plus prononcé que la concentration de *Shz pombe* est élevée. Selon Lonvaud-Funel et al. (2010) ce phénomène cesse d'être problématique si on inocule initialement $4 \text{ à } 5.10^6$ cell/mL de *Shz pombe*. Dans ces conditions *Shz pombe* a un développement limité et la consommation des sucres est basse (10-20g/L). Une fois atteint le niveau d'acide malique désiré on inocule *S. cerevisiae* à des fortes concentrations 1.10^7 cell/mL. Cette solution présente l'inconvénient d'avoir besoin d'un inoculum de *Saccharomyces* environ 2 fois supérieur à celui normalement recommandé par les fabricants de LSA. De ce que l'on vient de présenter, on constate que la plus grande restriction dans l'utilisation de cellules libres de *Shz pombe* est le contrôle de la population de cette espèce, spécialement après la fin de FMA.

La seule façon vraiment effective de contrôler la population de *Shz pombe* dans le moût est d'utiliser la levure sous forme immobilisée. La séparation de la levure du moût en fermentation devient alors extrêmement simple et rapide, en permettant un contrôle précis de la concentration finale d'acide malique.

Yokotsuka et al. (1993) ont expérimenté plusieurs combinaisons de *Shz pombe* et *S. cerevisiae* immobilisées en alginate, et arrivent à la conclusion que la combinaison qui donne les meilleurs résultats sensoriels est d'inoculer d'abord *Shz pombe*, de la retirer une fois atteint le niveau de désacidification désirée, et d'inoculer *S. cerevisiae* pour conclure la fermentation alcoolique. En utilisant cette combinaison mais avec des cellules libres de *S. cerevisiae*, Strehaiano et al. (2002) et Silva et al. (2003) ont réalisé des essais en cave avec des vins blancs et avec des vins rouges, au Portugal et en France et ont obtenu de bons résultats analytiques et sensoriels. Ils ont aussi noté que la présence de cellules indigènes n'a pas empêché l'activité demalicante de *Shz pombe*.

Dans l'évaluation sensorielle Silva et al. (2003) ont constaté que les vins désacidifiés biologiquement étaient toujours mieux notés que les vins contrôle (non désacidifiés). Les vins

rouges qui présentaient une réduction notoire de l'acidité étaient décrits comme en ayant une meilleure structure, plus équilibrés et plus longs que les contrôles. Dans les vins blancs, la réduction d'acidité était accompagnée d'une plus grande intensité d'arômes décrits comme floraux, citriques et de fruits tropicaux. Dans aucune de ces applications il n'a été détecté de déviations sensorielles. Il faut par ailleurs noter que dans ce travail, *Shz pombe* était sous forme immobilisée et sèche, ce qui représentait une grande avancée pour l'utilisation de cette levure à l'échelle industrielle. L'auteur a aussi établi que des temps de conservation de 20 mois (très supérieurs à ceux des levures humides) n'entraînaient pas de perte d'activité.

Si Taillandier et al. (1991b) ont constaté que l'augmentation de la concentration des cellules de *Shz pombe* dans la matrice d'alginate augmente la vitesse de désacidification, Rosini et Ciani (1993) n'ont observé, au contraire, aucun effet.

L'immobilisation de *Shz pombe* dans l'alginate de calcium a encore l'avantage de pouvoir facilement être utilisée dans des fermenteurs en mode semi continu ou continu (Taillandier, 1991b). L'utilisation de cellules immobilisées permet l'obtention de hautes densités cellulaires ce qui permet en mode continu d'atteindre des vitesses de consommation de l'acide malique de l'ordre de 1,5 à 2,4 gL⁻¹h⁻¹, valeurs très élevées face à celles de l'ordre de 0,05 gL⁻¹h⁻¹ obtenues dans des fermentations *batch* industrielles (Taillandier et al., 1994).

5.2. Matériel et méthodes

5.2.1. Moût et vin

Dans cette partie du travail les essais de désacidification ont été réalisés sur moût et sur vin. Le moût utilisé a été préparé à partir de moût concentré avec 800 g/L de sucre. La préparation du moût a impliqué :

- la dilution avec de l'eau pour que la concentration de sucres soit approximativement de 200 g/L,
- l'addition de l'acide L-malique à différentes concentrations (2, 5 et 8 g/L) selon l'essai, 5 g/L lorsque non précisé
- la correction du pH à 3,0 avec de l'acide orthophosphorique,
- l'addition de SO₂ pour atteindre une concentration de SO₂ libre de 20 mg/L (ou autre suivant l'essai).

Le vin utilisé a été un vin blanc à 11,3% d'alcool et 0,64 g/L de sucre résiduel. Dans le vin, comme pour le moût, on a ajusté le SO₂ libre à 20 mg/L et l'acide malique à des valeurs allant de 2, 5 à 8 g/L, selon à l'essai à réaliser.

5.2.2. Filtration stérile du moût et vin

La filtration du moût et du vin a été réalisée selon le protocole décrit dans le point 4.2.2. Le moût et le vin filtrés ont été conservés dans des récipients stériles et distribués ultérieurement, dans des conditions d'asepsie, dans les fermenteurs où sont réalisés les essais.

5.2.3. Réhydratation des levures immobilisées

La levure *Schizosaccharomyces pombe* utilisée dans cette partie du travail a été produite selon la formulation FE3 déjà présentée dans le point 3.2.

Préalablement à l'utilisation, les levures immobilisées ont été réhydratées dans une solution d'eau sucrée à 40 g/L. La concentration des billes dans la solution de réhydratation a été de 1 g de levures immobilisées pour 5 ml de solution de réhydratation. Avant l'addition des levures la température de la solution a été ajustée à 30°C. Les levures sont restées dans la solution de réhydratation pendant une période de 4 à 5 h. À la fin de cette période les levures sont apportées dans le moût ou dans le vin, en vérifiant toujours que la différence de température entre la solution et le moût ou le vin à inoculer ne dépasse pas les 10°C.

5.2.4. Équipement de fermentation

Pour exécuter les fermentations malo-alcooliques (FMA) avec *Shz pombe* immobilisée, trois types de fermenteurs discontinus ont été utilisés.

5.2.4.1. Fermenteur non agité

Ces fermenteurs ne sont pas plus que des flacons en verre de 500 ml, remplis de 430 ml de moût stérile ou de vin etensemencés avec les levures immobilisées. Les flacons étaient couverts avec des bouchons de coton. Pour contrôler la température, les flacons étaient placés dans un bain thermostaté. La prise d'échantillons était faite dans une hotte à flux laminaire et en utilisant du matériel stérile.

Tout le matériel était stérilisé par autoclavage à 121°C pendant 20 mn.

5.2.4.2. Fermenteur de lit expansé avec recyclage total

La Figure 5-2 présente une photographie et une représentation schématique du fermenteur à lit expansé avec recyclage total.

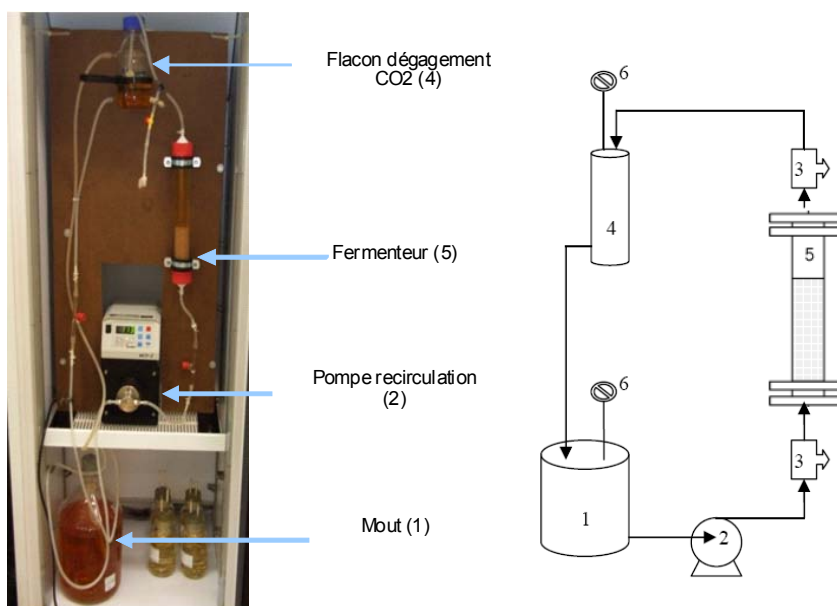


Figure 5-2 Fermenteurs de lit expansé avec recyclage total a) photographie b) représentation schématique. 1 - réservoir de moût V = 5 L ; 2 - pompe de recirculation ; 3 - prise de échantillons ; 4 - flacon pour dégagement du CO₂ ; 5 - fermenteur (h = 200 mm ; \varnothing = 36 mm) ; 6 - filtre de air (0,2 μ m)

Pour initier la mise en route du fermenteur, le moût filtré était placé dans le réservoir (1) d'une capacité de 5 L. Dans le fermenteur (5), on ajoutait d'abord des billes en verre stérilisées, de 3 mm de diamètre, qui se déposaient dans la partie inférieure. Ces billes servaient à distribuer uniformément le débit de recirculation du moût ou du vin sur toute la surface de la base du fermenteur (diamètre : 3,6 cm). Ensuite, on ajoutait les levures immobilisées réhydratées et on fermait le fermenteur. On débutait le pompage du moût en circuit fermé comme représenté dans la Figure 5-2b). Pour enlever le CO₂ résultant de la FMA et de la FA un flacon ouvert est placé dans le point le plus haut de l'installation. L'installation était placée à l'intérieur d'une

chambre à température contrôlée. En entrée et sortie du fermenteur, sont placés deux-points de prise d'échantillons.

Avant chaque *batch* le matériel était stérilisé à 121°C pendant 20 mn, à l'exception de la pompe. La pompe était désinfectée avec une solution d'acide peracétique à 2% qui recirculait pendant 20 minutes.

5.2.4.3. Fermenteur industriel non-agité

Pour cet essai, avant la réhydratation, les levures ont été placées à l'intérieur de sacs de polyéthylène perforés d'orifices suffisamment petits pour retenir les billes. Les sacs ont été introduits par la partie supérieure de la cuve et ont été suspendus à différentes hauteurs. La Figure 5-3 représente schématiquement la manière de mise en œuvre industrielle de la levure *Shz pombe* immobilisée.

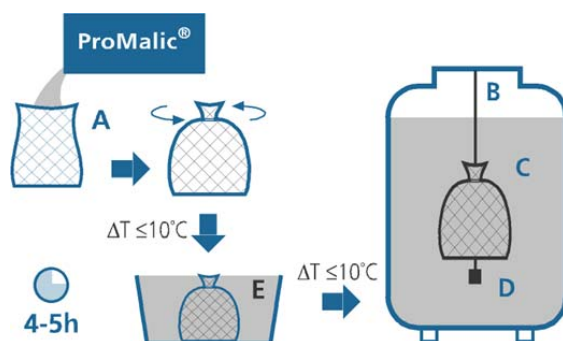


Figure 5-3 Application industriel de la levure *Shz pombe* immobilisée. A - sacs de polyéthylène perméables ; B - fil pour supporter le sac ; C - levures immobilisées dans le moût, D - lest pour tenir le sac immergé ; E – Solution de réhydratation.

5.2.5. Techniques analytiques

5.2.5.1. Détermination de la densité optique

Pour détecter la présence de microorganismes contaminants ou le relargage de cellules des billes pendant les essais de FMA avec les levures immobilisées, on a mesuré la densité optique (DO).

La mesure de la DO a été réalisée à 620 nm avec un spectrophotomètre Hach DR 2000. Les essais étaient arrêtés quand la DO du milieu de fermentation était supérieur à 0,1. À cette occasion, on réalisait aussi une observation au microscope optique pour évaluer si la levure libre était la levure *Shz pombe* ou un autre micro-organisme de contamination.

5.2.5.2. Dosage d'éthanol par HPLC

Lors de cette partie du travail, le dosage de l'éthanol a été réalisé par le Département de Chimie de l'Universidade d'Aveiro en chromatographie liquide de haute efficacité (HPLC), .

5.3. Expérimentations

5.3.1. Fermentations dans un fermenteur non agité

L'anhydride sulfureux est ajouté au moût et au vin pour ses propriétés antioxydantes et antiseptiques qui permettent une meilleure conservation. Néanmoins une addition excessive de ce composé peut être un facteur empêchant la réalisation des fermentations alcoolique, malo-alcoolique et malolactique en raison de la toxicité de ce composé vis-à-vis des levures et bactéries, leur tolérance variant d'ailleurs avec l'espèce et avec la souche. Il était donc important d'évaluer que le processus d'immobilisation et de séchage ne modifiait pas l'exceptionnelle résistance que *Shz pombe* possède vis à vis de cet antiseptique.

En faisant appel au fermenteur discontinu non agité, on a réalisé plusieurs essais sur moût pour évaluer l'influence :

- de la concentration initiale en SO₂ libre - Pour cela des fermentations malo-alcooliques ont été réalisées avec des concentrations en SO₂ libre initiales de 6, 15, 35 et 40 mg/L. Après inoculation avec *Shz pombe* immobilisée, on a suivi la consommation de l'acide malique. À la fin de FMA on a mesuré encore le SO₂ libre
- de la concentration initiale de l'acide L-malique - l'acide L-malique a été ajusté à des concentrations de 2, de 5 et 8 g/L et après inoculation on a suivi son évolution au cours du temps.
- de l'effet de la température sur le déroulement de la FMA - ont été réalisées plusieurs fermentations à des températures de 10, 15, 18, 20 et 22°C avec *Shz pombe* immobilisées et à des températures de 10, 15 et 20°C avec *Shz pombe* libres. On a choisi des températures entre 10 et 22°C car elles se situent dans la gamme de celles normalement utilisées pour les vins blancs. Les fermentations ont été suivies par des mesures de l'acide malique. À partir des données obtenues, il a été possible d'estimer l'énergie d'activation de la réaction de désacidification par des levures immobilisées et libres.

Pour conclure ce travail sur l'étude de désacidification avec *Shz pombe* immobilisée, on a réalisé un essai avec un vin blanc et on a comparé la cinétique de désacidification avec celle observée dans le moût. Dans ce cas, différentes concentrations initiales d'acide malique (2, 5 et 8 g/L) ont été testées.

Sauf autre indication contraire, la température de fermentation était de 15°C

La masse de billes de *Shz pombe* immobilisées a été dans tous les essais de 1 g/L, ce qui correspond à approximativement $2 \cdot 10^6$ cell/mL. Les essais ont été tous réalisés en duplicat et toujours avec un témoin constitué de moût ouïle vin identique à celui de l'essai mais sans inoculation de levure. Ce contrôle sert pour confirmer qu'il n'existe pas de contaminants dans le milieu préparé et que la stérilisation et la manipulation ont été correctes. Si la DO était supérieure à 0,1, ce qui laissait supposer une contamination, l'essai était interrompu.

5.3.2. Fermentations dans un fermenteur à lit expansé

L'influence de la concentration initiale d'acide malique (2 et 5g/L) a été aussi étudiée dans le fermenteur à lit expansé avec recyclage total et les résultats comparés avec ceux obtenus dans les fermenteurs discontinus non agités.

Encore dans le fermenteur à lit fixe expansé avec recyclage total, on a évalué l'influence de la concentration en levure immobilisée avec des doses de 1, 2, 5 et 10 g/L.

Enfin, on a étudié la possibilité de réaliser la FMA simultanément avec la FA. Pour cela on a réalisé une co-inoculation séquentielle, en apportant en premier lieu la levure *Shz pombe* immobilisée et 48h après *S. cerevisiae* (souche QA23) sous la forme sèche active (cellules libres).

5.3.3. Fermentations dans un fermenteur industriel non-agité en co-inoculation

Parallèlement à ces études de laboratoire, nous avons réalisé une étude de désacidification avec des cellules de *Shz pombe* immobilisées (ProMalic) à l'échelle industrielle en co-inoculation avec *S. cerevisiae* chez un producteur de vin de la région de Rias Baixas en Galicia (Espagne).

Le volume de vin traité a été de 17 hL, avec une concentration initiale de 8,5 g/L d'acide malique, une acidité totale de 11,5 g/L et un pH de 3,28. La dose de levures immobilisées a été de 2 g/L. Quand le niveau d'acide malique désiré par le producteur a été atteint, les sacs qui contenaient les levures ont été retirés de la cuve et réutilisés dans un autre vin dont la teneur initiale d'acide malique était de 6,5 g/L. Dans ce deuxième essai, le volume à traiter était de 10 hL.

La souche de *S. cerevisiae* utilisée était celle usuellement utilisée par le producteur sous la forme sèche active.

5.4. Résultats et discussion

5.4.1. Influence de différents facteurs dans le processus de désacidification discontinue de moûts

Ci-dessous sont présentés les résultats relatifs à l'étude de l'impact de paramètres comme la concentration initiale en SO_2 et la concentration initiale en acide malique sur le processus de désacidification avec la levure *Shz pombe* immobilisée.

5.4.1.1. Concentration initiale du dioxyde de soufre (SO_2) libre

Dans la Figure 5-4, l'évolution de la FMA pour ces différentes concentrations initiales en anhydride sulfureux libre est présentée.

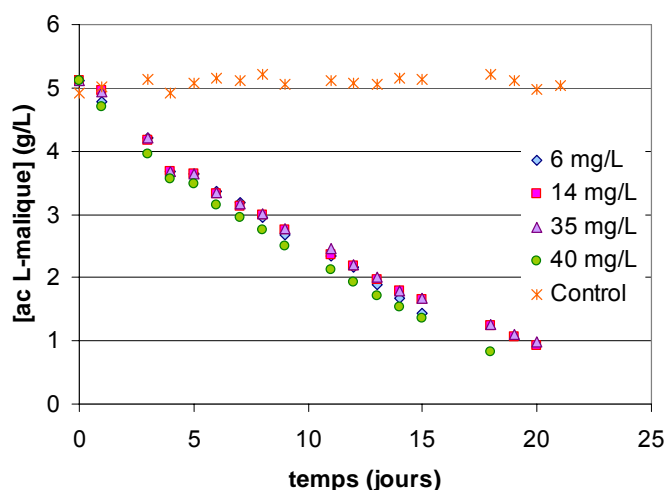


Figure 5-4 Profils de concentration de l'acide malique au cours du processus de désacidification de moût avec différentes concentrations initiales de SO_2 libre ($T_{\text{ferm}} = 15^\circ\text{C}$; dose = 1 g/L)

L'analyse du graphique démontre que pour les concentrations de SO_2 libre analysées, il n'existe pas de différences importantes dans les vitesses de dégradation de l'acide L-malique. On confirme que l'immobilisation ne modifie pas la résistance de *Shz pombe* à l'anhydride sulfureux. On constate aussi que sur le témoin il n'y a pas eu consommation d'acide malique, ce qui démontre que la stérilisation et la manipulation ont été correctes.

On a calculé la vitesse de consommation de l'acide malique (mesurée par la tangente à la courbe de concentration vs temps) pour les sept premiers jours après l'inoculation. Vu que les essais ont été tous réalisés en discontinu et que le volume du mélange réactionnel est constant, la vitesse de consommation de l'acide malique ($-r_M$) est donnée par l'expression 5-1 :

$$-r_M = \frac{dC_M}{dt} \quad 5-1$$

où C_M représente la concentration d'acide malique.

Dans le Tableau 5-1 on présente les valeurs déterminées pour la vitesse initiale de la consommation d'acide malique (r_{M0}) ainsi que pour la valeur de SO_2 libre à la fin de l'essai.

Tableau 5-1 – Valeurs de la vitesse initiale de consommation d'acide malique, coefficient de corrélation pour les essais avec différentes concentrations d'anhydride sulfureux libre initial dans le moût.

[SO ₂] libre (mg/L)	r_{M0} (g/L/jour)	Coefficient de corrélation	[SO ₂] libre fin (mg/L)
6	0,28	0,977	4,0
15	0,30	0,973	0,0
35	0,29	0,974	0,0
40	0,31	0,977	2,0

On constate que les vitesses de consommation d'acide malique sont très semblables quelle que soit la concentration initiale d'anhydride sulfureux libre dans le moût. On observe aussi qu'à la fin des essais le niveau d'anhydride sulfureux libre est très bas ce qui prouve qu'il s'est combiné pendant la FMA. Comme le volume de moût dans chaque fermenteur était seulement de 430 mL il n'a pas été possible d'analyser l'évolution de ce composé pendant l'essai, et de ce fait nous ne connaissons pas le moment où le SO_2 s'est combiné complètement. Probablement ça a été dans la phase initiale de la fermentation. Cette microfermentation constitue une bonne approche de ce qui se passe à l'échelle industrielle dans la mesure où les moûts fermentent normalement avec des teneurs très basses de SO_2 libre.

5.4.1.2. Concentration initiale en l'acide L-malique

L'évaluation de l'influence de la concentration initiale de l'acide L-malique sur le processus de désacidification de moûts avec *Shz pombe* immobilisée a été faite pour des valeurs de 2, 5 et 8 g/L. Les résultats de l'essai sont présentés dans la Figure 5-5.

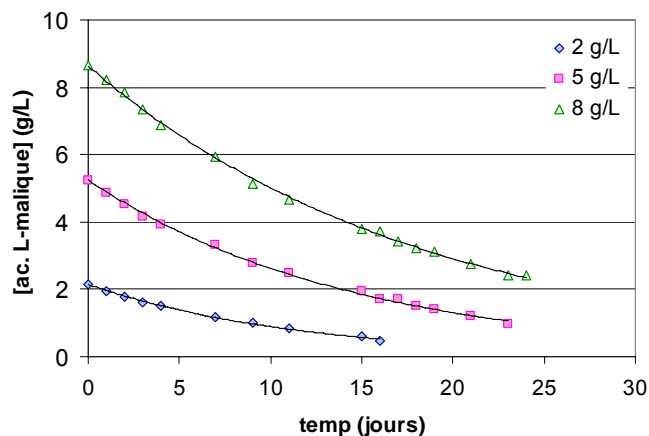


Figure 5-5 Profils de concentration de l'acide malique pendant le processus de désacidification d'un moût avec différentes concentrations initiales d'acide malique ($T_{\text{ferm}} = 15^{\circ}\text{C}$; dose = 1 g/L).

