

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 :**  
Julien Riess

**le :** vendredi 9 novembre 2012

**Titre :**  
INTENSIFICATION DE LA BRIQUE "FERMENTATION ALCOOLIQUE" DE  
SUBSTRATS BETTERAVIERS (ET AUTRES SUBSTRATS) POUR LA PRODUCTION  
D'ETHANOL

---

**Ecole doctorale :**  
Mécanique, Énergétique, Génie civil et Procédés (MEGeP)

**Unité de recherche :**  
UMR 5503 Laboratoire de Génie Chimique

**Directeur(s) de Thèse :**  
Pr. Patricia TAILLANDIER  
Dr. Claire JOANNIS-CASSAN

**Rapporteurs :**  
Pr. Mohamed GHOUL  
Pr. Jean-Marie SABLAYROLLES

**Membre(s) du jury :**

Pr. Jean-Luc BARET  
M. Bruno GAGNEPAIN  
M. Franck JOLIBERT  
Pr. Pierre STREHAIANO



Université  
de Toulouse



# THESE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE TOULOUSE

Délivré par : L'Institut National Polytechnique de Toulouse  
Spécialité : Génie des procédés

---

**Julien RIESS**

**Intensification de la brique « fermentation alcoolique » de  
substrats betteraviers pour la production d'éthanol**

**Optimization of ethanol production in high gravity  
fermentation of sugar beet substrate**

---

Soutenue le 9 Novembre 2012 Devant le Jury Composé de :

Rapporteurs :	Pr. Jean-Marie SABLAYROLLES Pr. Mohamed GHOU
Examineur :	Pr. Jean-Luc BARET M. Bruno GAGNEPAIN M. Franck JOLIBERT Pr. Pierre STREHAIANO
Co-directrice de thèse :	Dr. Claire JOANNIS-CASSAN
Directrice de thèse :	Pr. Patricia TAILLANDIER

---

Ecole doctorale : **Mécanique, Energétique, Génie civil et Procédé**  
Unité de recherche : **Laboratoire de Génie Chimique UMR 5503**

Etude réalisée pour le compte de l'ADEME par Julien Riess – Contrat n° TEZ09-34

Coordination technique : Bruno Gagnepain, Service Bioressources – ADEME (Angers)

---

## Remerciements :

Je remercie les participants du comité de pilotage pour m'avoir accordé leur temps, pour leurs suivis, l'ouverture de leurs entreprises et permis ainsi l'avancée et l'orientation de ces travaux. Merci à, Jean-Luc Baret, Marilyne Fortier (La Vermandoise), Bruno Gagnepain (ADEME), Hervé Graser (Cristal Union), Franck Jolibert (UNGDA), Samir Kadir (Tereos), Patrick Levalier (Tereos) et Jean-Paul Vidal (UNGDA). Je tiens à souligner l'accueil particulièrement agréable qui m'a été fait lors des visites d'ateliers et des séjours à l'UNGDA. Merci donc à tout le personnel rencontré au cours de ces déplacements.

Merci à mes encadrantes de thèse pour leurs participations au bon déroulement et l'aboutissement de ces travaux. Merci à Claire Joannis-Cassan et Patricia Taillandier, ainsi qu'à Pierre Strehaiano pour ses interventions ponctuelles mais néanmoins très utiles.

Merci à tout le personnel du LGC les techniciens de surface, le personnel administratif, les techniciens et le personnel du SAP et les chercheurs du laboratoire. Sans eux, les nombreux services rendus et conseils prodigués, le projet n'aurait pas pu aboutir.

Merci aux doctorants et post-doctorants du LGC pour tous les bons moments passés ensemble.

Merci à ma partenaire, ma famille et à mes amis encore présents ou disparus, proches ou parfois trop éloignés, merci pour tout. Cela serait beaucoup trop long à détailler je me contenterais donc d'un grand merci à tous.

Toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droits ou ayants cause est illicite selon le Code de la propriété intellectuelle (art. L 122-4) et constitue une contrefaçon réprimée par le Code pénal. Seules sont autorisées (art. 122-5) les copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé de copiste et non destinées à une utilisation collective, ainsi que les analyses et courtes citation justifiées par le caractère critique, pédagogique ou d'information de l'œuvre à laquelle elles sont incorporées, sous réserve, toutefois, du respect des dispositions des articles L 122-10 à L 122-12 du même Code, relatives à la production par reprographie.

### L'ADEME en Bref

L'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME) est un établissement public sous la tutelle conjointe du ministère de l'Ecologie, du Développement et l'Aménagement durables, et du ministère et de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Elle participe à la mise en œuvre des politiques publiques dans les domaines de l'environnement, de l'énergie et du développement durable. L'agence met ses capacités d'expertise et de conseil à disposition des entreprises, des collectivités locales, des pouvoirs publics et du grand public et les aides à financer des projets dans cinq domaines (la gestion des déchets, la préservation des sols, l'efficacité énergétique et les énergies renouvelables, la qualité de l'air et la lutte contre le bruit) et à progresser dans leurs démarches de développement durable.