À partir des informations de la Figure 5-5, on a calculé la vitesse initiale de consommation de l'acide malique (r_{M0}). La Figure 5-6 présente l'évolution de cette vitesse en fonction de la concentration initiale d'acide malique existante dans le moût.

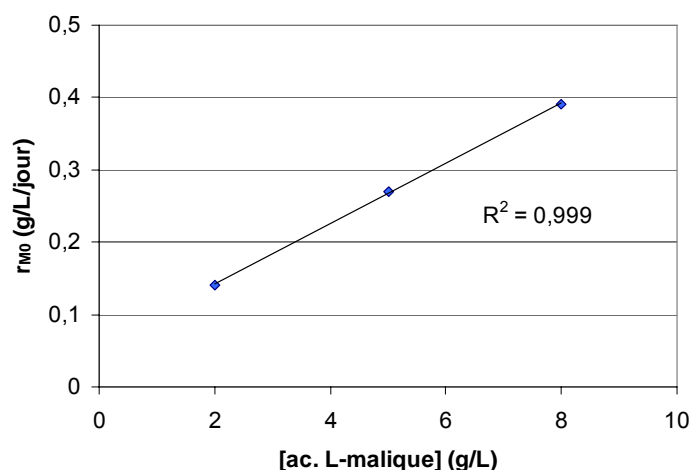


Figure 5-6 Évolution de la vitesse initiale de consommation d'acide malique en fonction de sa concentration initiale dans le moût.

On constate que pour les concentrations étudiées, la vitesse initiale de consommation de l'acide malique augmente linéairement avec sa concentration initiale dans le moût. Cette dépendance de la vitesse de réaction permet de conclure que pour les concentrations étudiées la réaction est d'ordre 1 concernant l'acide malique, pouvant alors être exprimée par une expression du type :

$$-r_M = k.C_M \quad 5-2$$

où k est la constante de vitesse de réaction, ou si on préfère la vitesse globale de réaction (jour^{-1}).

5.4.1.3. Température

Pour les expériences sur l'effet de la température dans le processus de désacidification de moûts avec des levures immobilisées, les résultats sont présentés dans la Figure 5-7.

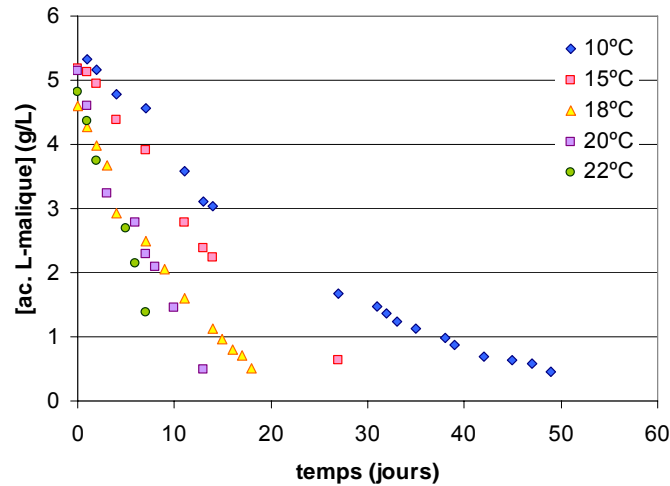


Figure 5-7 Profils de concentration de l'acide malique pendant le processus de désacidification d'un moût avec *Shz pombe* immobilisée à différentes températures ([ac. malique] initial = 5 g/L ; dose = 1 g/L)

Comme on pouvait l'attendre, on constate que la température affecte significativement le profil de consommation d'acide malique. Plus basse est la température, plus lente devient la consommation de l'acide malique. Afin d'apprécier si l'inclusion modifiait la réponse de la levure à ce paramètre, nous avons réalisé un essai semblable avec des cellules libres de *Shz pombe* pour les températures de 10, 15 et 20°C. La population cellulaire inoculée dans le moût a été de 1.10^6 cell/mL. Les résultats de la désacidification sont présentés dans la Figure 5-8.

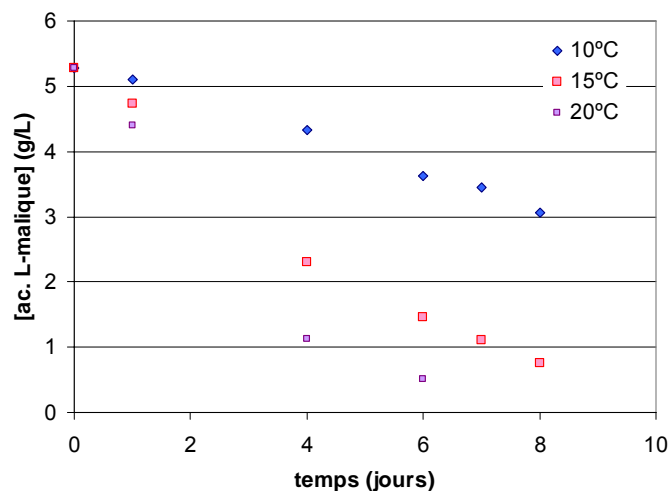


Figure 5-8 Profils de concentration de l'acide malique pendant le processus de désacidification d'un moût avec *Shz pombe* libre à différentes températures ([ac. malique] initial = 5 g/L ; Population initiale = 1.10^6 cell/mL)

Encore une fois on constate que la consommation de l'acide malique est d'autant plus rapide que la température est plus élevée. A partir des graphiques des figures 5-7 et 5-8, on peut conclure rapidement que la consommation de l'acide malique a été plus lente avec les levures immobilisées qu'avec les levures libres. Dans le tableau 5-2 on présente les vitesses initiales de consommation d'acide malique pour les levures immobilisées et libres, aux différentes températures.

Tableau 5-2 – Valeurs de vitesse initiale de consommation de l'acide malique dans un moût avec des levures immobilisées et libres à différentes températures ([ac. malique] initial = 5 g/L ; dose = 1 g/L).

Température (°C)	r_{M0} immobilisées (g/L/jour)	r_{M0} libres (g/L/jour)
10	0,17	0,28
15	0,20	0,67
18	0,32	-
20	0,39	1,05
22	0,42	-

Le calcul des vitesses initiales confirme que, pour une température donnée, les levures libres sont substantiellement plus rapides que les levures immobilisées pour consommer l'acide malique. Cela peut s'expliquer par le fait que les levures libres se multiplient dans le moût, augmentant ainsi la population, tandis que les cellules immobilisées ont une capacité à se multiplier beaucoup plus limitée. Néanmoins, l'inoculum « levure immobilisée » a été légèrement supérieur ($2 \cdot 10^6$ cell/mL) alors que l'inoculum « levure libre » n'était que de l'ordre de $1 \cdot 10^6$ cell/mL. Une autre possibilité est que, dans les conditions des essais, les levures immobilisées auraient pu être soumises à des limitations d'ordre diffusionnel que les levures libres ne rencontrent pas. Ces limitations peuvent être d'ordre externe, diffusion du milieu jusqu'à la surface de la bille, et/ou interne, diffusion de la surface de la bille jusqu'au centre, où sont les cellules.

5.4.2. Énergie d'activation du processus de désacidification

A ce niveau de l'étude on a donc cherché à déterminer l'énergie minimale nécessaire pour que se produise le processus de désacidification du moût avec les levures *Shz pombe* immobilisées et libres. Cette énergie minimale pour que le processus de désacidification se produise est connue comme énergie d'activation.

Précédemment on a vérifié que la vitesse de consommation de l'acide malique dépend de la température et de sa concentration initiale dans le milieu. Pour beaucoup de réactions cette

dépendance peut être écrite comme étant le produit de la constante de réaction k par la fonction des concentrations des espèces chimiques engagées dans la réaction :

$$-r_M = k(T) \cdot f(C_M, C_X, \dots) \quad 5-3$$

La constante de réaction n'est pas vraiment une constante, mais est indépendante des concentrations des espèces engagées dans la réaction. Cette constante k est fortement dépendante de la température. Arrhenius a été le premier à suggérer que la dépendance de k concernant la température pouvait être exprimée par l'expression :

$$k(T) = Ae^{-E/RT} \quad 5-4$$

où :

A - facteur pré-exponentiel (même unité que k)

E - Énergie d'activation (kcal/mol)

R - Constant des gaz parfaits ($1,987 \cdot 10^{-3}$ kcal/mol/K)

T - Température absolue (K)

L'expression 5-4 est connue comme l'équation d'Arrhenius. En prenant les logarithmes népériens de l'équation d'Arrhenius on obtient :

$$\ln k = \ln A - \frac{E}{R} \frac{1}{T} \quad 5-5$$

La représentation graphique de $\ln k$ versus $1/T$ donne une ligne droite dont la pente est proportionnelle à l'énergie d'activation (Fogler, 1992). L'énergie d'activation est déterminée expérimentalement par la réalisation d'essais de désacidification à différentes températures, tel que cela a été réalisé dans le point 5.4.1.3.

La constante de vitesse de réaction k peut être déterminée en combinant les expressions 5-1 et 5-2 :

$$\frac{dC_M}{dt} = kC_M \quad 5-6$$

Pour une réaction isotherme l'équation 5-6 peut être intégrée, pour donner :

$$\ln \frac{C_{M0}}{C_M} = kt \quad 5-7$$

où C_{M0} est la concentration initiale d'acide malique dans le moût. En faisant appel à une régression linéaire il devient possible de calculer la valeur de k pour chacune des températures analysées.

En suivant cette méthodologie, on a déterminé l'énergie d'activation pour les levures immobilisées et pour les levures libres. Dans les tableaux 5-3 et 5-4 sont présentées les valeurs des constantes de réaction pour les différentes températures analysées, ainsi que l'énergie d'activation calculée pour *Shz pombe* immobilisée et libre.

Tableau 5-3 – Valeurs des constantes de réaction et coefficients respectifs de corrélation calculés à partir de l'essai de désacidification de moût avec *Shz pombe* immobilisée et libre à différentes températures.

T (°C)	<i>Shz pombe</i> immobilisée		<i>Shz pombe</i> libre	
	K (jour ⁻¹)	Coef. corrélation	K (jour ⁻¹)	Coef. corrélation
22	0,13	0,989	---	---
20	0,10	0,973	0,40	0,993
18	0,11	0,982	---	---
15	0,07	0,976	0,24	0,990
10	0,04	0,991	0,06	0,991

Tableau 5-4 – Valeurs de l'énergie d'activation pour les cellules de *Shz pombe* immobilisées et libres

	<i>Shz pombe</i> immobilisée	<i>Shz pombe</i> libre
E (kcal/mol)	16 ± 2	31 ± 8
Coef. corrélation	0,946	0,940

On constate que *Shz pombe* immobilisée a une énergie d'activation qui est environ la moitié de celle trouvée pour la forme libre. La valeur d'énergie d'activation reportée dans la bibliographie pour *Shz pombe* en cellules libres est de 26kcal/mol (Taillandier, 1990) ce qui est conforme à ce que nous avons trouvé (à l'erreur expérimentale près).

Le fait que l'énergie d'activation de la levure immobilisée soit la moitié de celle des cellules libres peut être expliqué par l'existence de limitations de la diffusion. Les billes avec la levure immobilisée ont été placées dans un fermenteur non agité. Il est possible que dans le voisinage des billes se forme un film, dont l'épaisseur dépend des conditions hydrodynamiques, et à travers duquel se fait le transfert de l'acide malique jusqu'à la surface de la bille. Pour des réactions d'ordre 1 la vitesse globale de la réaction est fournie par l'expression 5-2 où

$$k = \left(\frac{1}{k_g} + \frac{1}{k_r} \right)^{-1} \quad 5-9$$

k_g est le coefficient de transfert de masse et k_r la constante de réaction. Il est aussi connu que les limitations diffusionnelles externes ont une influence sur l'énergie d'activation de la réaction globale (E) (Figueiredo, 1989). 3 situations sont possibles :

1. la vitesse de diffusion externe est plus rapide que la vitesse de consommation de l'acide malique

$$k_g \gg k_r \text{ donc } r_M = k_r C_M \text{ en étant } k_r = A e^{-\frac{E_r}{RT}} \quad 5-10$$

E = E_r = énergie d'activation de la réaction

2. la vitesse dégradation de l'acide malique est nettement supérieure à la vitesse de diffusion externe

$$k_r \gg k_g \text{ donc } r_M = k_g C_M \text{ en étant } k_r = A e^{\frac{E_d}{RT}} \quad 5-11$$

$E = E_d$ ($\approx 5 \text{ kcal/mol}$) = énergie d'activation de la vitesse de diffusion externe

3. situation intermédiaire

$$-r_M = k.C_M \text{ et } k = \left(\frac{1}{k_g} + \frac{1}{k_r} \right)^{-1}$$

dans ce cas l'énergie d'activation globale vient de la contribution des énergies d'activation des deux processus (réactionnel et diffusionnel). La Figure 5-9 est une représentation graphique théorique de ce processus.

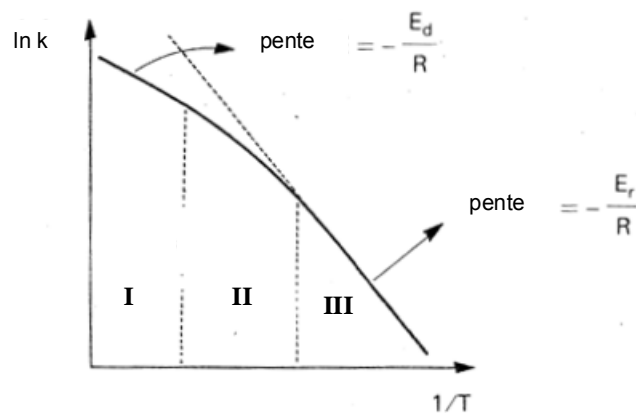


Figure 5-9 Représentations graphiques de $\ln k$ versus $1/T$ pour trois situations distinctes: I - limitations diffusionnelles externes, II - zone intermédiaire, III - cinétique réactionnel

On observe sur la Figure 5-9 que pour les basses températures, le processus est limité par la réaction. Au fur et à mesure qu'on augmente la température la droite de pente $-E_r/R$ commence à se courber en raison de l'existence des limitations à la diffusion externe et tend vers l'horizontale pour les températures plus élevées où la pente est $-E_d/R$, avec $E_d \approx 5 \text{ kcal/mol}$.

La représentation graphique de $\ln k$ versus $1/T$ pour les essais à différentes températures réalisées avec les levures immobilisés est présentée dans la Figure 5-10.

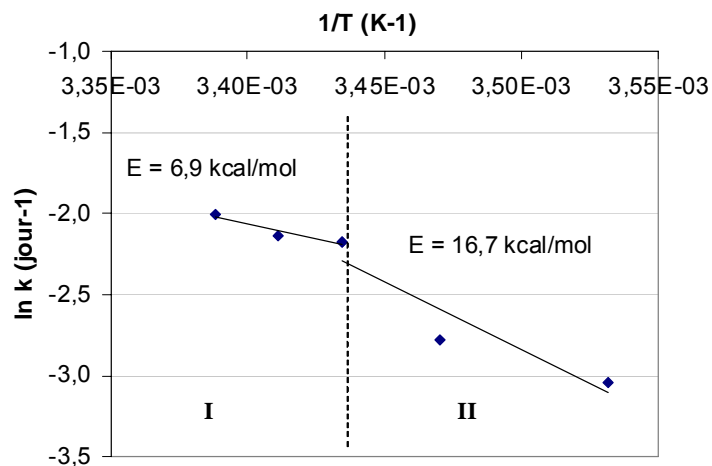


Figure 5-10 Représentations graphiques de $\ln k$ contre $1/T$ pour les essais à de différentes températures réalisées avec les levures immobilisés

Par observation de la Figure 5-10, deux régions peuvent être distinguées: la région I qui existe pour des valeurs de température supérieures à 18°C et la région qui existe pour des valeurs inférieures à 18°C . L'énergie d'activation calculée à partir de la déclivité de la ligne droite de la région I est de 6,9 kcal/mol. Cette valeur est très proche des 5 kcal/mol de l'énergie d'activation de la vitesse de diffusion externe (E_d). On peut donc conclure que pour des températures supérieures à 18°C la cinétique globale de la réaction est limitée exclusivement par des limitations de diffusions externes. De la pente de la droite de la région II on a estimé une énergie d'activation de 16,7 kcal/mol, qui bien que supérieure à celle dans la région I, est encore loin de la valeur qui correspond à l'énergie d'activation de la réaction, qui est de 31 kcal/mol, calculée pour la *Shz pombe* libre. Ainsi la région II correspond à une situation intermédiaire où l'énergie d'activation globale traduit la contribution des énergies d'activation de la réaction et de la diffusion.

D'après Serra (2005) il est reconnu que pour une valeur de l'énergie d'activation égale ou supérieure aux 12 kcal/mol le processus se trouve dans un régime biologique, c'est à dire purement réactionnel.

5.4.3. Désacidification d'un moût en utilisant un fermenteur discontinu, en lit expansé avec recyclage total. Étude de quelques paramètres du procédé

Dans cette partie du travail on a évalué l'utilisation d'un fermenteur en lit expansé comme alternative au fermenteur non agité. Le lit présente une légère expansion quand on initie la recirculation du moût, néanmoins il n'arrive pas à un état de fluidisation. Cette manière d'opérer a l'avantage d'augmenter la fraction de vide du lit, comparativement avec un lit fixe, et de permettre plus facilement la sortie du CO_2 formé pendant la fermentation. D'autre part, il existe un mouvement du fluide autour des billes ce qui facilite les transferts de masse du milieu liquide vers les billes solides. Il est important de faire ressortir qu'une fois initié le processus de

désacidification il n'y a pas d'entrée ni de sortie de moût du système. De ce fait, l'opération est discontinuée.

5.4.3.1. Concentration initiale en acide malique

Comme dans les essais de fermentation avec les réacteurs non agités, on a évalué l'influence de la concentration initiale en acide malique du moût sur la cinétique de la fermentation malo-alcoolique. Les concentrations analysées ont été de 2 et de 5g/L. À l'entrée et à la sortie du fermenteur, on a pris des échantillons pour mesurer l'acide malique et les sucres.

Dans le graphique de la Figure 5-11, on présente l'évolution de l'acide malique et du sucre au cours de la fermentation.

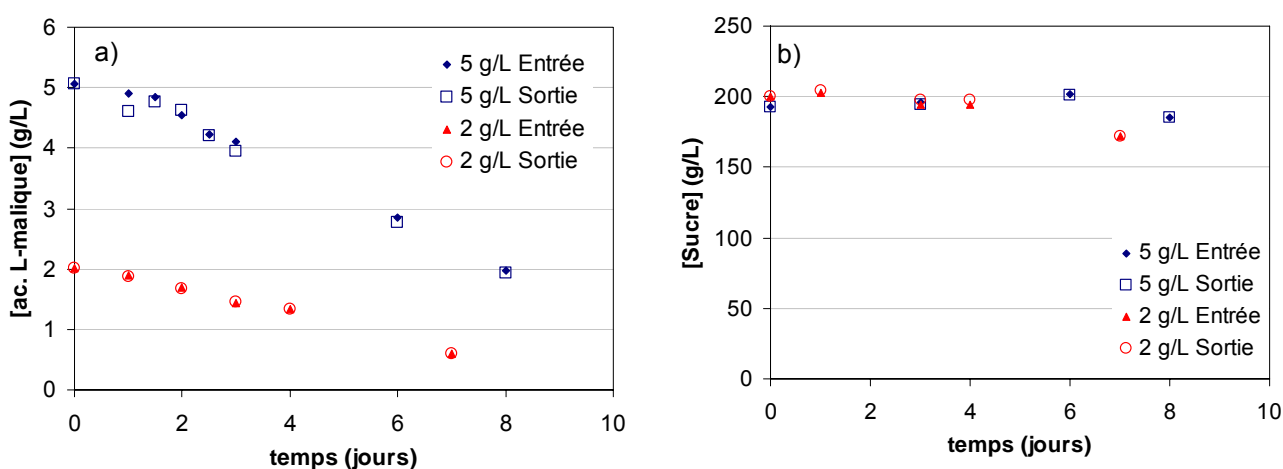


Figure 5-11 Profils de concentration a) de l'acide malique et b) du sucre mesurés à l'entrée et à la sortie du fermenteur en lit expansé pendant la désacidification d'un moût avec des concentrations initiales de 2 et 5 g/L d'acide malique ($T_{\text{ferm}} = 15^{\circ}\text{C}$, dose = 1g/L, débit recyclage = 100 mL/mn)

On constate que pour un essai donné les concentrations en acide malique à l'entrée et à la sortie du fermenteur sont égales ; de ce fait, le fermenteur peut être considéré comme parfaitement agité. On observe de la Figure 5-11b que le taux sucre se maintient constant pendant pratiquement tout l'essai, exception faite pour le dernier jour où il y a une légère consommation, due ici à une contamination par *S. cerevisiae*. Comme dans les essais avec les fermenteurs non agités, on a déterminé la vitesse initiale de consommation de l'acide malique (Tableau 5-5).

Tableau 5-5 – Valeurs de vitesse initiale de consommation de l'acide malique dans un fermenteur en lit expansé et dans un fermenteur non agité pendant la désacidification de moût avec des concentrations initiales de 2 et 5 g/L d'acide malique ($T_{\text{ferm}} = 15^{\circ}\text{C}$, dose = 1g/L, volume recyclage = 100 mL/mn)

[ac. L-malique] (g/L)	r_{M0} (g/L/jour)	
	Fermenteur lit expansé	Fermenteur non agité
2	0,18	0,14
5	0,45	0,27

Comme on pouvait s'y attendre, même dans le fermenteur en lit expansé la concentration initiale en acide malique continue à affecter la vitesse initiale de consommation. Pour la concentration de 2 g/L, les vitesses initiales de consommation de l'acide malique sont très semblables à celles observées dans les fermenteurs non agités. Néanmoins, pour la concentration de 5g/L la vitesse dans le fermenteur en lit expansé est presque le double de celles obtenues dans le fermenteur non agité. Ce résultat est sûrement lié au fait que dans le fermenteur non agité il existe des limitations au transfert du substrat du milieu jusqu'à la surface des billes. Dans le réacteur en lit expansé ces limitations sont clairement moindres en raison de l'agitation créée par le débit liquide circulant qui diminue l'épaisseur du film diffusionnel.

En termes d'application, cette différence induit une grande amélioration du procédé, dans la mesure où elle réduit substantiellement le temps nécessaire à la réalisation d'un cycle de désacidification comme on l'illustre dans la Figure 5-12.

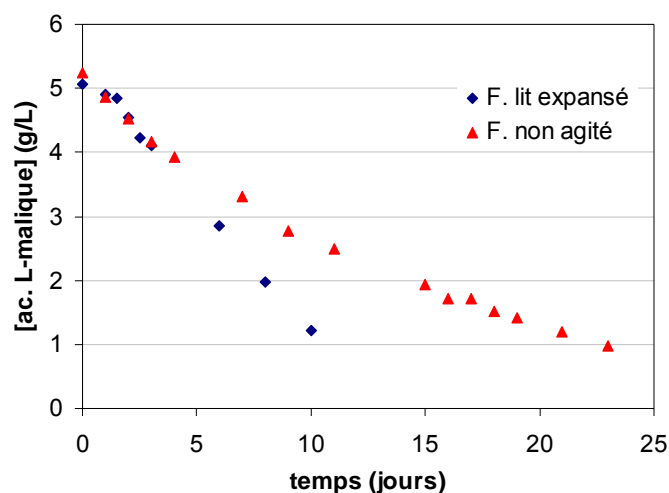


Figure 5-12 Comparaisons de profils de consommation d'acide malique dans le fermenteur en lit expansé et dans le fermenteur non agité ($T_{\text{ferm}} = 15^{\circ}\text{C}$, dose = 1g/L, débit de recyclage = 100 mL/mn)

D'un point de vue pratique la durée de la désacidification passe de 20 à 10 jours, ce qui peut conduire à accepter le procédé ou à le rejeter.

5.4.3.2. Concentration en levure *Shz pombe* immobilisée

Pour étudier l'effet de la concentration en *Shz pombe* immobilisée, en fermenteur en lit expansé, on a réalisé plusieurs essais avec les doses suivantes : 1, 2, 5 et 10 g/L. Les résultats de ces essais sont présentés dans la Figure 5-13.

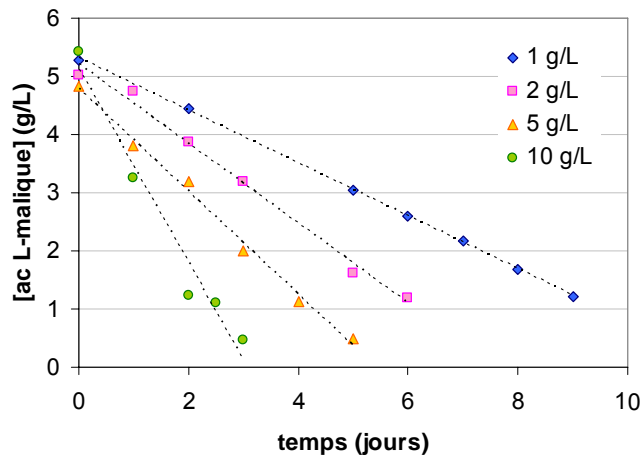


Figure 5-13 Profils de concentration en acide malique pendant la désacidification d'un moût dans un fermenteur de lit expansé avec recyclage total et avec différentes concentrations de *Shz pombe* immobilisée ($T_{\text{ferm}} = 15^{\circ}\text{C}$, débit de recyclage = 100 mL/mn)

À partir des données de la Figure 5-13, on a calculé la vitesse initiale de consommation de l'acide malique pour chaque concentration, et on a représenté graphiquement cette vitesse en fonction de la concentration en billes - Figure 5-14.

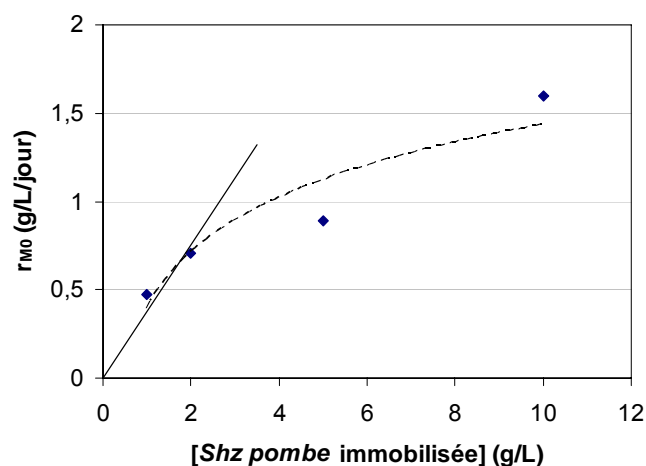


Figure 5-14 Influence de la concentration de *Shz pombe* immobilisée sur la vitesse initiale de consommation d'acide malique dans un fermenteur de lit expansé avec recyclage total ($T_{\text{ferm}} = 15^{\circ}\text{C}$, débit de recyclage = 100 mL/mn)

Sur le graphique de la Figure 5-14, on constate que la vitesse de réaction n'augmente pas proportionnellement à la concentration. Il est alors intéressant de considérer la vitesse spécifique définie comme la consommation d'acide malique par unité de masse de levures immobilisées par unité de temps et calculée en faisant appel à l'expression suivante :

$$r_s = \frac{1}{C_b} \cdot \frac{dC_M}{dt} \quad 5-12$$

où C_b représente la concentration de billes.

Cette vitesse spécifique est tracée en fonction de la concentration en billes sur la Figure 5-15; Comme attendu, on peut y voir une diminution de la vitesse spécifique de consommation d'acide malique lorsque la concentration en billes augmente.

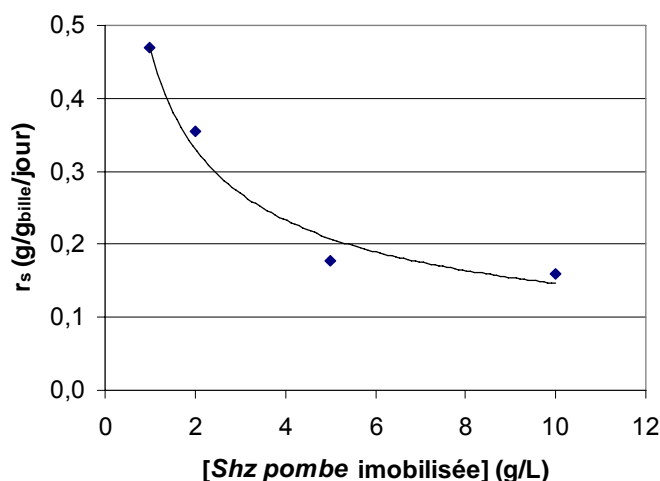


Figure 5-15 Influence de la concentration en *Shz pombe* immobilisée sur la vitesse spécifique de consommation de l'acide malique dans un fermenteur en lit expansé avec recyclage total ($T_{\text{ferm}} = 15^\circ\text{C}$, débit de recyclage = 100 mL/mn)

Bien que l'augmentation de la dose de levures immobilisées contribue à augmenter la vitesse initiale de consommation de l'acide malique, on observe une diminution de la vitesse spécifique. Dans la pratique cette diminution indique que pour chaque gramme de levure mis en œuvre dans le fermenteur la quantité d'acide malique consommé diminue au fur et à mesure qu'on augmente la concentration des billes.

5.4.4. Interaction entre les levures *Shz pombe* et les levures *S. cerevisiae*

Les résultats des FMA présentés jusqu'ici ont été, pour l'essentiel, obtenus dans des conditions qui ne correspondent pas à la réalité de la fermentation industrielle de moûts ou la FMA se déroulera dans la plupart des cas, simultanément avec la FA, réalisée par des levures *S. cerevisiae*.

Pour évaluer l'impact que l'inoculation de *S. cerevisiae* a sur le cours de la FMA réalisée avec *Shz pombe* immobilisée, deux essais distincts ont été faits. L'un a été conduit au laboratoire en

faisant appel au fermenteur en lit expansé avec recyclage total et l'autre l'a été dans des conditions de vinification réelles.

5.4.4.1. Essai laboratoire

Dans cet essai, la levure *Shz pombe* immobilisée a été placée dans le fermenteur en lit expansé et la levure *S. cerevisiae* (souche QA23 sous la forme de LSA) a été inoculée dans le réservoir du moût, 48h après le début de l'opération avec la levure immobilisée. Les résultats sont présentés dans la Figure 5-16.

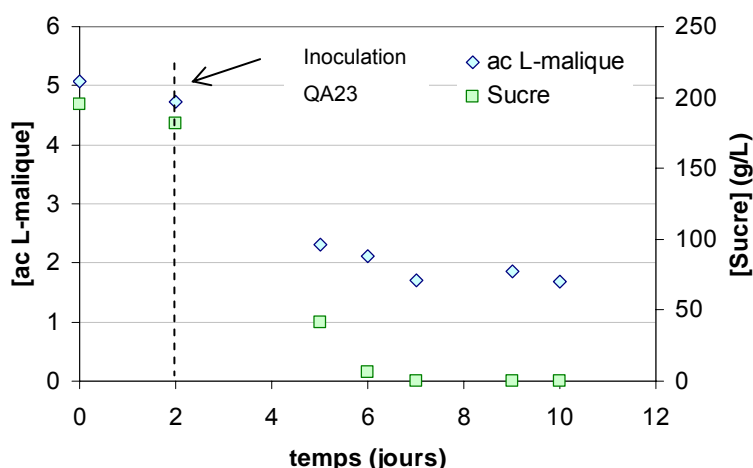


Figure 5-16 Influence de l'inoculation de *S. cerevisiae* sur la FMA réalisée avec *Shz pombe* immobilisée, dans un fermenteur en lit expansé avec recyclage total. ($T_{\text{ferm}} = 15^{\circ}\text{C}$, dose *Shz pombe* = 1g/L, dose *S. cerevisiae* (LSA) = 25 g/hL, débit de recyclage = 100mL/mn)

On observe que la FA et la FMA se déroulent simultanément, entre le deuxième et le sixième jour. La FA est plus rapide et, quand elle est finie, il existe encore 2g/L d'acide malique dans le vin. À partir de là on n'observe pas de consommation de l'acide malique. Cet arrêt peut être dû à l'effet inhibiteur que l'éthanol a sur *Shz pombe*. Bien que l'on n'ait pas mesuré l'éthanol à la fin de la fermentation sa concentration devait être de l'ordre de 11 à 12 % (v/v). Un autre paramètre qui n'a pas été mesuré et qui est connu pour affecter significativement le transport de l'acide malique par les cellules est la concentration en acide acétique (Sousa, 1995). L'arrêt dans la consommation de l'acide malique peut être lié l'un et/ou l'autre de ces composés mais puisqu'ils n'ont pas été quantifiés dans cette partie du travail, ce devra être l'objet d'une étude complémentaire.

Pour mieux évaluer l'influence de l'inoculation par *S. cerevisiae* sur le profil de consommation de l'acide malique, on a comparé l'évolution de la consommation lors de cet essai avec celle observée lors de l'essai réalisé dans le point 5.4.3.2, où les conditions étaient identiques mais hormis l'addition de *S. cerevisiae*.

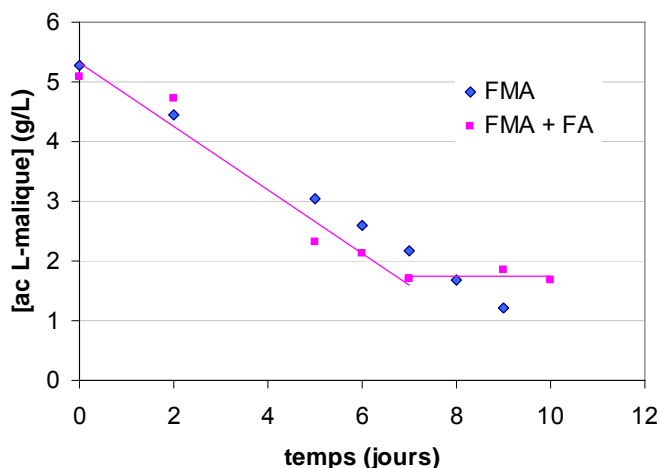


Figure 5-17 Évolution de la consommation d'acide malique par *Shz pombe* immobilisée pendant la FMA dans un fermenteur en lit expansé avec et sans réalisation simultanée de la FA ($T_{\text{ferm}} = 15^{\circ}\text{C}$, dose *Shz pombe* = 1 g/L, débit de recyclage = 100 mL/mn).

On constate de la Figure 5-17 que jusqu'au septième jour de la FMA, les deux essais se déroulent de façon semblable. À partir du septième jour, qui coïncide avec la fin de la FA, il cesse d'y avoir consommation de l'acide malique dans l'essai de co-inoculation tandis que, dans l'autre, la consommation continue à la même vitesse jusqu'à 1 g/L.

Il apparaît clairement que la co-inoculation de *Shz pombe* immobilisée avec *S. cerevisiae* a un effet négatif sur la fin de la FMA. Taillandier (1995) a reporté que la souche G2 de *Shz pombe* a un effet inhibiteur sur *S. cerevisiae*, et que l'inhibition était d'autant plus grande que la concentration en *Shz pombe* était plus grande. Cette constatation est contraire à ce que nous observons ici avec *Shz pombe* immobilisée. Cette différence peut être due au fait que *Shz pombe* immobilisée ne peut pas se multiplier et ne rentre donc pas en compétition avec *S. cerevisiae*. Il faut remarquer qu'au moment de l'inoculation, faite en respectant les informations du fabricant de LSA, les populations des deux levures sont proches l'une de l'autre (2.10^6 cell/mL env.), et que, de ce fait, aucune n'a d'avantage en ce qui concerne la population initiale.

5.4.4.2. Essai industriel

L'essai industriel a été réalisé dans les installations d'un producteur de la région de Rias Baixas en Espagne. L'inoculation par *Shz pombe* et *S. cerevisiae* a été conduite en simultané. La souche de *S. cerevisiae* a été réhydratée selon les instructions du fabricant, *Shz pombe* a été réhydratée à l'intérieur des sacs de polyéthylène, qui, ensuite, ont été suspendus à différentes hauteurs dans la cuve.

Le moût blanc issu du cépage Alvarinho avait un pH de 3,28, une concentration initiale d'acide malique de 8,5 g/L et le volume à fermenter était de 17 hL. La Figure 5-18a) présente l'évolution de la FA par mesure de la densité et de la FMA par mesure de l'acide malique.

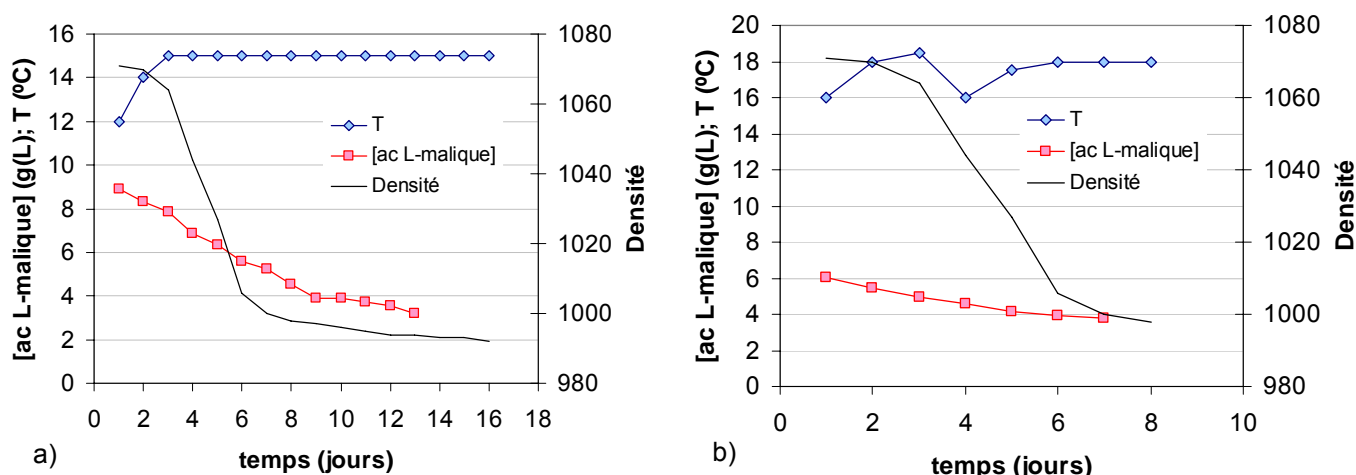


Figure 5-18 Essais de vinification industrielle de moût Alvarinho avec inoculation mixte par *Shz pombe* immobilisée et *S. cerevisiae*, à la dose de 200 g/hL et de 25 g/hL, respectivement. a) 1^{ère} application b) réutilisation

Dans la Figure 5-18a), on constate que, au début, la FA et la FMA se sont déroulées simultanément mais que vers la fin de la FA, la vitesse de consommation de l'acide malique diminue, jusqu'à cesser après le 9^{ème} jour (et jusqu'au 12^{ème} jour il n'y a pas eu de consommation). Au 13^{ème} jour les sacs sont retirés de la cuve et sont portés dans un autre moût également d'Alvarinho mais avec 6,5 g/L d'acide malique initial et un pH de 3,13. L'évolution observée lors de cette deuxième application est présentée dans la Figure 5-18b). Dans ce cas, et malgré une température de fermentation plus élevée, la réduction de l'acide malique a été moins accentuée que dans la première application. Cette différence peut être due au fait que les levures à la fin de la première application n'étaient plus dans l'état physiologique leur permettant d'assurer efficacement une deuxième désacidification. Ces résultats vont à l'encontre de ceux de Taillandier (1990) qui a réalisé jusqu'à 3 cycles de désacidification consécutifs, en observant que pour chacun d'eux la vitesse de désacidification était supérieure à celle du précédent.

Ici, les essais industriels ont confirmé ce qui était observé au laboratoire : quand la FA finit, la FMA devient significativement plus lente, voire même s'arrête.

On a, par ailleurs, constaté que du point de vue de leur utilisation, les sacs présentent l'inconvénient de devoir être agités quotidiennement pour le dégazage du CO₂, qui reste emprisonné dans les espaces interstitiels. Pour de petits volumes comme ceux mis en œuvre pour ces essais, ce n'est pas problématique mais pour des cuves de 300 hL le fait de devoir agiter 10 sacs rend la mise en œuvre lourde et fastidieuse. Ainsi le recours au fermenteur spécifique en lit expansé peut être une solution plus rapide et plus simple pour le traitement de grands volumes.

5.4.5. Désacidification de vin

S'il est généralement recommandé que la désacidification avec *Shz pombe* soit réalisée avant la fermentation alcoolique, la levure étant alors moins exposée à des composés toxiques comme l'éthanol et l'acide acétique, il est intéressant de connaître le comportement de *Shz pombe* immobilisée dans le vin. A cet effet, 3 essais de FMA ont été réalisés avec un vin à 11,3% (v/v) d'éthanol et 0,63 g/L de sucre, avec différentes concentrations initiales (2, 5 et 8 g/L) en acide malique. Les résultats de cet essai sont portés dans la Figure 5-19.

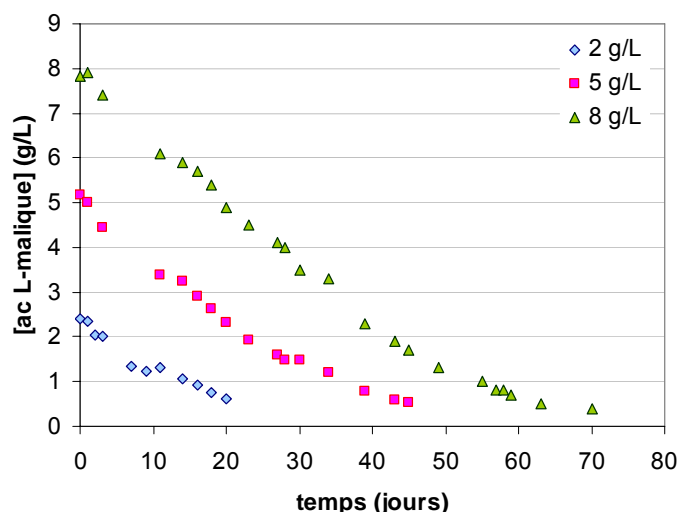


Figure 5-19 Évolution de la concentration en acide malique pendant la désacidification d'un vin avec *Shz pombe* immobilisée ($T_{\text{ferm}} = 15^{\circ}\text{C}$, dose = 1 g/L)

On constate que la *Shz pombe* immobilisée est capable de réaliser la FMA même dans le vin, néanmoins la durée de la désacidification est très longue. Pour la concentration de 8 g/L la FMA a pris 70 jours pour atteindre une valeur inférieure à 0,5 g/L. Dans le tableau 5-6 on présente les vitesses initiales de consommation de l'acide malique dans le vin et dans le moût. Les vitesses dans le moût ont été déterminées dans le point 5.4.1.2.

Tableau 5-6 – Valeurs de vitesse initiale de consommation de l'acide malique dans un vin et dans un moût avec *Shz pombe* immobilisée ($T_{\text{ferm}} = 15^{\circ}\text{C}$, dose = 1 g/L)

[ac L-malique] ₀ (g/L)	r_{MO} (g/L/jour)	
	Vin	Moût
2	0,09	0,14
5	0,10	0,27
8	0,11	0,39

De l'analyse du tableau 5-6, on observe que la vitesse de consommation de l'acide malique dans le vin est substantiellement inférieure à celle obtenue dans le moût. Pour une

concentration initiale d'acide malique de 2 g/L, la vitesse observée dans le vin est environ la moitié de celle observée sur le moût, pour 8 g/L la vitesse est presque 4 fois plus lente dans le vin. On constate aussi que la vitesse dans le vin semble être moins sensible à la concentration initiale en acide malique que dans moût. L'effet inhibiteur de l'éthanol sur le transport de l'acide malique peut aider à expliquer ces résultats.

L'analyse de la viabilité des cellules à la fin des essais a démontré que dans la fermentation en moût le pourcentage de cellules viables oscillait entre 87% et 92%, tandis que dans la fermentation sur vin les valeurs étaient significativement plus basses et variaient entre 23% et 55%. Cette perte de viabilité peut être associée non seulement à l'effet toxique de l'éthanol mais aussi à l'absence de sucre dans le vin. Selon Taillandier et Strehaiano (1991a) les cellules de *Shz pombe* en l'absence de sucre sont capables de dégrader l'acide malique mais leur viabilité va graduellement décroître. Nos observations vont dans ce sens.

5.5. Conclusions

La levure *Shz pombe* immobilisée et déshydratée est capable de réaliser la FMA sous différentes conditions de mise en œuvre.

L'addition d'anhydride sulfureux, jusqu'à 40 mg/L libre, dans des moûts qui fermentent à la température de 15°C, ne semble pas avoir d'influence sur le déroulement de la FMA avec *Shz pombe* immobilisée. Ce résultat va dans le sens de celui décrit par Yang (1975) pour les cellules libres. Nous observons aussi une dépendance de la vitesse de la FMA à la concentration en acide malique dans le moût : plus haute est la concentration initiale d'acide malique plus cette vitesse est grande. On a constaté aussi que pour des conditions initiales semblables, les levures libres sont 1,5 à 3 fois plus rapides que les cellules immobilisées. On a alors calculé l'énergie d'activation du processus de désacidification dans ces deux cas : nous obtenons avec des cellules immobilisées des valeurs de 16 ± 2 kcal/mol et de 31 ± 8 kcal/mol, pour les cellules libres. Ainsi, le processus de désacidification avec des cellules immobilisées serait contrôlé par la diffusion externe et non par la réaction comme c'est le cas avec les levures libres.

On a vu aussi que l'utilisation d'un fermenteur de lit expansé permettait de réduire au moins à la moitié le temps de la FMA, en comparaison avec un fermenteur non agité. Néanmoins il demeure toujours une dépendance de la vitesse de consommation de l'acide malique à sa concentration initiale. L'augmentation de la concentration en levures immobilisées augmente la vitesse initiale de consommation de l'acide malique, mais la réponse n'est pas proportionnelle. En effet, l'augmentation de la dose conduit à une réduction de la vitesse spécifique de consommation de l'acide L-malique.

Enfin, lors d'une inoculation simultanée par *Shz pombe* immobilisée et *S.cerevisiae* (cellules libres) la FA et la FMA se sont déroulées, au début, normalement. Mais, vers la fin de la FA on observe une réduction significative de la FMA, voire même un arrêt de la FMA

On a confirmé la validité de l'utilisation industrielle de *Shz pombe* immobilisée en régime de co-inoculation et on a conclu que pour de grands volumes l'utilisation du fermenteur en lit expansé est préférable à celle des sacs de polyéthylène perforés, dans la mesure où il y a un meilleur transfert de masse et où la mise en œuvre est moins laborieuse.

***FERMENTATION ALCOLIQUE EN
CONTINU DES MOÛTS***

6. Fermentation alcoolique en continu des moûts

6.1. Bibliographie

6.1.1. Procédés de fermentation alcoolique en continu

Depuis le début des années 70 et jusqu'à aujourd'hui les procédés de Fermentation Alcoolique en Continu (FAC) avec des levures immobilisées ont suscité beaucoup d'intérêt. Cet intérêt vient du fait que l'utilisation de cellules immobilisées permet la mise en œuvre de concentrations cellulaires élevées dès le début de l'opération, en permettant ainsi des vitesses de réaction élevées et en conséquence de hauts taux de productivité.

Il existe une profusion de travaux en laboratoire sur la FAC avec des cellules immobilisées, majoritairement orientés vers la production d'éthanol carburant et vers celle de la bière. Bien qu'en nombre plus réduit, quelques travaux existent aussi pour la FAC de moûts en vue de la production de vins. Malgré le nombre élevé de travaux, très peu de procédés ont atteint l'échelle industrielle. Probablement cette divergence est due à la somme de difficultés techniques (augmentation de la complexité du procédé par rapport au batch, déviations sensorielles, risque accru de contamination) et aussi économiques qui affectent les procédés biologiques en continu (Branyik et al, 2002). De plus, le fait que la FAC avec des levures immobilisées entre en compétition avec des procédés déjà mûrs, bien étudiés et avec un fonctionnement industriel reconnu, contribue à ce que le secteur productif ait quelque inertie, et même méfiance, pour parier sur le changement.

Dans les huit dernières années, des travaux publiés sur les technologies d'immobilisation et d'application de ces produits dans des fermentations alcooliques en continu s'accordent sur le fait que l'utilisation de cellules immobilisées pour la FAC a des avantages comparativement aux procédés traditionnels utilisant des levures libres (Kourkoutas et al. 2004, Verbelen et al. 2006), spécialement parce qu'elles permettent d'obtenir des productivités plus élevées. Néanmoins, Verbelen et al (2006), rapportent que l'utilisation de cette technologie à l'échelle industrielle, pour les boissons fermentées, a été limitée i- par le manque de preuve sur sa rentabilité économique, ii- par des difficultés techniques d'ingénierie et iii- par la modification des profils sensoriels. Verbelen et al. (2006) et Kourkoutas et al. (2004) considèrent que la réduction de coûts associés au support d'immobilisation est fondamentale pour la viabilité économique du procédé ; ils trouvent que des efforts doivent être effectués dans la recherche de supports bon marché, abondants et de qualité alimentaire (pour boissons fermentées).

6.1.2. La FAC pour la production des vins tranquilles

Les références bibliographiques pour la production de vin en faisant appel à la FAC sont très limitées spécialement en ce qui concerne des efforts de changement d'échelle des fermenteurs.

Ce fait peut s'expliquer par le caractère traditionnel du secteur, car dans le secteur des bières plusieurs sociétés ont déjà mis en œuvre des procédés de fermentation continue avec des cellules immobilisées (Rose et Harrison, 1993). Par exemple à Martens Brewery il a été mis en œuvre un système continu avec capacité de production de 3 millions d'hectolitres par année.

Le tableau 6-1 résume les travaux existants dans la bibliographie que nous avons considérés comme les plus pertinents, sur la FAC en faisant appel à des cellules immobilisées pour la production de vins tranquilles.

Tableau 6-1 – Résumés des caractéristiques de quelques procédés de laboratoire et conditions utilisées pour la production de vins tranquilles en faisant appel à la FAC avec des cellules immobilisées

Support	Configuration fermenteur	C _{so} (g/l)	T (°C)	t _{op} * (jours)	Référence
Sintered glass plates + alginate calcium	Horizontale multiétage	250	25	42	Ogbonna et al. 1989
Foam glass	5 Colonnes en série Lit fixe	320	22	105	Bonin et al. 2006
k - carragenato	Colonne Lit fixe	220	13	90	Uematsu et al. 1988
—	Membrane	200	25	14	Takaya et al. 2002
Gluten pellets	Colonne multiétage Lit fixe	220	10 à 30	55	Sipsas et al. 2009
Alginate calcium + chitosan	Colonne Lit fixe	217	20	53	Drichoutis et al. 2003
Cellulose deslinhificada	Colonne multiétage Lit fixe	210	16 à 30	-	Loukatos et al. 2003
Gluten pellets	Colonne multiétage Lit fixe	210	16 à 30	-	Loukatos et al. 2003
Alginate calcium	CSTR	50 - 160	30	-	Vives et al. 1992
Alginate calcium	Colonne Lit fixe	210 - 240	7 à 27	80	Bakoyianis et al. 1997

* t_{op} - temps d'opération dans régime continu

Comme on l'observe dans le tableau 6-1 les procédés étudiés en laboratoire font appel à différents supports d'immobilisation ; certains d'eux ne sont pas autorisés dans le secteur de l'œnologie - foam glass, gluten pellets. Outre ces supports, il en existe d'autres comme des pièces de fruit (poire, pomme, ...) ou des roches d'origine volcanique (kissiris) (Kourkoutas et al. 2010).

Bien que quelques auteurs déconseillent l'utilisation des supports type gel (alginates et carragenates) en raison d'une éventuelle instabilité mécanique dans les fermenteurs de grande

capacité (Kourkoutas et al. 2010), ceux-ci apparaissent dans plus de 40% des publications présentées. D'autre part comme ces fermenteurs de grande échelle n'existent pas, il est difficile de prouver qu'une telle affirmation est vraie. En outre, l'expérience de Proenol dans la manipulation (ne pas confondre avec fermentation) à large échelle de levures immobilisées en billes d'alginate, montre que les billes présentent un comportement correct en ce qui concerne la stabilité mécanique, même dans des situations de transport hydraulique.

Dans le tableau 6-1, on observe que la concentration en sucre dans l'alimentation du fermenteur est semblable dans plusieurs références et est proche de ce qu'on peut attendre dans un moût. Mais les températures de fermentation sont significativement différentes et quelques-unes sont éloignées de la réalité industrielle comme c'est le cas de Bakoyianis et al. (1997) qui proposent de réaliser des fermentations à 7°C. On constate aussi que c'est possible de maintenir le système de fermentation à l'état stable pendant des périodes qui varient entre 14 et 105 jours. Ces données ne sont pas suffisantes pour comparer les différents procédés étudiés, néanmoins elles permettent d'avoir une idée générale des procédés existants.

6.1.3. Quelle configuration de fermenteur pour la FAC ?

Bien que actuellement on connaisse différents types de fermenteurs avec des capacités optimisées de mélange et de transfert de masse, la majorité des travaux présentés dans le tableau 6-1 font appel à des fermenteurs qui sont des colonnes verticales et qui opèrent en lit fixe. La raison de ce choix est due à la simplicité de conception et aux modestes besoins en équipement requis. Néanmoins les fermenteurs à lit fixe présentent quelques inconvénients comme des limitations de transfert de masse, la tendance à former des canaux préférentiels et l'accumulation de CO₂ (Verbelen et al. 2006).

Comme alternatives apparaissent les fermenteurs en lit fluidisé et ceux du type *air-lift* qui ont l'avantage de diminuer significativement les limitations au transfert de masse externe, mais qui exigent attention en ce qui concerne la différence de densité entre le milieu de fermentation et celle des cellules immobilisées. Dans le cas du fermenteur en lit fluidisé, les valeurs de densités ne doivent pas être proches afin d'éviter des situations de transport hydraulique, mais elles ne doivent pas non plus être éloignées car cela augmente les coûts opérationnels, de pompage par exemple. Dans le fermenteur *air-lift*, il est d'intérêt que la différence des densités soit la plus faible possible pour faciliter la circulation des cellules immobilisées. Les fermenteurs continus agités (CSTR) sont aussi une option mais ils exigent du support une bonne résistance mécanique car il peut être facilement endommagé par les hélices de l'agitateur (Verbelen et al. 2006).

Pour ces raisons, on a choisi dans ce travail de tester les solutions les plus simples qui correspondent aux fermenteurs en lit fixe et en lit fluidisé.

6.1.4. Effets de la FAC sur les levures immobilisées

L'opération en continu de la fermentation alcoolique avec des levures immobilisées peut induire des modifications dans la morphologie des cellules comme l'a démontré Bonin et al. (2006) avec deux souches différentes de *Saccharomyces bayanus*. Après 105 jours de fermentation les cellules filles se présentaient allongées et en forme de poire. Dans quelques cas les cellules filles ne se séparaient pas complètement des cellules mères, en restant liée par une paroi commune et parfois elles avaient même un cytoplasme commun. Selon l'auteur, de telles modifications pourraient être le résultat de l'exposition continue à l'éthanol, au sucre, au CO₂, et au manque d'oxygène. À la fin de l'essai la viabilité des cellules oscillait entre 10 et 43% selon le lieu d'échantillonnage. Uematsu et al. (1988) ont fait fonctionner un fermenteur pendant 90 jours avec des cellules immobilisées sur carragénate et ont eu pendant tout l'essai des viabilités supérieures à 90%. Par contre ils ont observé qu'à la fin de l'essai les billes avaient souffert d'une augmentation de volume d'environ 10 %. De même, Vives et al. (1992) ont observé une augmentation de volume des billes pendant la fermentation et ont constaté que le diamètre final était environ 1,4 fois le diamètre initial. Les auteurs ont vérifié que l'augmentation de diamètre était due à la multiplication des cellules à l'intérieur des billes. Quand la concentration de cellules dans les billes était basse ($8 \cdot 10^6$ cell/g_{bille}) elles se reproduisaient de façon homogène dans toute la bille, néanmoins quand la concentration était plus élevée ($8 \cdot 10^8$ cell/g_{bille}) la croissance se réalisait préférentiellement dans la périphérie de la bille. Une telle différence peut être due au fait que les cellules elles-mêmes limitent la diffusion de l'oxygène ou d'autres composés nécessaires pour la croissance. Dans un cas comme dans l'autre la population se stabilisait quand la concentration de cellules était proche de $5 \cdot 10^9$ cell/g_{bille}. L'hétérogénéité de la croissance cellulaire à l'intérieur des billes avait aussi été constatée précédemment par d'autres auteurs (Godia et al. 1991).

6.1.5. Caractéristiques chimiques des vins produits par FAC

Malgré l'existence des différences entre les travaux d'Ogbonna et al. (1989) et de Drichoutis et al. (2003), notamment dans la configuration du fermenteur, les deux ont constaté que la composition chimique des principaux constituants du vin issu du système continu et d'un système batch étaient semblables. Loukatos et al. (2003) en utilisant 3 supports différents (cellulosedéfinifiée, kissiris et gluten pellets) ont obtenu des différences significatives en ce qui concerne la concentration en composés volatils dans le distillat de vins issus de la FAC. Le distillat obtenu à partir de la fermentation avec cellulose définifiée avait des concentrations inférieures en composés négatifs comme le 1-propanol et l'isobutanol. Dans les essais de Sipsas et al. (2009), la concentration en alcools supérieurs était plus basse dans le processus batch que dans le continu, néanmoins Drichoutis et al. (2003) ont observé précisément l'inverse.

A partir de ces travaux, il nous semble que les informations décrites dans la bibliographie à l'égard d'éventuelles modifications de la composition chimique du vin dûes à l'utilisation de la FAC ne sont pas concluantes.

6.2. Matériel et méthodes

6.2.1. Moût

Le moût utilisé dans les essais de laboratoire a été préparé par dilution avec de l'eau à partir d'un moût blanc d'une concentration en sucre de 800 g/L. Après préparation le moût était filtré par des cartouches de 0,45 µm, et stocké dans des flacons stériles à 4°C jusqu'à utilisation.

On a effectué un essai préliminaire pour lequel plusieurs préparations à partir de moût concentré ont été réalisées. Les caractéristiques du moût utilisé dans cet essai sont les suivantes :

- Glucose + fructose 190 - 210 g/L
- pH 3,0 – 3,2
- Acide malique < 3 g/L
- Azote assimilable >100 et < 200 mg/L
- SO₂ libre < 10 mg/L

Au cours du travail, on a réalisés 6 essais à l'échelle laboratoire et pour chaque essai, on a fait une préparation de moût. La procédure incluait : dilution avec de l'eau jusqu'à une concentration en sucre (Glucose + Fructose : G + F) de 200 g/L, puis correction du pH à 3,5, de l'azote facilement assimilable (AFA) à 220 mg/L et du SO₂ libre à 15 mg/L. On a mesuré aussi la concentration en acide malique et l'acidité totale. Le tableau 6-2 résume les caractéristiques du moût utilisé dans chaque essai.

Tableau 6-2 – Caractéristiques du moût utilisé dans chaque essai à l'échelle laboratoire

Essai	10 g/l	25 g/l	50 g/l	95 g/l	140 g/L	50 g/L+Ox
G + F (g/L)	204	205	203	204	205	202
pH	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
AFA (mg/L)	230	239	238	236	245	225
SO ₂ libre (mg/L)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ac totale (g/L)	3,8	3,8	3,9	3,7	4,0	3,7
Ac, malique (g/L)	2,1	1,8	2,0	1,9	2,3	1,1

Dans l'essai pilote de vinification en continu, on a utilisé du moût rouge résultant du processus de thermovinification. Ainsi, l'extraction de couleur avait déjà été réalisée et la pellicule du raisin

était réduite à des particules de petite taille, ce qui a évité le colmatage des grilles du fermenteur et aussi des billes. Comme l'essai a été réalisé pendant la période de vendange, on a eu des difficultés à d'obtenir la composition exact du moût. On savait seulement qu'il changeait tous les jours. Les quelques données disponibles indiquaient que la concentration en sucres a oscillé entre 189 et 210 g/L.

6.2.2. Filtration stérile

La filtration du moût a été réalisée conformément à ce qui a été décrit au point 4.2.2.

6.2.3. Réhydratation des levures immobilisées

Les levures immobilisées utilisées ont été produites conformément à la formulation FE4 décrite en 3.2 Expérimentations d'immobilisation. Dans cette formulation, on utilise un mélange de deux alginates, les levures *S. cerevisiae* (QA23) sont placées dans la couche externe ; dans la couche interne, il existe une réserve nutritionnelle. Le nombre de billes par gramme est plus faible que dans les autres formulations, donc les billes sont plus grandes. La réhydratation a été réalisée comme décrit dans le point 5.2.3, avec une température de solution de réhydratation de 37°C au lieu de 30°C.

6.2.4. Équipement de fermentation en continu

- Fermenteur de laboratoire

Le montage expérimental, présentée dans la Figure 6-1 est constitué par un fermenteur cylindrique vertical de volume total de 1,05 L ($\phi = 42$ mm), avec une zone d'expansion dans la partie supérieure. Des grilles métalliques ont été placées à la base et en tête de colonne pour retenir les billes. Le moût était alimenté en continu par la base avec une pompe péristaltique Masterflex L/S et le vin qui sortait en partie supérieure était acheminé vers un réservoir. La mesure du débit d'alimentation du fermenteur était réalisée grâce à une balance sur laquelle était placé le réservoir d'alimentation.

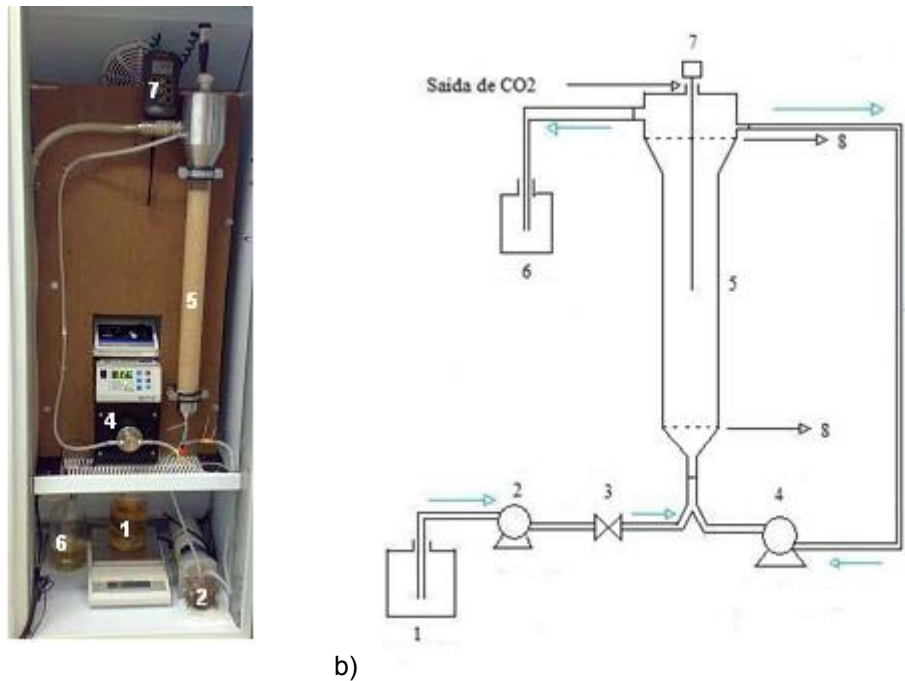


Figure 6-1 Fermenteur à lit fluidisé continu a) photographie, b) représentation schématique. 1 - réservoir de moût ; 2 - pompe d'alimentation ; 3 - clapet anti-retour ; 4 – pompe de recyclage ; 5 - fermenteur, 6 - réservoir de vin ; 7 - sonde de température, 8 - grilles de rétention des billes.

Comme le volume d'alimentation de moût n'était pas suffisant pour maintenir le lit dans un état de fluidisation, on a créé un circuit de recyclage où le vin/moût était aspiré en partie supérieure du fermenteur et réalimenté par la partie inférieure conjointement avec le courant d'alimentation. Le recyclage était assuré par une pompe Watson-Marlow 323U. Quand cette pompe était débranchée le fermenteur pouvait opérer comme s'il était un fermenteur à lit fixe.

L'installation était placée à l'intérieur d'une chambre à température contrôlée.

Pour le démarrage de l'installation les billes étaient placées dans le fermenteur et on ajoutait le moût. On le laissait fermenter jusqu'à ce que la concentration en sucres soit inférieure à 2 g/L. Quand cette valeur était atteinte, on initiait l'alimentation continue de moût et la fluidisation du lit.

Avant et après chaque utilisation, tout le système était désinfecté avec une solution de Divosan Activ 0,5 %. Cette solution circulait dans tout le système pendant 1 heure. Les flacons d'alimentation étaient stérilisés à l'autoclave, à 121°C pendant 20 mn.

○ Fermenteur pilote

Pour la réalisation d'essais à l'échelle pilote, on a construit un fermenteur en acier inox, avec un volume de 170 L. Dans la Figure 6-2, on présente un dessin technique et une photographie du fermenteur.

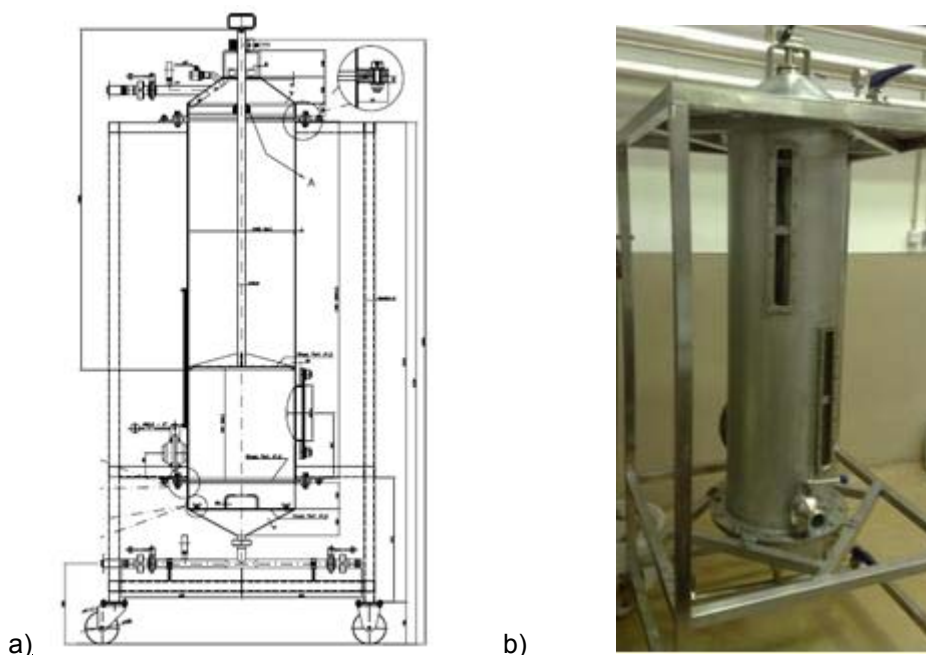


Figure 6-2 Fermenteur pilote en acier inox de volume $V = 160\text{ L}$ a) dessin technique
b) photographie

Le fermenteur avait une grille en bas et une autre en haut pour retenir les billes. La hauteur de la grille supérieure pouvait être ajustée. L'alimentation en moût du fermenteur était faite par une pompe équipée d'un variateur de fréquence, dont le volume minimum était de 20 L/h . Le moût entrant par la partie inférieure et sortait conjointement avec le CO_2 produit par la fermentation, au sommet de la colonne. Avant utilisation du fermenteur, la pompe et les canalisations ont été désinfectées avec une solution de Divosan Activ 0,5%.

6.2.5. Techniques analytiques

Les techniques analytiques utilisées dans cette partie du travail ont déjà été décrites dans les chapitres précédents :

- Dosage enzymatique du glucose et fructose → consulter 2.4.3
- Dosage enzymatique de l'acide L-malique → consulter 4.2.5
- Dosage de l'azote assimilable (AFA) → consulter 4.2.7
- Détermination de l'acidité totale → consulter 4.2.8
- Dosage de l'anhydride sulfureux ait exempté → consulter 4.2.9
- Détermination de l'alcool → consulter 4.2.10
- Détermination de la densité optique → consulter 5.2.5.1

La détermination de l'alcool par ébulliométrie n'est pas conseillée quand les concentrations en sucre dans la solution sont supérieures à 4 g/L car cela introduit des erreurs notables. Néanmoins n'ayant aucun autre moyen disponible dans le laboratoire, on a réalisé la mesure de

l'éthanol dans le moût/vin résultant de l'essai même quand la concentration de sucre était supérieure à 4 g/L.

6.3. Expérimentation

6.3.1. Essai préliminaire en lit fixe

On a réalisé un essai préalable pour évaluer si dans le fonctionnement du fermenteur de laboratoire en lit fixe, le dioxyde de carbone produit par la fermentation serait suffisant pour créer de l'agitation dans le milieu et s'il ne serait pas accumulé à l'intérieur du fermenteur. Dans cette situation, la pompe de recyclage a été débranchée et le circuit fermé. En outre, on a cherché à étudier pendant combien temps les billes se maintenaient opérationnelles et intègres. Les essais de fermentation en continu dans le fermenteur à lit fixe se sont déroulés pendant 22 jours consécutifs avec différents débits d'alimentation. Dans cet essai, on a utilisé la séquence suivante de débits : 25 - > 45 - > 80 - > 45 mL/h, Le temps de fonctionnement pour chacun de ces débits a été différent. Les conditions opératoires de cet essai, notamment le volume d'alimentation (q), le temps de résidence (τ^*), le taux de dilution (D) et la durée de chaque expérience sont résumées dans le tableau 6-3.

Tableau 6-3 – Conditions opératoires de l'essai préliminaire en fermenteur à lit fixe

Concentration de billes (C_b) = 190 g/L			
$T_{\text{fermentation}} = 20\text{ °C}$			
Q (mL/h)	τ^* (h)	D (h^{-1})	Durée (j)
25	44,0	0,023	2,8
45	24,4	0,041	7
80	13,7	0,073	5,9
45	24,4	0,041	6,3

Le passage de 80 à 45 mL/h oblige à une suspension temporaire de l'alimentation pour que le sucre descende à une concentration inférieure à 2 g/L avant de recommencer à alimenter.

6.3.2. Expériences à l'échelle laboratoire

La concentration en billes de 190 g/L de l'essai préliminaire laissant peu d'espace en tête de fermenteur, on a décidé que pour les essais en lit fluidisé la concentration maximale serait de 150 g/L, de cette façon il y aurait de l'espace pour fluidiser le lit et pour l'expansion des billes. Dans le fermenteur de laboratoire, avec le lit fluidisé différentes concentrations de billes ont été expérimentées pour évaluer la vitesse de fermentation avec chacune d'elles. En outre, on a

cherché à évaluer la résistance mécanique des billes dans une situation plus sévère que dans l'essai préliminaire, car avec la fluidisation, l'attrition entre les billes est plus grande. Le tableau 6-4 présente les conditions opératoires de chaque essai.

Tableau 6-4 – Conditions opératoires des essais réalisés dans le fermenteur à lit fluidisé avec des concentrations en billes entre 10 et 150 g/L

C_b (g/L)	10	25	50	100	150	50 + Ox
T (°C)	23,1	22,6	23,3	23,6	23,5	23,5
Q (mL/h)	91	89	92	93	92	90
τ^* (h)	11,5	11,8	11,4	11,4	11,4	11,7
D (h ⁻¹)	0,087	0,085	0,088	0,088	0,088	0,086

Dans les essais 10 à 150 g/L la seule modification a été la concentration de billes dans le fermenteur, donc les autres paramètres ont été maintenus sensiblement constants. L'essai 50 g/L + Ox a été identique à celui 50 g/L, en différant seulement par l'oxygénation du milieu. Deux modalités ont été utilisées pour addition de l'air :

- 10 fois par jour, chacune avec une durée de 2 mn
- en continu pendant la période diurne.

Pour tous les essais, après une fermentation *batch* qui se terminait quand la concentration en sucres était inférieure à 2 g/L, on initiait l'alimentation continue du moût.

Pendant les essais de laboratoire plusieurs paramètres ont été analysés: sucres et éthanol à la sortie du fermenteur, comptage de cellules dans le milieu et dans les billes.

6.3.3. Expériences à l'échelle pilote

Finalement, on a réalisé un essai pilote de fermentation en continu dans une cave productrice de vin dans le sud de France. Le volume total du fermenteur était de 170 L et il a été en fonctionnement continu pendant 27 jours. Dans cette période, il a fonctionné avec différents débits d'alimentation. L'objectif de cet essai a été d'évaluer la faisabilité de la fermentation alcoolique en continu avec des levures immobilisées dans des conditions réelles de vinification. Dans le vin en sortie du fermenteur, on a analysé le sucre, l'alcool et le pH. Les analyses ont été réalisées dans le laboratoire de la cave.

6.4. Résultats et discussion

6.4.1. Fermentation continue de moût en fermenteur à lit fixe

Le tableau 6-5 présente les concentrations maximales et minimales de sucres dans le vin à la sortie du fermenteur pour les essais préliminaires en lit fixe.

Tableau 6-5 – Fermentation continue d'un moût en fermenteur à lit fixe : concentrations en sucres (Glucose et Sucrose : G + F) en sortie

Q (mL/h)	25	=>	45	=>	80	=>	45
G+F _{sortie} Max (g/L)	0,9		3,0		11,6		2,2
G+F _{sortie} Min (g/L)	0,4		0,3		1,6		1,1

La Figure 6-3 illustre graphiquement les concentrations minimale et maximale des sucres pour chaque condition opératoire.

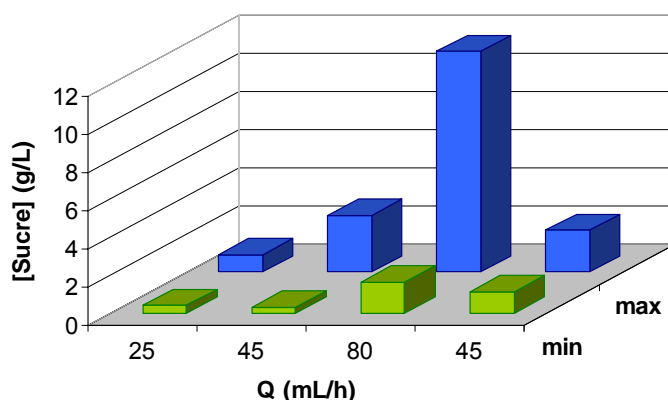


Figure 6-3 Concentrations maximales et minimales des sucres en fonction du débit d'alimentation pour un vin élaboré dans un fermenteur continu à lit fixe.

On constate qu'au fur et à mesure que le débit d'alimentation augmente, la concentration maximale des sucres dans le vin en sortie du fermenteur augmente aussi. Pour le taux de dilution de $0,07 \text{ h}^{-1}$ ($Q = 80 \text{ mL/h}$) la concentration de sucre dans le vin dépasse les 10 g/L , ce qui est une valeur très élevée pour un vin de table sec ($< 4 \text{ g/L}$). La concentration minimale aussi tend à augmenter avec l'augmentation de débit mais de façon moins accentuée. Ceci prouve que pour des débits plus forts, l'effluent sortant est plus hétérogène en ce qui concerne la quantité de sucre.

On observe aussi que les concentrations des sucres à la sortie, pour le débit de 45 mL/h avant et après l'augmentation à 80 mL/h sont très proches. Ceci prouve que le système est reproductible, et que suite à une variation, il revient à son état initial.

Dès les premières heures de fonctionnement du fermenteur, on a observé l'apparition d'une turbidité due à la croissance de cellules dans le milieu. L'évolution de cette turbidité a été suivie par la mesure de la densité optique au cours de la fermentation et est présentée dans la Figure 6-4.

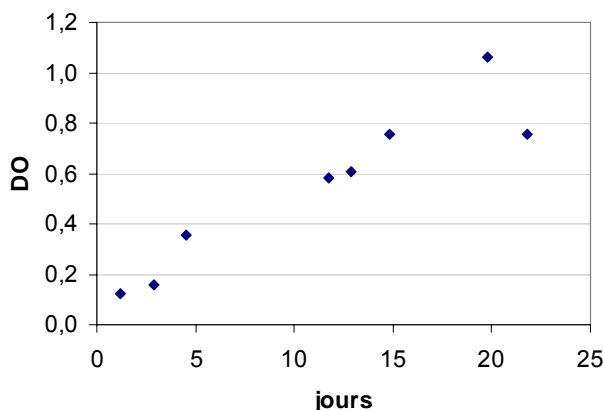


Figure 6-4 Évolutions de la densité optique (DO) pendant la fermentation de moût en continu dans un fermenteur à lit fixe.

On observe que la densité optique augmente régulièrement au cours du temps. Le comptage de cellules dans le milieu de fermentation a été réalisé à la fin de l'essai et a indiqué une population cellulaire totale de $2,7 \cdot 10^7$ cell/mL et une viabilité de 77 %. Cette augmentation de cellules libres n'est pas surprenante dans la mesure où la formulation FE4 n'a pas la couche extérieure d'alginate, ce qui permet aux cellules de se propager vers le milieu liquide. Un tel phénomène a déjà été observé par d'autres auteurs (Laque, 2000 ; Godia 1991)

La population cellulaire dans le fermenteur en début de fermentation était celle des levures immobilisées avec une concentration de $9,4 \cdot 10^8$ de cell/mL. Ce qui veut dire que la concentration initiale de levures immobilisées est pour le moins 10 fois supérieure à la concentration de levures libres à la fin de la fermentation. Il serait intéressant de connaître la contribution des cellules immobilisées et celle des cellules libres pour la fermentation ; un simple comptage ne donne pas à lui seul une explication suffisante, car l'évolution de la population à l'intérieur des billes est complexe. Godia (1991) a constaté que pendant la fermentation alcoolique la croissance des cellules à l'intérieur des billes n'était pas uniforme, et montrait une plus grande croissance dans la périphérie qu'au cœur de la bille. En outre d'éventuelles limitations diffusionnelles internes peuvent conduire à l'épuisement des substrats et des éléments nutritifs dans le cœur, induisant ainsi le décès des cellules s'y trouvant et accentuant encore davantage le déséquilibre de la distribution des cellules dans la bille.

Pendant l'essai, on a observé aussi une croissance significative des billes au fur et à mesure que la fermentation se déroulait. On a constaté aussi que l'augmentation de taille n'était pas uniforme dans la colonne. À la fin de l'essai, les billes qui étaient dans le bas du fermenteur,

c'est-à-dire plus proches de l'entrée du moût, avaient un diamètre plus grand que celles localisées au dessus. La Figure 6-5 illustre cette situation.

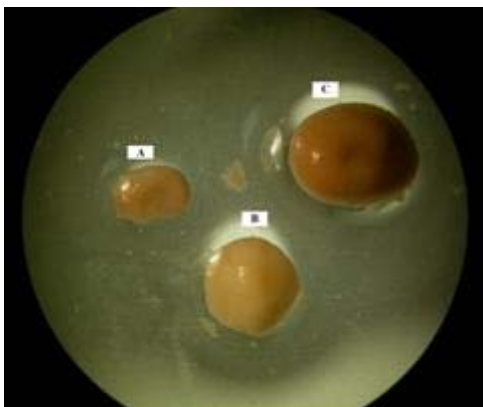


Figure 6-5 Photographie de 3 billes du fermenteur à lit fixe : A) Bille au début de la fermentation, B) bille prise sur le dessus du fermenteur après 22 jours de fermentation, C) bille prise dans le bas du fermenteur après 22 jours de fermentation.

La Figure 6-5 prouve qu'il y avait une augmentation de dimension des billes entre le début et la fin de l'essai préliminaire et que cette augmentation n'était pas uniforme, et dépendait de la localisation des billes. Comme le fermenteur est à lit fixe le plus probable est qu'un profil de concentration de sucre se soit créé dans la colonne, la concentration la plus élevée étant dans le bas et la plus basse en dessus. Les levures qui sont dans le bas peuvent avoir un accès facilité au sucre, bénéficiant d'un facteur supplémentaire pour se multiplier comparativement à celles situées en dessus.

Pour vérifier l'existence d'un gradient de sucre, on a rassemblé des échantillons en partie haute et au centre du fermenteur quelques jours avant la fin de l'essai préliminaire, quand le débit était de 45 mL/h. Les résultats sont présentés dans le tableau 6-6.

Tableau 6-6 – Concentration de sucre en haut et au centre du fermenteur à lit fixe pendant l'essai préliminaire

Jour	[Sucre] (g/L)	
	Haut	Centre
17	2,2	9,0
20	1,1	4,6
21	2,0	6,7
22	1,7	9,0

De l'analyse du tableau 6-6, on conclut que la concentration au centre est toujours supérieure à celle de la partie haute et donc la concentration de sucre n'est pas homogène dans le fermenteur. Ces données confirment ainsi l'existence d'un profil de concentration de sucre.

La grande difficulté dans le fonctionnement du fermenteur en lit fixe s'est avérée être due à la forte accumulation de CO_2 à l'intérieur. Parfois l'accumulation était telle que plus de la moitié du fermenteur était remplie de gaz. On a constaté aussi que suite à l'augmentation de volume des billes, le fermenteur est resté pratiquement sans espaces libres, rendant encore plus difficile la sortie du gaz. La Figure 6-6 illustre les situations décrites.

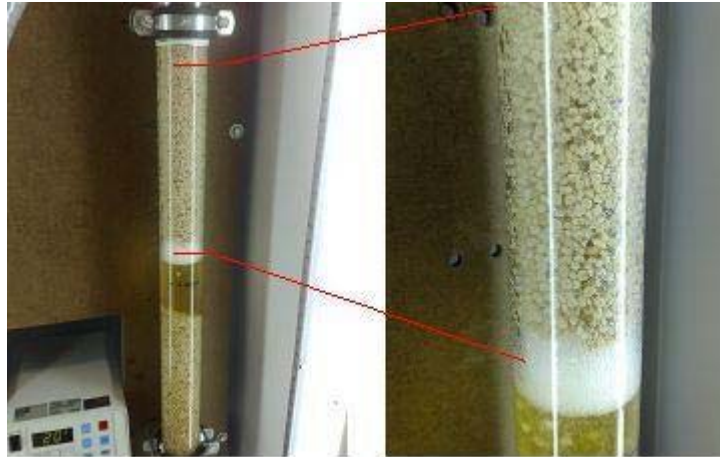


Figure 6-6 Photographies du fermenteur à lit fixe avec plus de la moitié de la colonne remplie avec du CO_2 .

L'accumulation du CO_2 s'est avérée être un problème dans le fonctionnement du fermenteur dans la mesure où il conduisait à la formation de canaux préférentiels ou à des situations extrêmes comme celle présentée dans la Figure 6-6. Dans tous les cas, la surface de contact entre le liquide et les billes était réduite et en conséquence la vitesse de fermentation était aussi réduite.

Ainsi on peut conclure qu'avec la géométrie de colonne et la concentration de billes utilisées, le fonctionnement du fermenteur en lit fixe n'est pas intéressant, en raison surtout des problèmes opérationnels liés à l'accumulation de CO_2 .

6.4.2. Fermentation en continu de moût dans un fermenteur à lit fluidisé

La Figure 6-7 illustre l'évolution des sucres, de la température et du débit d'alimentation au cours de la phase *batch* et pendant la fermentation en continu pour une concentration en billes de 100 g/L.

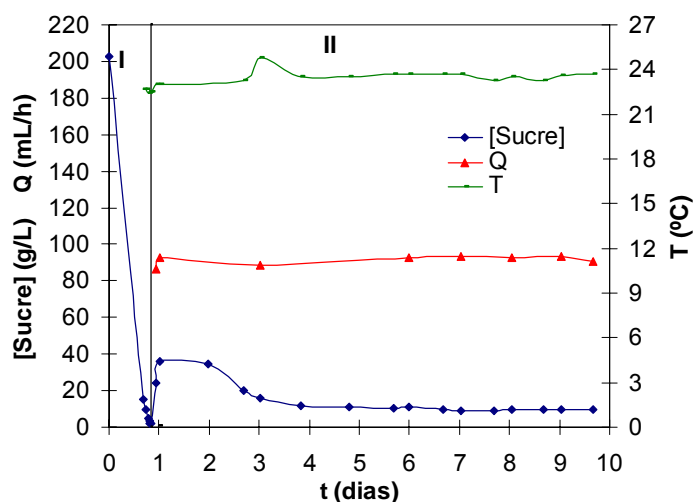


Figure 6-7 Évolution de la concentration en sucre, du débit d'alimentation et de la température au cours de la phase batch (I) et de la phase continue (II)

La durée de la fermentation *batch* était variable selon la concentration en billes dans le fermenteur. Le tableau 6-7 indique la durée de cette étape pour chacune des concentrations évaluées.

Tableau 6-7 – Durée de la fermentation *batch* pour les concentrations de billes utilisées.

Essai	10 g/L	25 g/L	50 g/L	100 g/L	150 g/L
t_{batch} (h)	72	45	30	20	<16

Comme attendu, la durée de la fermentation *batch* est plus courte pour les concentrations en billes dans le fermenteur plus élevées.

Sur la Figure 6-7, on observe qu'après le début de l'alimentation, il y a une montée de la concentration des sucres, suivie d'une descente et puis d'une stabilisation. Cette évolution est commune à tous les essais et quand on atteint la stabilisation on considère que l'état stationnaire est atteint. Les vitesses de consommation en sucre déterminées sont toujours afférentes à l'état stationnaire.

Dans les paragraphes suivants, on présentera successivement l'évolution des concentrations des sucres, des cellules libres et de l'alcool pendant la fermentation alcoolique en continu pour chacune des concentrations de billes.

6.4.2.1. Évolution de la concentration en sucre pendant la FAC dans le fermenteur à lit fluidisé

La Figure 6-8 représente l'évolution de la concentration en sucre pendant la fermentation alcoolique en continue (FAC) dans un fermenteur à lit fluidisé.

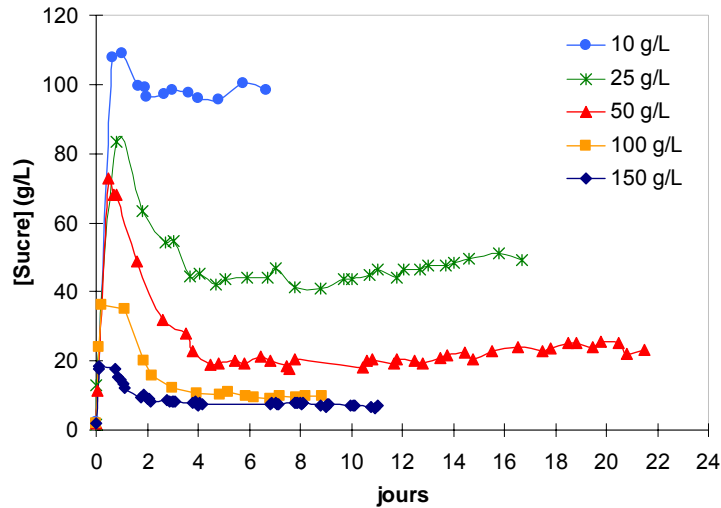


Figure 6-8 Évolution de la concentration en sucre pendant la FAC dans un fermenteur à lit fluidisé, pour différentes concentrations de billes ($D \approx 0,088 \text{ h}^{-1}$; $T \approx 23^\circ\text{C}$; $C_{\text{sucre entrée}} \approx 205 \text{ g/L}$)

Sur la Figure 6-8, on s'observe qu'après le début de l'alimentation, l'état stationnaire est atteint dans une période qui varie entre 2 à 4 jours, en fonction de la concentration en billes. On observe aussi qu'une fois ce régime atteint, il est possible de le maintenir jusqu'à la fin de l'essai.

On constate aussi que pour l'état stationnaire, la concentration en sucre en sortie du fermenteur est d'autant plus élevée que la concentration en cellules immobilisées est faible. Pour la concentration en billes de 10 g/L, les sucres à la sortie du fermenteur ont une concentration approximativement de 100 g/L. A l'opposé, pour une concentration de 150 g/L, la concentration en sucres dans le vin est seulement de 8 g/L.

Le comportement du fermenteur à lit fluidisé avec recyclage en fonctionnement continu peut être approché du comportement d'un réacteur continu parfaitement agité (CSTR). De cette façon le bilan matière du fermenteur en régime stationnaire peut être décrit par l'équation 6-1 :

$$r_s = \frac{Q(C_{so} - C_{sf})}{V_f} \quad 6-1$$

où : r_s représente la vitesse de consommation des sucres par unité de volume du fermenteur et par heure,

Q est le débit d'alimentation,

V_f est le volume du fermenteur,

C_{so} et C_{sf} sont les concentrations en sucres respectivement dans l'alimentation et dans la sortie du fermenteur.

L'expression 6-1 est valable seulement quand $Q_o = Q_f = Q$ où Q_o et Q_f sont respectivement les débits d'entrée et de sortie du fermenteur.

De façon similaire la vitesse spécifique de consommation des sucres peut être calculée :

$$r_{sS} = \frac{Q(C_{So} - C_{Sf})}{M_b} \quad 6-2$$

Où : r_{sS} est la vitesse de consommation des sucres par unité de masse de billes et par heure
 M_b est la masse de billes dans le fermenteur.

À partir des données de la Figure 6-8 et de l'expression 6-1, il est possible d'évaluer la vitesse de consommation des sucres en fonction de la concentration des billes dans le fermenteur - voir Figure 6-9.

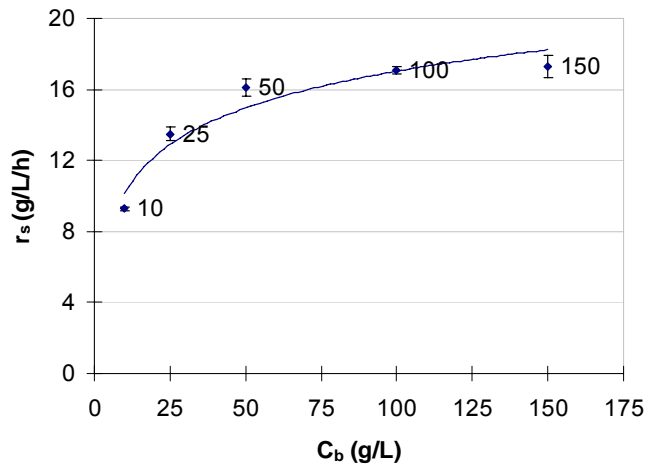


Figure 6-9 Vitesses de consommation des sucres en fonction de la concentration en billes dans un fermenteur continu en lit fluidisé ($D \approx 0,088h^{-1}$; $T \approx 23^\circ C$; $C_{\text{sucres}_{\text{entrée}}} \approx 205 \text{ g/L}$).

Sur la Figure 6-9, on observe que l'augmentation de la concentration des billes n'est pas accompagnée d'une augmentation proportionnelle de la vitesse de consommation des sucres dans le fermenteur. Le passage de la concentration en billes de 10 g/L à 150 g/L, qui représente une multiplication de la concentration par 15, ne permet que de doubler la vitesse de consommation de sucre.

On a déterminé aussi la vitesse spécifique de consommation de sucre pour chacune des concentrations en billes. Le graphique de la Figure 6-10 montre la variation de la vitesse spécifique en fonction de la concentration en billes.

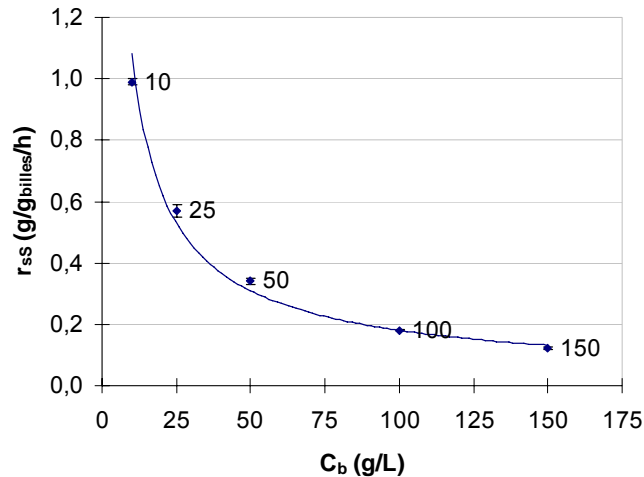


Figure 6-10 Vitesses spécifiques de consommation de sucre en fonction de la concentration de billes dans un fermenteur continu à lit fluidisé ($D \approx 0,088h^{-1}$; $T \approx 23^\circ C$; $C_{\text{sucrose}}^{\text{entrée}} \approx 205$ g/L).

Comme on peut le voir sur la figure 6-10, les vitesses spécifiques de consommation de sucre sont plus élevées quand la concentration en billes est faible, ce qui laisse penser que les levures immobilisées ont un plus grand rendement quand la concentration en billes est plus faible. Néanmoins c'est important de rapporter que les cellules libres aussi doivent avoir une contribution pour la fermentation et que probablement cette contribution varie avec la concentration de levures immobilisées présentes dans le fermenteur. Le graphique de la Figure 6-11 présente la concentration de cellules immobilisées et libres à la fin de chaque essai. Pour les levures libres chaque point du graphique est la moyenne des comptages des 3 derniers jours avant la fin de l'essai.

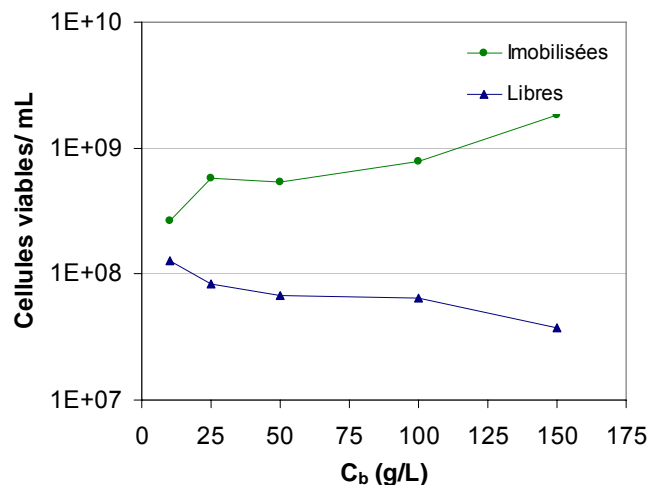


Figure 6-11 Concentrations de cellules viables immobilisées et libres (exprimées par volume de fermenteur) obtenues à la fin des essais de fermentation en continu pour les différentes concentrations de billes dans le fermenteur à lit fluidisé ($D \approx 0,088h^{-1}$; $T \approx 23^\circ C$; $C_{\text{sucrose}}^{\text{entrée}} \approx 205$ g/L).

On constate que pour la concentration en billes la plus basse, 10 g/L, les concentrations des cellules libres et immobilisées sont très proches ; la relation cellules immobilisées/cellules libres étant de 2:1. Au fur et à mesure qu'on augmente la concentration des billes dans le fermenteur, la concentration en cellules libres devient moins importante. Pour la concentration en billes de 150 g/L la relation immobilisée/libre est de 48:1. Aux vues de ces résultats, on ne peut pas s'attendre à ce que la contribution des cellules libres soit négligeable quand la concentration de billes dans le fermenteur est de 10 g/L mais ce n'est pas aussi vrai avec la concentration de billes de 150 g/L.

En résumé la vitesse spécifique (r_{ss}) calculée précédemment pour chaque concentration de billes est seulement apparente car il peut y avoir une contribution variable des cellules libres.

6.4.2.2. Évolution de la population de cellules libres et immobilisées pendant la fermentation en continu

Pendant la fermentation en continu, on a accompagné l'évolution des levures libres dans le fermenteur pour les différentes concentrations de billes. La Figure 6-12 présente graphiquement cette évolution.

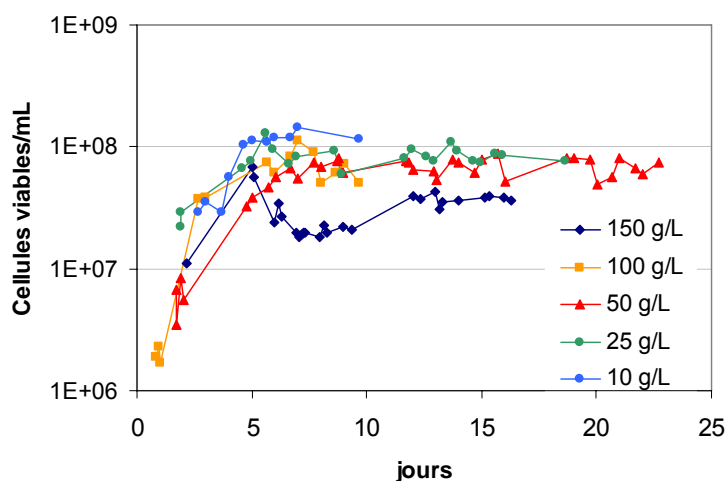


Figure 6-12 Évolution au cours du temps des cellules libres viables pendant la fermentation en continu d'un moût dans le fermenteur à lit fluidisé ($D \approx 0,088h^{-1}$; $T \approx 23^{\circ}C$; $C_{\text{sucré}}_{\text{entrée}} \approx 205 \text{ g/L}$).

La Figure 6-12 montre qu'indépendamment de la concentration de cellules immobilisées présentes dans le fermenteur, les cellules libres se développent jusqu'à des concentrations de l'ordre de 1.10^7 à 1.10^8 cellules/mL. Entre le 4^{ème} et le 7^{ème} jour, la croissance tend à se stabiliser en se maintenant sensiblement constante jusqu'à la fin des essais. La stabilisation de la croissance coïncide avec le début du régime stationnaire concernant la consommation de sucres.

Du fait de la difficulté de collecter des billes dans le fermenteur, on a seulement mesuré la population cellulaire dans les billes au début et à la fin des essais. Les résultats sont présentés dans la Figure 6-13.

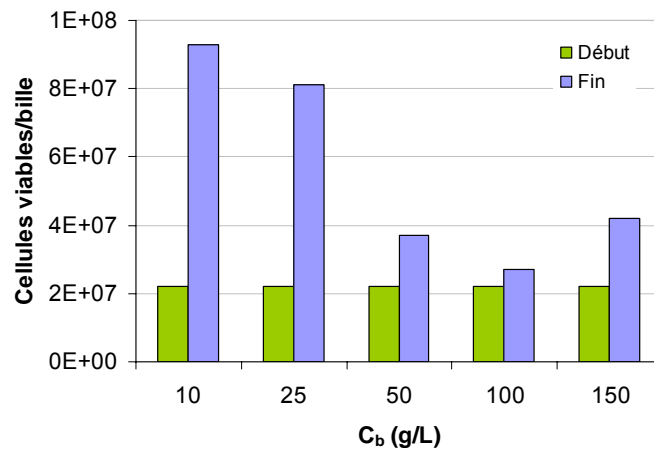


Figure 6-13 Concentrations de cellules par bille au début et à la fin des essais de fermentation, en fonction de la concentration de billes dans le fermenteur à lit fluidisé.

On constate qu'entre le début et la fin de la fermentation en continu, le nombre de cellules dans chaque bille augmente. On conclut donc qu'il existe une multiplication des cellules à l'intérieur des billes et qu'elle est plus importante quand la concentration en billes dans le fermenteur est plus basse (10 et 25 g/L). Pour des valeurs de concentration égales ou supérieures à 50 g/L la multiplication est plus restreinte.

On a aussi mesuré la viabilité des cellules immobilisées au début et à la fin des essais. On a vérifié qu'au début de la fermentation la viabilité était supérieure à 94 % et qu'à la fin, elle était supérieure à 92 %, exception faite pour l'essai 50 g/L pour lequel elle était seulement de 85 %.

6.4.2.3. Évolution de la concentration d'alcool dans le fermenteur à lit fluidisé pendant la FAC

La Figure 6-14 représente l'évolution de l'alcool au cours du temps, pour la FAC en régime stationnaire.

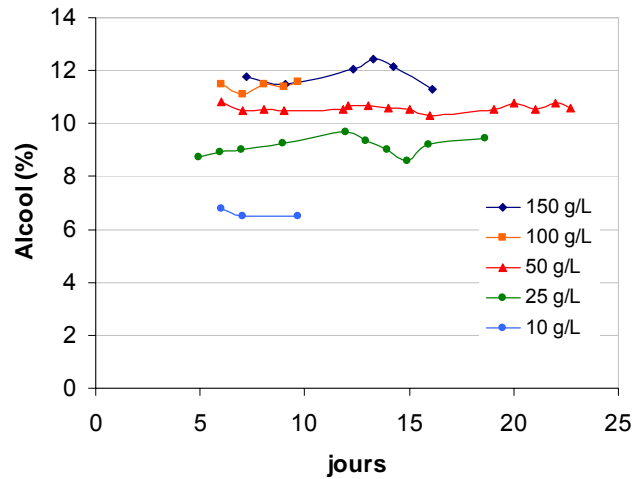


Figure 6-14 Évolution de la concentration d'alcool pendant FAC dans un fermenteur à lit fluidisé, avec de différentes concentrations de levure immobilisée ($D \approx 0,088h^{-1}$; $T \approx 23^{\circ}C$; $C_{\text{sucres}}_{\text{entrée}} \approx 205 \text{ g/L}$).

Comme pour la consommation des sucres, la production d'alcool se maintient stable une fois le régime stationnaire atteint. À partir des données de consommation de sucre et de production d'éthanol en état stationnaire, il a été possible de calculer le rendement en éthanol (Y_{ES}) - voir tableau 6-8.

Tableau 6-8 – Rendement en alcool pour les essais de FAC avec différentes concentrations de billes, dans le fermenteur à lit fluidisé.

$C_b \text{ (g/L)}$	$[\text{Sucre}]_{\text{consommé}} \text{ (g/L)}$	$[\text{Alcool}]_{\text{produit}} \text{ (\%)} \text{ (g/L)}$	$Y_{ES} \text{ (g/\%)} \text{ (g/\%)}$
10	108	6,6	16,4
25	159	9,2	17,3
50	184	10,6	17,3
100	195	11,4	17,1
150	197	11,9	16,6

A partir du tableau 6-8, on conclut que le rendement en alcool est à peu près constant, avec une valeur moyenne de 16,9g/%. On constate aussi qu'il est indépendant de la concentration en billes dans le fermenteur. La valeur moyenne du rendement est dans la gamme de ce que l'on attend pour une *S. cerevisiae*.

6.4.2.4. Effet de l'oxygénation pendant FAC

Dans cet essai, on cherchait à évaluer l'effet de l'oxygénation du fermenteur sur la consommation des sucres quand le fonctionnement se déroule en régime stationnaire.

La Figure 6-15 présente l'évolution de la concentration de sucre pour les essais avec et sans oxygénation.

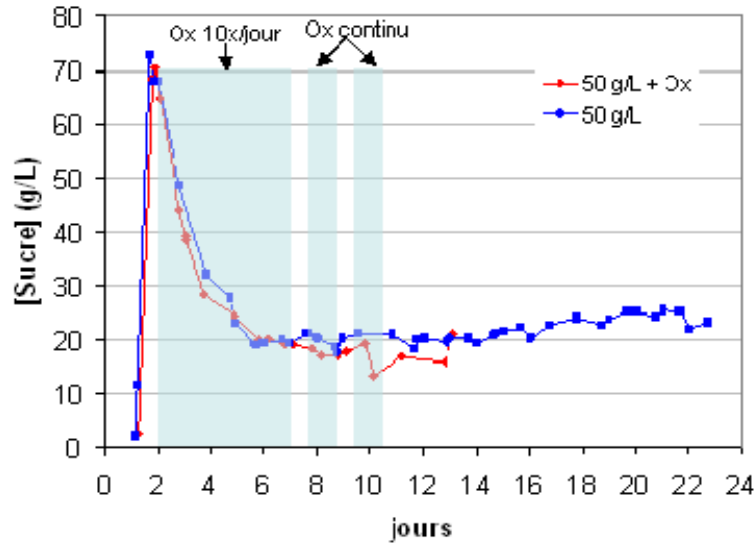


Figure 6-15 Évolution de la concentration de sucre pendant la FAC pour une concentration de 50 g/L de billes, avec et sans oxygénation du fermenteur. Ox10x/jour : oxygénation 10x par jour pendant 2 min ; Ox continu : oxygénation continue pendant le jour. ($D \approx 0,088\text{h}^{-1}$; $T \approx 23^{\circ}\text{C}$; $C_{\text{sucre entrée}} \approx 205\text{ g/L}$).

La Figure 6-15 montre que l'oxygénation n'a eu aucun effet visible sur la consommation des sucres car les courbes d'évolution du sucre au cours du temps avec et sans oxygénation sont superposables. Néanmoins l'oxygénation en continu a eu un effet clair sur la population de cellules libres comme le démontre le graphique de la Figure 6-16.

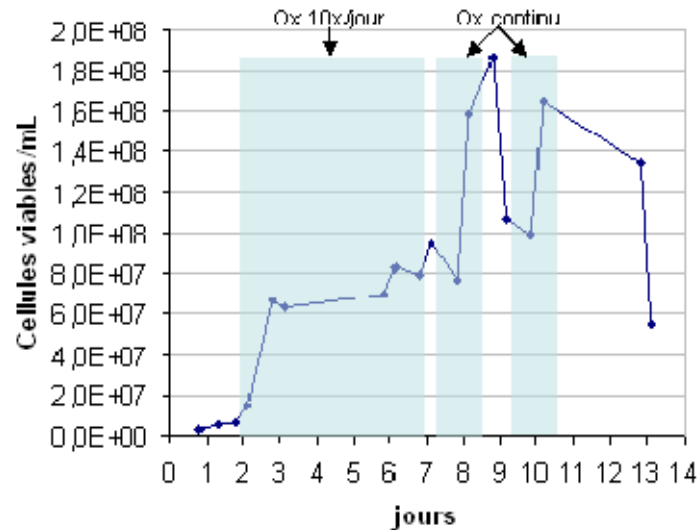


Figure 6-16 Évolutions de la concentration de cellules libres pendant la FAC pour une concentration de 50 g/L de billes, avec oxygénation du fermenteur. Ox10x/jour : oxygénation 10x par jour pendant 2 min ; Ox continu : oxygénation continue pendant le jour ($D \approx 0,088h^{-1}$; $T \approx 23^{\circ}C$; $C_{\text{sucré}}_{\text{entrée}} \approx 205 \text{ g/L}$).

On observe que l'oxygénation continue à promouvoir la croissance des cellules libres en faisant doubler leur concentration. Pendant le 9^{ème} jour qui n'a pas eu d'oxygénation, la population a diminué significativement mais après avec l'oxygénation du 10^{ème} jour, elle a augmenté à nouveau. Néanmoins cette augmentation du nombre de cellules ne s'est pas traduite par une consommation plus rapide de sucres, qui serait souhaitable.

6.4.3. Fermentation continue de moût dans des conditions réelles de vinification avec fermenteur à lit fixe

Cet essai a été réalisé dans une cave du sud de la France en utilisant du moût rouge provenant des raisins qui étaient réceptionnés pendant la vendange. Après traitement des raisins par des processus de thermovinification, le moût obtenu était dirigé vers le fermenteur. Par le fait de travailler dans des conditions réelles de cave la composition du moût dans l'alimentation était variable de jour à jour. Les informations mises à disposition indiquaient que la concentration de sucre dans le moût variait entre 180 et 210 g/L. Comme le fermenteur disponible pour l'essai ne permettait pas de fonctionner avec un lit fluidisé, on a travaillé en lit fixe, malgré les limitations que cela pouvait entraîner. La concentration en billes a été approximativement de 120 g/L et la température oscillait entre 20 et 25°C, car le contrôle était fait manuellement. Au cours de l'essai, on a expérimenté plusieurs débits pour évaluer la réponse du système. Dans la Figure 6-17, on présente les débits utilisés et les concentrations de sucre dans le vin en sortie du fermenteur.

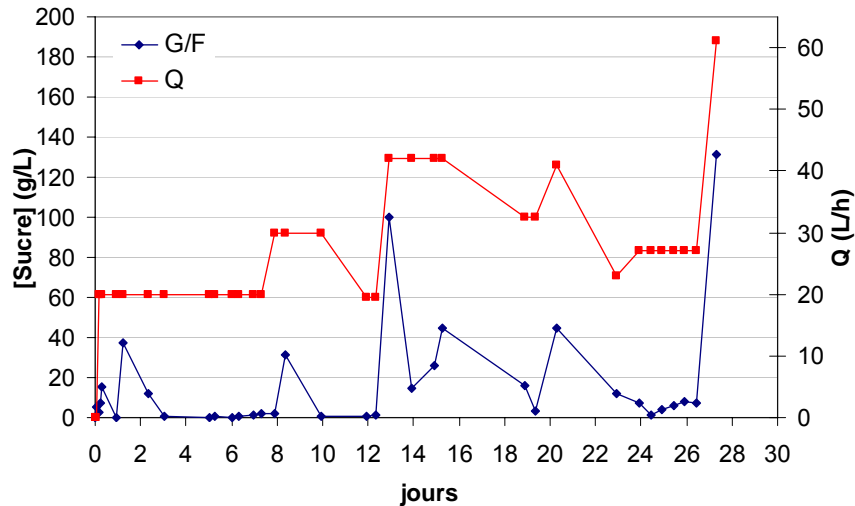


Figure 6-17 Evolution du débit et de la concentration des sucres dans le vin pendant la FAC dans des conditions réelles de vinification.

On a initié l'essai avec un débit d'alimentation de moût de 20 L/h. Dans la Figure 6-17, on observe que pour ces conditions, il est possible de maintenir le fonctionnement stable, en ce qui concerne les sucres. Entre le 3^{ème} et le 8^{ème} jour, la concentration des sucres était toujours inférieure à 2 g/L. En supposant que le moût avait environ 190 g/L de sucre, ce qui sûrement n'est pas très loin de la valeur réelle, la vitesse spécifique de consommation serait de l'ordre de 0,19 g/g_{bille}/h, ce qui est très proche des valeurs trouvées, en laboratoire, pour le fermenteur à lit fluidisé et pour la concentration de 120 g/L de billes. La Figure 6-18 illustre l'évolution de l'alcool et du pH au cours de la fermentation en continu jusqu'au 20^{ème} jour.

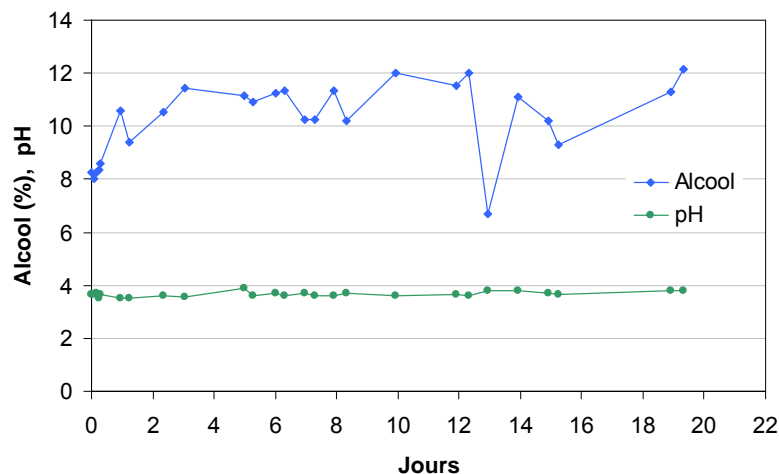


Figure 6-18 Évolution de l'alcool et du pH du vin pendant la FAC dans des conditions réelles de vinification.

On observe que l'alcool dans le vin oscille entre 10 et 12 %. De telles variations sont probablement dues aux oscillations de la concentration en sucre du moût et aussi aux variations qui sont introduites dans le débit d'alimentation. Ces dernières se voient

particulièrement bien au 13^{ième} jour où l'augmentation du débit, a conduit à une augmentation du sucre à la sortie du fermenteur et en conséquence à une réduction de la teneur en alcool, bien visible dans la figure 6-18.

On observe aussi que le système répond très rapidement à des variations de débit car quand on augmente ou réduit le débit, il y a toujours une variation des sucres dans le même sens. On constate encore que le système a fonctionné pendant 27 jours avec des interruptions dues à des problèmes mécaniques et électriques. À la fin de cette période les billes étaient restées intègres et les levures actives. Comme dans les essais de laboratoire, on a observé la présence de cellules libres et en outre une intense odeur de levure. Par le fait d'avoir utilisé un moût rouge, on a constaté que les billes ont gagné une coloration bordeaux. À la fin de l'essai, on a constaté l'existence de zones où il y avait des agglomérats de billes sèches. Un tel phénomène peut être dû à l'accumulation de gaz dans certaines zones empêchant la circulation du liquide dans ces zones. Cette observation montre l'intérêt de l'utilisation du lit fluidisé. À la fin de l'expérience, on a trouvé au fond du fermenteur environ 2 à 3 L d'acide tartrique précipité.

Cet essai a permis de valider l'utilisation de levures immobilisées pour la FAC dans des conditions réelles de vinification. Néanmoins, les aspects d'ordre hydrodynamique doivent être améliorés et l'option d'utilisation d'un lit fixe semble peu favorable en raison des problèmes créés par l'accumulation du dioxyde de carbone.

6.5. Conclusions

L'essai dans le fermenteur en lit fixe a démontré que c'est possible de réaliser la FAC avec des levures immobilisées et déshydratées, en obtenant à la sortie un vin avec moins de 2 g/l de sucre résiduel. Bien que le fermenteur ait fonctionné pendant 22 jours consécutifs, on a observé une forte accumulation de CO₂ qui a induit la formation de canaux préférentiels, en rendant l'opération très instable. Des essais récents dans notre laboratoire ont montré qu'avec une configuration différente du fermenteur c'est possible de travailler en lit fixe en évitant les problèmes mentionnés.

Les essais avec le fermenteur de lit fluidisé ont montré que l'augmentation de la concentration de billes conduit à une augmentation de la vitesse de consommation de sucres, néanmoins la vitesse spécifique s'abaisse considérablement. Pour des concentrations de billes supérieures à 100 g/L la vitesse spécifique est inférieure à 0,2 g/g_{billes}/h.

On conclut aussi qu'il y a une population de cellules libres qui grandit significativement pendant les cinq premiers jours de fermentation, en se maintenant à partir de là stable. La concentration de la population de cellules libres est d'autant plus importante que la concentration de billes dans le fermenteur est faible.

À l'intérieur des billes il existe aussi une croissance cellulaire pendant la FAC. La multiplication est plus importante quand la concentration en billes est basse. Pour les concentrations de 10 et 25 g/L de billes le nombre de cellules à l'intérieur de billes augmente pour le moins 4 fois.

La FAC n'a pas modifié le rendement de la levure en éthanol étant donné que 16.9 g de sucre produisent 1% d'éthanol. L'addition d'oxygène pendant la fermentation n'a pas montré avoir de rôle dans la consommation des sucres, en contrepartie elle a contribué à doubler la population de cellules libres dans le milieu.

La réalisation de l'essai en échelle pilote a prouvé que les billes peuvent être utilisées dans des conditions réelles de vinification pendant presque 1 mois, en maintenant l'intégrité physique et sans perte d'activité. La vitesse spécifique de consommation de sucre dans l'essai pilote a été très proche de celle obtenue dans le laboratoire avec le fermenteur en lit fluidisé, ce qui valide les essais en laboratoire.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion Générale

Ce travail présente les savoir-faire de Proenol et les études effectuées au sein de cette société répondant à 3 objectifs :

- la mise au point du procédé industriel d'immobilisations de levures,
- la validation et l'amélioration d'applications existantes : la prise de mousse et la fermentation maloalcolique,
- le développement d'une nouvelle application : la fermentation en continu de moûts.

Le **premier objectif** était la mise au point d'un procédé industriel d'immobilisation de levures. Le procédé présenté comporte 3 étapes clé qui sont : la formation de gouttes de forme sphérique, de structure et de dimension contrôlées, la gélification de ces gouttes dans une solution contenant du Ca^{2+} comme agent gélifiant ce qui conduit à l'obtention de billes et le séchage de ces billes humides de façon à obtenir un produit stable dans le temps.

Pour certaines, en fonction de leur utilisation future, ces billes sont composées d'un noyau qui contient les cellules de levures, enrobé d'une couche continue d'alginate.

Le « cœur » du procédé est la formation des gouttes. Cette étape est la plus délicate et celle dont le contrôle est le plus difficile. À partir de l'analyse bibliographique, les essais réalisés ont permis de définir le rôle de plusieurs paramètres intervenants dans le procédé et, partant de là, de définir les conditions opératoires optimales. Les paramètres qui nous ont intéressés sont la viscosité et la tension superficielle de l'alginate, les débits de la couche interne (noyau) et de la couche externe (enrobage), la fréquence de vibration et le diamètre des buses. La théorie linéaire de Rayleigh, ultérieurement modifiée par Weber pour tenir compte de l'effet de la viscosité et de la tension superficielle, s'est montrée la plus appropriée pour une première estimation des conditions optimales pour la formation de gouttes. Dans la pratique, cette estimation sert de point de départ aux ajustements expérimentaux nécessaires. Dans cette confrontation expérimentale cette théorie a montré quelques faiblesses :

- elle ne tient pas compte de l'effet de l'amplitude du mouvement vibratoire : or nous avons constaté expérimentalement qu'elle a une forte influence sur le procédé.
- elle ne prévoit pas la formation de gouttes satellites, qui sont aussi un problème fréquent même quand on opère près des conditions optimales.
- elle ne sert que pour décrire/prévoir la formation de gouttes constituées d'une seule couche. Or dans notre cas, pour certaines applications, nous nous intéressons à la production de billes « double couche » constituées d'un noyau et d'une couche d'enrobage. Nos résultats ont démontré que la relation entre les débits de la couche interne et de la couche externe conditionne la forme sphérique de la couche interne et aussi sa position (centrée ou excentrique) dans la bille. Sur ce point, ce serait intéressant de confirmer si la déformation de la forme sphérique de la couche

interne peut être expliquée par l'effet de Marangoni, qui décrit l'effet du transfert de masse entre 2 fluides dû à un gradient de la tension superficielle.

En résumé, les résultats obtenus peuvent être considérés comme une base pour un travail plus approfondi sur ce sujet de la formation de gouttes complexes composées d'un noyau et d'une couche périphérique. Malgré cela, les résultats présentés sont plus que suffisants puisqu'ils ont permis de sélectionner et de valider les conditions opératoires optimales pour que le procédé industriel fonctionne de façon stable et ininterrompue pendant plusieurs jours d'une part, et reproductible d'autre part.

À l'égard de la gélification, le système mis en oeuvre garantit un contrôle efficace de la concentration en Ca^{2+} au cours du temps ainsi que de celle du principal ion compétiteur qui est le Na^+ . Après stabilisation du système le ratio $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ est de 15/1.

Le procédé de séchage, fondamental pour la conservation du produit, se déroule en deux phases distinctes. Dans la première, dite de séchage à vitesse constante, l'énergie fournie au système est utilisée pour évaporer l'eau libre. Dans la seconde phase, l'énergie nécessaire est substantiellement inférieure et sert à enlever l'eau liée, dont les mécanismes qui gouvernent la sortie sont complexes et sont dépendants de la diffusion et de l'interaction de l'eau avec les molécules d'alginate et les cellules de levure.

Finalement, il est démontré, à travers l'analyse de plus de 400 lots élaborés durant 4 années, que le procédé d'immobilisation est contrôlable et reproductible en ce qui concerne le nombre de billes par gramme, le nombre de cellules viables par gramme de billes et le taux d'humidité résiduelle des billes. De plus, on a vérifié qu'il est possible d'obtenir systématiquement des valeurs de viabilité, après immobilisation et séchage, supérieures à 98,5%.

Le **deuxième objectif** du présent travail était d'obtenir une caractérisation cinétique, analytique et parfois sensorielle des fermentations réalisées avec les levures immobilisées, pour deux applications distinctes : la prise de mousse de vins effervescents et la désacidification de moûts et de vins.

Les résultats de la mise en oeuvre des levures immobilisées dans l'élaboration de vins effervescents (méthode traditionnelle et /ou artisanale) a permis de conclure que :

- le vin de base a une influence déterminante dans la vitesse de fermentation des levures immobilisées. L'addition d'autolysats de levure permet de diminuer la variabilité de la vitesse de fermentation liée au vin de base. Néanmoins nous n'avons pas identifié le mode d'action de l'activateur expérimenté. Du point de vue du rôle de support technique que notre entreprise, Proenol, doit assumer ce serait sans aucun doute un point intéressant à explorer dans des travaux futurs.

- pendant la fermentation la viabilité des levures est supérieure à 80%, mais on observe une rapide diminution de cette viabilité une fois tous les sucres consommés.
- pour une dose de 1,2 g de levures immobilisées par bouteille, qui est adaptée à une fermentation à 14°C, la réduction de température à 10°C fait plus que doubler le temps de fermentation. L'augmentation à une dose de 1,6 g par bouteille augmente la vitesse de fermentation, néanmoins des concentrations supérieures (1,8 et 2,4 g) n'apportent pas de bénéfice supplémentaire en terme de vitesse de fermentation.
- la formulation retenue pour l'immobilisation a aussi un impact sur la vitesse de fermentation à 10°C. La formulation FE2 qui donne des billes plus petites avec une moindre épaisseur de couche externe a conduit à des vitesses de fermentation plus rapides.

La comparaison analytique et sensorielle des vins produits avec des levures immobilisées et avec des levures libres, en conditions de laboratoire comme à l'échelle industrielle a permis de conclure que les vins résultant des fermentations avec les levures immobilisées sont identiques aux vins élaborés avec les cellules libres. Il apparaît aussi que les vins fermentés avec les cellules immobilisées tendent à être plus homogènes.

La désacidification biologique de moûts avec la levure *Schizosaccharomyces pombe* a montré que l'immobilisation réduit la vitesse de consommation de l'acide malique, par rapport à celle avec les cellules libres.

La différence entre l'énergie d'activation déterminée pour les cellules immobilisées (16 ± 2 kcal/mol) et celle pour les cellules libres (31 ± 8 kcal/mol) peut être expliquée en partie par l'existence de limitations diffusionnelles externes. Pour des températures supérieures à 18°C la cinétique globale est déterminée exclusivement par des limitations diffusionnelles externes. Pour des températures inférieures à 18°C et supérieures à 10°C, il existe une situation intermédiaire où l'énergie d'activation globale résulte de la contribution des énergies d'activation de réaction et de diffusion. Les essais de fermentation malo-alcoolique avec la *Shz pombe* immobilisée dans le fermenteur en lit expansé ont permise de confirmer l'existence de limitations diffusionnelles externes dans les essais sans agitation.

L'augmentation de la concentration de cellules immobilisées de 1 à 10 g/L n'est pas accompagnée par une augmentation proportionnelle de la vitesse de réaction. En effet, l'accroissement de la dose, donc des cellules présentes, se traduit par une réduction de l'activité spécifique qui chute de 0,47 g/g_{bille}/jour à seulement 0,15 g/g_{bille}/jour. Ce résultat est conforme à ceux souvent mentionnés dans la littérature lors de cultures en « cellules denses ».

L'inoculation simultanée par *Shz pombe* immobilisée et *S. cerevisiae* (forme sèche active) pour la réalisation, respectivement, de la Fermentation Malo Alcoolique (FMA) et de la Fermentation Alcoolique (FA), a montré qu'à la fin de la FA il y a une réduction significative de l'activité métabolique de *Shz pombe* immobilisée et donc de la FMA.

Cette co-inoculation (*Shz pombe* et *S. cerevisiae*) a été validée à l'échelle industrielle, puisque les résultats obtenus ont été conformes à ceux obtenus au laboratoire.

Enfin, les essais de fermentation en milieu « vin » ont montré que la vitesse de consommation de l'acide malique était quatre fois plus faible que dans un milieu « moût ».

L'évaluation de l'utilisation de levures immobilisées pour la réalisation de la Fermentation Alcoolique Continue (FAC) de moûts correspond au **troisième objectif** de ce travail.

Les résultats obtenus avec le fermenteur en lit fluidisé et avec le fermenteur en lit fixe, à l'échelle pilote, ont montré qu'il est possible de réaliser la FAC de moûts pendant une période équivalente à celle d'une vendange complète sans rupture des billes. Une importante croissance cellulaire non seulement dans le milieu en fermentation (cellules libres) mais aussi à l'intérieur des billes a été observée. Les cellules libres se développent dans une phase initiale jusqu'à des concentrations de l'ordre de 1.10^7 jusqu'à 1.10^8 , et à partir du septième jour de fermentation la population se stabilise.

Bien que l'essai dans un fermenteur en lit fixe ait démontré qu'il était possible de réaliser la FAC de moûts, les difficultés opérationnelles liées à l'accumulation de grandes quantités de CO_2 , ont conduit à privilégier le fermenteur en lit fluidisé au détriment de cette technologie. Néanmoins, des travaux plus récents menés au Laboratoire de Génie Chimique conduisent à nuancer cette observation. En effet, ces essais montrent qu'il est possible de travailler en lit fixe mais dans une géométrie de colonne dont le rapport hauteur/diamètre est substantiellement inférieur au rapport 10/1 qui est celui du fermenteur utilisé dans ce travail.

La plus grande limite à cette utilisation de cellules immobilisées semble être actuellement liée aux aspects économiques. A l'heure actuelle, avec les technologies actuelles, le coût par hectolitre de vin est 5 à 10 fois supérieur au coût obtenu avec des cellules libres. Néanmoins, il est important de faire ressortir que ce travail n'est qu'une première approche pour évaluer la faisabilité technique du procédé, et il est maintenant nécessaire de chercher à optimiser le procédé de la fermentation continue et aussi d'optimiser la production de billes dans le but de réduire les coûts, par exemple en étudiant de nouvelles matrices d'inclusion moins onéreuses.

En plus des savoir-faire de Proenol et des études effectuées au sein de cette société selon les trois objectifs décrits, ce travail montre l'importance du lien entre le produit, les levures immobilisées en billes d'alginate, et leur fabrication, particulièrement sur l'application de prise de mousse. Il sera intéressant de poursuivre cette démarche pour la FAC avec des levures immobilisées, aussi bien du point de vue de la fabrication des billes que de celui du développement de l'application, dans le but de réduire le coût et de rendre cette application compétitive.

NOMENCLATURE

Nomenclature

A	– facteur pré-exponentiel
a_w	– activité de l'eau
C_b	– Concentration de billes (g/L)
C_M	– Concentration de l'acide L-malique (g/L)
C_{M0}	– Concentration initial de l'acide L-malique (g/L)
C_{S0}	– Concentration de sucre à l'entrée du fermenteur (L/h)
C_{Ss}	– Concentration de sucre en sortie du fermenteur (L/h)
D	– Taux de dilution (h^{-1})
d	– Distance entre électrodes (cm)
d_j	– Diamètre du jet (m)
d_n	– Diamètre de l'orifice de la buse (m)
d_{sph}	– Diamètre sphère (m)
E	– Energie d'activation (kcal/mol)
f	– Fréquence (Hz)
G	– Conductance (Ohm^{-1})
HA	– Humidité absolue
HR	– Humidité résiduel (%)
K	– Indice de consistance du fluide
k	– Constant de la vitesse global de réaction
k_r	– Constant de la réaction
k_g	– Coefficient de transfert massique (m/s)
L	– Longueur cylindre de liquide (m)
m	– Masse de levure humide (g)
M_b	– Masse de billes (g)
MS	– Masse de levure sèche (g_{levure}/L)
m_s	– Masse de solide anhydre dans les billes (kg)
m_w	– Masse d'eau dans les billes (kg)
n	– Indice de comportement du fluide
Q	– Débit d'alimentation au fermenteur (L/h)
Q_{CE}	– Débit de la couche externe (kg/h)
Q_{CI}	– Débit de la couche interne (kg/h)
Q_T	– Débit total (couche interne + couche externe) (kg/h)
R	– Constant idéal des gaz (kcal/mol/°K)
R	– Résistance (Ohm)
r_j	– Rayon du jet (m)
r_M	– Vitesse de consommation de l'acide L-malique (g/L/jour)
r_{M0}	– Vitesse initial de consommation de l'acide L-malique (g/L/jour)
r_{sM}	– Vitesse spécifique de consommation de l'acide L-malique ($g/g_{billes}/jour$)

r_s – Vitesse de consommation de sucre (g/L/h)
 r_{sS} – Vitesse spécifique de consommation de sucre (g/g_{billes}/h)
 r_{sph} – Rayon sphère (m)
 S – Surface des électrodes (cm)
 T – Température (°K ou °C)
 t – temps (jours ou minutes)
 t_{batch} – Temps d'une fermentation batch (h)
 V_{cil} – Volume d'un cylindre (m)
 V_f – Volume du fermenteur (L)
 V_i – Volume d'échantillon pour méthode thermogravimétrique (L)
 v_j – Vitesse du jet (m/s)
 v_n – Vitesse dans la buse (m/s)
 v_n – vitesse du liquide dans la buse (m/s)
 V_{sph} – Volume sphère (m)
 We – Numéro de Weber
 X – Concentration de cellules (cellules/mL)

γ – Vitesse cisaillement (s⁻¹)
 η – Viscosité (Pa.s)
 λ – Longueur d'onde (m)
 ρ – Densité (kg/m³)
 σ – Tension superficiel (dynes/cm)
 τ – Tension cisaillement (Pa)
 τ^* – Temps de résidence (h)
 ε – Conductivité spécifique (S/cm)

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1. **Amsden B., Turner N.**, 1999, Diffusion characteristics of calcium alginate gels. *Biotech. Bioeng.* 65, 605-610
2. **Antunes J., Moreira M., Sampaio R.**, 2002, Formação de gotas por estimulação vibratória, Rapport interne de la société Proenol
3. **Azeredo J., Ramos I., Rodrigues L., Oliveira R., Teixeira J.**, 1997, Yeast flocculation: a new method for characterising cell surface interactions, *J. Inst. Brew.* 103, 359-361
4. **Bakoyianis V., Kanellaki M., Kaliafas A., Koutinas A.A.**, 1992, Low temperature winemaking by immobilized cells on mineral kissiris. *J. Agric. Food Chem.* 40, 1293-1296.
5. **Bakoyianis V., Koutinas A.A., Agelopoulos K., Kanellaki M.**, 1997, Comparative study of kissiris, γ -alumina and calcium alginate as support of cells for batch and continuous wine making at low temperatures, *J. Agric. Food Chem.*, 45, 4884 – 4888.
6. **Bardi E.P., Koutinas A.A.**, 1994. Immobilization of yeast on delignified cellulosic material for room temperature and low temperature fermentation. *J. Agric. Food Chem*, 42, 221-226
7. **Bardi E.P., Bakoyianis V., Koutinas A.A., Kanellaki M.**, 1996, Room temperature and low temperature winemaking using yeast immobilized on gluten pellets. *Process Biochem* 31, 425-430
8. **Barnes H.A., Hutton J.F., Walters K.**, 1989, An introduction to rheology, pp 11-12, Eds Elsevier BV
9. **Bayrock D., Ingledew W.M.**, 1997, Mechanism of viability loss during fluidized bed drying of baker's yeast, *Food research International*, 30, 417-425
10. **Belitz H.D., Grosch W.**, 1987, Food Chemistry, pp 1-6, Eds. Springer-Verlag, Berlin
11. **Benda I., Schmitt A.**, 1969, Acid reduction in must by various strains of the germs *Schizosaccharomyces*, *Weinberg Keller* 16, 71-83.
12. **Berger A.F.**, 2001, Herstellung monodisperser Partikel aus einer wässrigen Lösung mittels Fluidprillen/Gefriertrocknen oder chemischer Reaktion, Technische Hochschule Zurich, PhD thesis
13. **Bonin S., Wzorek W., Koper L.**, 2006. Influence of long time continuous wine fermentation on yeast immobilized on foam glass. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 5, 25-38
14. **Brandenberger H., Widmer F.**, 1998, A new multinozzle encapsulation/immobilisation system to produce uniform beads of alginate. *J. Biotech.*, 63, 73-80
15. **Brandenberger H., Nussli D., Piech V., Widmer F.**, 1999, Monodisperse particle production: a method to prevent drop coalescence using electrostatic forces, *J. Electrostatics*, 45, 227-238
16. **Branyik T., Vicente A., Cruz J. M., Teixeira J.**, 2002, Continuous primary beer fermentation with brewing yeast immobilized on spent grains, *Journal of the Institute of Brewing*, 108 (4), 410 - 415
17. **Cachon R., Divies C.**, 2001. Immobilised cell technology in winery and fruit wine production. *Engineering and manufacturing for biotechnology*, 413-421 Kluwer Academic Publishers

18. **Cellesi F., Weber W., Fussenegger M., Hubbell J.A., Tirelli, N.**, 2004, Towards a fully synthetic substitute of alginate: optimization of a thermal gelation/chemical cross-linking scheme (Tandem gelation) for the production of beads and liquid-core capsules, *Biotech. Bioeng.* 88, 740-749
19. **Chuech S.G., Yan M.**, 2005, Effect of velocity field on drop formation of a capillary jet in the Rayleigh regime. *J. Chinese Inst. Eng.*, 28, 135-144
20. **Colagrande O., Fumi M.D.**, 1989, Biotechnologies alternatives dans la production des vins mousseux, *Actualités Oenologiques* 89, pp 265 – 269, Eds Dunod
21. **Da Silva, M.F., Strehaiano P., Sampaio R.**, 2007, Method for immobilising microorganisms, related material , and use thereof. US Patent #2007/0054388
22. **Deken R.H.**, 1966, The crabtree effect: a regulatory system in yeast, *J. Gen. Microbiol.*, 44, 149-156
23. **Diviès C., Deschamps P.**, 1986. Procédé et appareillage pour la mise en oeuvre de réactions enzymatiques et application á la préparation de boissons fermentées. French Patent #2601687
24. **Diviès C., Lenzi P., Beaujeu J., Herault F.**, 1988, Procédé de préparation de micro-organismes inclus dans des gels sensiblement déshydratés, gels obtenus et leur utilisation pour la préparation de boissons fermentées. French Patent #2633937
25. **Diviès C., Cachon R.**, 2005, Wine production by immobilised cell systems. *Applications of Cell Immobilisation Biotechnology*, 285-293
26. **Donati I., Paoletti S.**, 2009, Material properties of alginates, In *Alginates: biology and applications*, pp 1-54, Rehm B.H.A., Eds Springer Verlag
27. **Doran P.M., Bailey J.E.**, 1985, Effects of immobilization on growth, fermentation properties, and macromolecular composition of *Saccharomyces cerevisiae* attached to gelatine, *Biotech. Bioeng.*, 28, 73-87
28. **Drichoutis P., Nerantzis E.T., Liouni M.**, 2007, Continuous production of wine in a tower fermenter using entrapped yeast cells in double layer alginate – chitosan beads, *e-Journal of Science & Technology*, 2, 51 - 60
29. **Eggers J.**, 2005, Drop-formation – an overview. *ZAMM Z. Angew. Math. Mech.* 85, 400-410
30. **Estape F., Godia F., Sola C.**, 1992, Determination of glucose and ethanol effective diffusion coefficients in Ca-alginate gel, *Enzyme Microb. Technol.* 14, 396-400
31. **Figueiredo, J.L., Ribeiro F.R.**, 1989, Catálise heterogénea, pp157-218, Fundação Calouste Gulbenkian.
32. **Fleet, G.H.**, 1993, *Wine microbiology and biotechnology*, Eds Taylor and Francis, New York
33. **Fogler H.S.**, 1992, *Elements of chemical reaction engineering*, 2nd edition, pp 61-65, Prentice Hall International Editions.

34. **Fumi M.D., Trioli G., Colombi M.G., Colagrande O.**, 1988, immobilization of *Sacharomyces cerevisiae* in calcium alginate gel and its application to bottle-fermented sparkling wine production. *Am. J. Enol. Vitc.*, 39, 267-272
35. **Fumi M.D., Bufo M., Trioli G., Colagrande O.**, 1989, Bulk sparkling wine production by external encapsulated yeast bioreactor. *Biotech. letters*, 11, 821-824
36. **Fumi M.D., Battistotti G., Colagrande O.**, 1994, Alginate immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cell alterations during alcoholic fermentation, *Ital. J. Food Sci.*, 3, 325-338.
37. **Furusaki S., Seki M.**, 1985, Effect of intraparticle mass transfer on reactivity of immobilized yeast cells, *J. Chem. Eng. Japan*, 18, 389-393
38. **Gilson, C.D., Thomas A., Hawkes F.R.**, 1990, Gelling mechanism of alginate beads with and without immobilised yeast, *Process Biochem. Int.*, 25, 104-108
39. **Gòdia F., Casas. C., Solá C.**, 1991, Application of immobilized yeast cells to sparkling wine fermentation, *Biotechnol. Prog.* 7, 468-470.
40. **Guzzon, R., Cavazza A., Carturan G.**, 2009. Materiales innovadores para la inmovilizacion de cultivos malolacticos. *Tecnologia, efectos biológicos y fermentaciones experimentales com cepas de *Oenococcus oeni* inmovilizadas em matrices híbridas de sílice/alginate.* www.infowine.com – revista internet de viticultura y enologia, nº 8/1
41. **Hardy G.**, 1985, Défauts et anomalies rencontrés au cours de l'elaboration des vins effervescents, Note technique publiée par la Station Oenotechnique de Champagne.
42. **Hardy G.**, 2003, Les differentes méthodes d'elaboration des vins effervescents, *Revue des Oenologues*, 107S, 9-12.
43. **Heinzen C., Marison I., Berger A., Von Stockar U.**, 2002, Use of vibration technology for jet break-up for encapsulation of cells, microbes and liquids in monodisperse microcapsules, *Landbauforschung Völkenrode*, 241, 19-25
44. **Heinzen C., Berger A., Marison I.**, 2010, Use of vibration technology for jet break-up for encapsulation of cells, microbes and liquids in monodisperse microcapsules, In, *Fundamental of Cell Immobilisation Biotechnology*, pp 257-274, Nedovic V., Willaert R., Kluwer Academic Publishers
45. **Idris A., Suzana W.**, 2006, Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial pH and tempaerature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochemistry*, 41, 1117-1123.
46. **Jay J.M., Loessner M.J., Golden D.A.**, 2005, *Modern Food Microbiology*, pp 30-60, Eds Springer Science
47. **Jin Y.L., Speers, R.A.** 1998 Flocculation of *Saccharomyces Cerevisiae*. *Food Res. Int.* 31, 421-440.
48. **Kana K., Kanellaki M., Papadimitriou A., Psarianos C., Koutinas A.A.**, 1989, Immobilization of *saccharomyces cerevisiae* on g-alumina pellets and its ethanol production in glucose and raisin extract fermentation. *J. Ferment Bioeng.* 68, 213-215
49. **Karel S.F., Libicki, S.B., Robertson, C.R.**, 1985, The immobilization of whole cells-engineering principles. *Chem. Eng. Sci.* 40, 1321 – 1354

50. **Kennedy F., Cabral J.M.S.**, 1990, Use of titanium species for the immobilization of cells. *Transition Met. Chem*, 15, 197-207
51. **Kosseva M.R., Kennedy J.F.**, 2004, Encapsulated lactic acid bacteria for control of malolactic fermentation in wine. *Artificial cells, blood substitutes and biotechnology*, 32, 55-65
52. **Kourkoutas Y., Bekatorou A., Banat, I.M., Marchant, R., Koutinas A.A.**, 2004 Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review, *Food Microbiology* 21, 377–397.
53. **Kourkoutas Y., Kanellaki M., Koutinas A.A., Tzia C.**, 2005, Effect of fermentation conditions and immobilization supports on the winemaking, *J. Food Eng.* 60, 115-123
54. **Kourkoutas Y., Manojlovic V., Nedovic V.A.**, 2010, Immobilization of microbial cells for alcoholic and malolactic fermentation of wine and cider. *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*, 327-343
55. **Kunkee R.E., Bisson L.F.**, 1993, Wine-making yeasts, *The Yeasts, Yeast Technology*, 5, pp 69-127
56. **Laca A., Garcia L.A., Diaz M.**, 2000, Analysis and description of the evolution of alginate immobilised cells systems, *J. Biotechnol.*, 80, 203-215
57. **Lebeau T., Jouenne T., Junter G-A.**, 1998, Diffusion of sugars and alcohols through composite membrane structures immobilizing viable yeast cells. *Enzyme Microb. Technol.* 22, 434-438
58. **Lemonnier J., Duteurtre B.**, 1989, Un progrès important pour le champagne et les vins de « méthode traditionnelle », *Rev. Fr. Oenol.*, 121, 15-26
59. **Lemonnier J.**, 1992 Cartouche de fibres creuses pour la fermentation de boissons sucrées. European Patent #0555603
60. **Lonvaud-Funel A., Renouf V., Strehaiano P.**, 2010, *Microbiologie du Vin*, Eds Tec & Doc.
61. **Loukatos P., Kiaris M., Ligas I., Bourgos G., Kanellaki M., Komaitis M., Koutinas A.A.**, 2000, Continuous wine making by γ -alumina supported biocatalyst. Quality of the wine and distillates. *Appl. Biochem Biotechnol*, 89, 1-13.
62. **Loukatos P., Kanellaki M., Athanasiadis I., Komaitis M., Koutinas A.A.**, 2003, A new technological approach proposed for distillate production using immobilized cells, *J. Bioscience Bioengineering* 95 (1), 35-39
63. **Lucarini A.C., Silva L.A., Bianchi R.A.C.**, 2004, Um sistema para a contagem semi-automática de microorganismos, *Pesquisa e Tecnologia FEI*, 26-40.
64. **Magyar I., Panyik I.**, 1989, Biological deacidification of wine with *Schizosaccharomyces pombe* entrapped in Ca-alginate gel, *Am. J. Enol. Vitic.* 40, 233-240
65. **Manojlovic V., Djongalic J., Obradovic B., Nedovic V., Bugarski B.**, 2006, Investigations of cell immobilization in alginate: rheological and electrostatic extrusion studies. *J. Chem. Tech. Biotech.* 81, 505-510
66. **Martinsen A.**, 1989a, Alginate as immobilization material – a study of some molecular and functional properties, *Phd Thesis*, 1989, Norwegian Institute of Technology, Trondheim

67. **Martinsen, A., Skjåk-Bræk G., Smidsrød O.**, 1989b, Alginate as immobilization material: I correlation between chemical and physical properties of alginate beads. *Biotech. Bioeng.*, 33, 79-89
68. **Martynenko N., Gracheva I.**, 2003. Physiological and biochemical characteristics of immobilized champagne yeasts and their participation in champagnizing processes: a review. *Appl. Biochemistry and Microbiology* 39: 439-445
69. **Mayer K., Temperli A.**, 1963, The metabolism of 1-malate and others compounds be *schizosaccharomyces pombe*, *Archiv Mikrobiol* 46, 321-328.
70. **Mochaba, F., O'Connor, E.S., and Axell, B.C.**, 1999, Practical Procedures to Measure Yeast Viability and Vitality Prior to Pitching. AM. Soc. Brew. Chem. Pub. No. J-1998-0202-01R.
71. **Moreno-Arribas V., Puey E., Nieto F.J., Martin-Alvarez P.J., Pólo M.C.**, 2000, Influence of the polysaccharides and the nitrogen compounds on foaming properties of sparkling wines, *Food Chemistry*, 70, 309 – 317
72. **Ogbonna J. C., Amano Y., Nakamura K., Yokotsuka K., Shimazu Y., Watanabe M., Hara M.**, 1989, A multistage bioreactor with replacable bioplates for continuous wine fermentation, *Am. J. Enol. Vitic.* 40 (4), 292 - 298
73. **OIV**, 2011, Méthode de mesure de la surpression des vins effervescents (Oeno 21/2003), Recueil des Méthodes Internationales d'Analyse des Vins et des Mouts, Vol. 1, Édition 2011
74. **Onsøien E.**, 1997, Alginates, In *Thickening and gelling agents for food*, pp 22-44, Imeson A., Blackie Academic & Professional
75. **Osothsilp C., Subden R.E.**, 1986, Malate transport in *Schizosaccharomyces pombe*, *J. Bacteriology*, 1439-1443.
76. **Palacios, A., Martinez C.S., Heras, J.M.**, 2006, Manejo de la acidez del vino base cava desde el punto de vista organoléptico, *ACE Revista de Enologia*, N° 66
77. **Plieva M.F., Oknianska A., Degerman E., Mattiasson B.**, 2008, Macroporous gel particles as robust macroporous matrices for cell immobilization, *Biotechnology J.*, 3, 410-417.
78. **Queiroz, H., Pareilleux A.**, 1990, Growth kinetics of *Schizosaccharomyces pombe* under various culture conditions: influence of pH, malate, ethanol and oxygenation, *Appl Microbiol Biotechnol*, 33, 578-581
79. **Ramon Portugal F., Strehaiano P., Silva S., Teixeira M.F.**, 2000, Enological applications of dry immobilized yeasts, Tenth International Symposium on Yeasts, Netherlands, pp 367-368.
80. **Rankine, B.C.**, 1966, Decomposition of L-malic acid by wine yeasts, *J. Science Food and Agriculture*, 17, 312-316.
81. **Rayleigh J.W.S.**, 1945, The theory of sound, Vol. 2, pp 357-364, Dover Publications Inc.
82. **Ribereau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D.**, 1998, *Traité d'oenologie 2. Chimie du vin, stabilisation et traitements*, Eds Dunod, Paris

83. **Rose A. H., Harrison J.S.**, 1993, The yeasts - Volume 5, Academic Press
84. **Rosini G., Ciani M.**, 1993, Influence of sugar type and level on malate metabolism of immobilized *Schizosaccharomyces pombe* cells, Am. J. Enol. Vitic, 44, 113-117
85. **Schneider L.M., Hendriks C.D.**, 1964, Source of uniform-sized liquid droplets. Rev. Sci. Instrum. 35, 1349-1350
86. **Schwinger C., Klemenz A., Raum K., Kressler J.**, 2002, Comparasion of different encapsulation strategies for living cells and mechanical characterization of microspheres by scanning acoustic microscopy, Landbauforschung Völkenrode, 241, 1-10
87. **Seifert D., Phillips J.A.**, 1997, Production of monodispersed alginate beads for cell immobilization, Biotechnol. Prog., 13, 562-568
88. **Serp D., Cantana E., Heinzen C., Stockar U., Marison I.W.**, 2000, Characterization of an encapsulation device for the production of monodisperse alginate beads for cell immobilization. Biotech. Bioeng., 70, 41-53
89. **Serp D.**, 2002, Whole cell immobilization from: insight tools to practical applications. École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Suisse, PhD thesis
90. **Serra A., Strehaiano, P., Taillandier, P.** (2005). Influence of temperature and pH on *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* growth; impact of a wine yeast interspecific hybridization on these parameters. *International of Food Microbiology*. 104, 257-265.
91. **Shoichet M.S., Li R.H., White M.L., Winn S.R.**, 1996, Stability of hydrogels used in encapsulation : an in vitro comparison of alginate and agarose. Biotech Bioeng. 50, 374-381.
92. **Silva S., Ramon Portugal F., Silva P., De Fatima Teixeira M., Strehaiano P.**, 2002 Démalication de mouts blancs et rouges par des levures *Schizosaccharomyces pombe* incluses dans des billes d'alginate sèches. Rev F Oenol 196:18–21
93. **Silva, S., Portugal, F.R., Andrade, P., Abreu, S., Teixeira, M.F., Strehaiano, P.**; 2003 Malic Acid Consumption by Dry Immobilized Cells of *Schizosaccharomyces pombe*. Am. J. Enol. Vitic. 54, 50-55.
94. **Sipsas V., Kolokythas G., Kourkoutas Y., Plessas S., Nedovic V., Kanellaki M.**, 2009, Comparative study of batch and continuous multi-stage fixed-bed tower (MFBT) bioreactor during wine-making using freeze-dried immobilized cells. J. Food Eng. 90, 495-503.
95. **Skjåk-Bræk G., Grasdalen H., Smidsrød O.**, 1989, Inhomogeneous polysaccharide ionic gels. Carbohydr. Polym. 10, 31-54.
96. **Smidsrød O., Skjåk-Bræk G.**, 1990, Alginate as immobilization matrix for cells. Tibtech 8, 71-78
97. **Snow, P.G., Gallander J.F.**, 1979, Deacidification of white table wines through partial fermentation with *Schizosaccharomyces pombe*, Am. J. Enol. Vitic., 30, 45-48
98. **Sousa, M.J., Teixeira, J.A. and Mota, M.**, 1991 Malo-alcoholic fermentation: the influence of operating conditions on the kinetics of deacidification. J. Wine Res. 2, 115-124.

99. **Sousa M.J., Mota M., Leão C.**, 1995, Effects of ethanol and acetic acid on the transport of malic acid and glucose in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*: implications in wine deacidification, *FEMS Microbiology Letters*, 126, 197-202
100. **Spooner J.E.**, 1973, Method for producing champagne, US Patent #4009285
101. **Strehaiano P., Taillandier P., Ramon Portugal F., Silva S.**, 2001, Nouvelles utilisations des levures *Schizosaccharomyces* encapsulées pour la desacidification des mouts de raisin, In *Comment Maitriser l'acidité du vin?*, Journée Technique Régionale, Toulouse
102. **Strehaiano P., Ramon Portugal F., Taillandier P., Silva S., Nepveu F.**, 2002, Levures et maîtrise de l'acidité des mouts et des vins, *Revue des Oenologues*, 105S, 23-27
103. **Strehaiano P., Ramon-Portugal F., Taillandier P.**, 2006, Yeasts as biocatalysts, In, *The Yeast Handbook "Yeast in Food and Beverages"* pp 243-283 Fleet G., Querol A., Eds Springer Verlag
104. **Strumillo C., Kudra T.**, 1986, Drying principles, applications and design, Eds Gordon and Breach Science Pub.
105. **Taillandier P., Riba J.P., Strehaiano P.**, 1988 Malate utilization by *Schizosaccharomyces pombe*. *Biotechnol Lett* 10, 479-472
106. **Taillandier P.**, 1990, Désacidification des moûts par *Schizosaccharomyces*: Analyse cinétique et métabolique, Institut National Polytechnique de Toulouse, France, (thèse de doctorat).
107. **Taillandier P., Strehaiano P.**, 1991a, The role of malic acid on the metabolism of *Schizosaccharomyces pombe*: substrate consumption and cell growth, *Appl. Microbiol. Botechnol.*, 35, 541-543.
108. **Taillandier P., Riba J.P., Strehaiano P.**, 1991b, Malate degradation by *Schizosaccharomyces* yeasts included in alginate beads, *Bioprocess Engineering*, 7, 141-144
109. **Taillandier P., Cazotes M.L., Strehaiano P.**, 1994, deacidification of grape must by *Schizosaccharomyces* entrapped in alginate beads: A continuous fluidized bed process, *The Chemical Engineering Journal*, 55, B29-B33
110. **Taillandier P., Gilis M., Strehaiano P.**, 1995, Deacidification by *Schizosaccharomyces*: interactions with *Saccharomyces*, *Journal of Biotechnology*, 40, 199-205
111. **Taillandier P., Ramon Portugal F., Strehaiano P.**, 2001, Incidence de la souche de levure sur l'acidité d'un vin, In *Comment Maitriser l'acidité du vin?*, Journée Technique Régionale, Toulouse
112. **Takaya M., Matsumoto N., Yanase H.**, 2002, Characterization of membrane bioreactor for dry wine production, *J. Bioscience Bioengineering* 93 (2) 240 -244
113. **Tataridis P., Ntagas P., Voulgaris I., Nerantzis E.T.**, (2005) Production of sparkling wine with immobilized yeast fermentation. *Electronic Journal of Science and Technology*, 1, 1-21.
114. **Thu B., Smidsrød O., Skjåk-Bræk G.**, 1996, Alginate gels – Some structure function correlations relevant to their use as immobilization matrix for cells, In *Progress in*

- Biotechnology Vol 11, pp 18-30, Wijffels R.H., Buitelaar R.M., Bucke C., Tramper J., Elsevier Science.
115. **Uematsu K., Fong D., Ryu D.Y.**, 1988, Development of continuous fermentation using immobilized yeast cells, *App. Biochem. Biotech.* 19, 177 - 188
 116. **Verbelen P.J., Schutter D.P., Delvaux F., Verstrepen K.J., Delvaux F.R.**, 2006, Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications, *Biotechnol. Lett.* 28, 1515-1525
 117. **Verstrepen K. J., Chambers P.J., Pretorius I.S.**, 2006, The Development of Superior Yeast Strains for the Food and Beverage Industries: Challenges, Opportunities and Potential Benefits, In, *The Yeast Handbook "Yeast in Food and Beverages"* pp 399-444 Fleet G., Querol A., Eds Springer Verlag
 118. **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
 119. **Vreeker, R., Li L., Fang Y., Appelqvist I., Mendes E.**, 2008, Drying and rehydration of calcium alginate beads, *Food Biophysics*, 3, 361-369
 120. **Walker, G.M.**, 1998, Yeast metabolism, In, *Yeast Physiology and Biotechnology*, pp 203-255, Eds John Wiley & Sons
 121. **Yang H.Y.**, 1975, Effect of sulphur dioxide on the activity of *Schizosaccharomyces pombe*, *Am. J. Enol. Vitic.* 26, 1-4.
 122. **Yokotsuka K., Otaki A., Naitoh A., Tanaka H.**, 1993, Controlled simultaneous deacidifications and alcohol fermentation of a high-acid grape must using two immobilized yeasts, *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Am. J. Enol. Vitic.*, 44, 371-377
 123. **Yokotsuka K., Yajima M., Matsudo T.**, 1997. Production of bottle fermented sparkling wine using yeast immobilized in double layer gel beads or strands. *Am. J. Enol. Vitic.* 48, 471-481
 124. **Yuen M.C.**, 1968, Non-linear capillary instability of a liquid jet. *J. Fluid Mechanics*, 33, 151-163.
 125. **Zohar-Perez C., Chet I., Nussinovitch A.**, 2004, Unexpected distribution of immobilized microorganisms within alginate beads, *Biotech Bioeng.* 88, 671-674.