[www.ademe.fr](http://www.ademe.fr)

## Intensification de la brique « fermentation alcoolique » de substrats betteraviers pour la production d'éthanol

### Résumé :

L'éthanol est un composé à usages très variés allant de la chimie à l'agroalimentaire. Cependant, la croissance actuelle du marché se fait essentiellement autour de l'utilisation de l'éthanol en tant que carburant. L'objectif de ce projet est d'intensifier la production d'éthanol à partir du sirop basse pureté, produit de la seconde cristallisation des jus d'extraction de betterave, afin de diminuer les consommations en énergie et en eau pour la production d'éthanol. Pour ce faire, en partenariat avec l'UNGDA et l'ADEME, nous avons mené des travaux de recherche sur les fermentations à haute densité afin d'obtenir des vins à teneur plus élevée en éthanol. A l'issue d'un état de l'art et de quatre visites dans des ateliers de production, une stratégie de recherche en trois points a été établie.

Le premier point a consisté en la recherche d'une composition de milieu de fermentation permettant d'augmenter la concentration finale en éthanol. Le second point a eu pour but de déterminer si les besoins en nutriments se limitaient uniquement à la phase de croissance ou au contraire si l'apport de ces nutriments était bénéfique tout au long de la fermentation. Le dernier point a quant à lui utilisé l'ensemble des résultats obtenus pour définir une conduite de procédé, permettant d'obtenir la concentration finale en éthanol la plus élevée possible.

Ces résultats montrent qu'il est possible de réaliser des fermentations haute densité à partir de sirop basse pureté et d'obtenir 15,2 % (v/v) d'éthanol en fin de fermentation. L'application de ces travaux dans les ateliers de production permettrait d'économiser par litre d'éthanol pur, entre 20 et 30 % d'énergie pour la distillation, entre 35 et 49 % d'eau pour la réalisation des milieux de fermentation à partir de SBP et de diminuer de 23 à 38 % le volume de déchet produit après distillation.

Mots-clefs : Ethanol, betterave sucrière, sirop basse pureté, Fermentation haute densité, *Saccharomyces cerevisiae*

## Optimization of ethanol production in high gravity fermentation of sugar beet substrate

### Abstract:

Ethanol is a compound with a wide usage range from chemistry to food. However, the current market growth mainly concerns the use of ethanol as fuel. The objective of this project was to intensify ethanol production from low purity syrup 2, which is a substrate from sugar beet, in order to reduce the consumptions of energy and water for its production. To do this, in partnership with UNGDA and ADEME, we have conducted research on high-gravity fermentations in order to increase the ethanol concentration at the end of the fermentation. With the coming of a state of the art and four visits in production facilities, a three points research strategy has been established.

The first point consisted of fermentation medium composition finding in order to increase the final ethanol concentration at the end of the fermentation. The second point was to determine if the nutrients requirements were limited only during the growth phase or, on the contrary, if nutrients were beneficial throughout the fermentation. The latter point was to use the overall results to define a fermentation process, to obtain a final ethanol concentration as high as possible.

These results show that it is possible to achieve high gravity fermentation from low purity syrup and reach a final ethanol concentration of 15.2 % (v/v). The application of this work in production facilities could save per liter of pure ethanol between 20 and 30% energy for distillation, between 35 and 49 % water for the production of fermentation media from SBP and decrease from 23 to 38 % of the volume of waste produced after distillation.

Key words: Ethanol, Sugar beet, Low purity syrup, High gravity fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*

---

## Lexique

**Alcali** : solution ammoniacale

**Antimousse Ouvrie 922k** : il s'agirait d'acides gras dont certains insaturés, mais la composition exacte n'a pas été communiquée par le fabriquant

**Antimousse Rhodorsil silicone 426R** : il s'agit d'un antimousse composé d'huiles de silicones, donc non assimilable par la levure

**Degrès Brix** : pourcentage de matière sèche dans un liquide. Cette unité, est souvent confondue avec le pourcentage de sucre en vinification. Cependant, si cette estimation est valable pour la vinification, elle n'est pas applicable pour les mélasses et égouts pauvres à cause de leurs fortes teneurs en non-sucre. La concentration en sucre correspond au degré Brix multiplié par la pureté.

**EP2** : égouts pauvres issus de la seconde cristallisation des sirops, ancien nom du SBP

**SP95-E10** : Supercarburant sans plomb avec un indice d'octane de 95 et contenant un mélange de 90 % (v/v) d'essence et de 10 % (v/v) d'éthanol

**Fonds de bac** : désigne le liquide contenu dans une cuve en début ou fin de soutirage

**Bruts** : Produit de la première distillation des jus ou sirops de betteraves fermentés.

**Intercampagne** : période entre deux campagnes betteravières. La campagne betteravière s'étend généralement de Septembre à fin Décembre mais peut s'étaler selon les années jusqu'à Janvier

**OGM** : organisme génétique modifié

**Ppm** : partie par million

**Pureté** : la pureté correspond au rapport exprimé, en pourcentage, entre la concentration en sucre et la concentration en matière sèche

**Rpm** : rotation par minute

**Rendement théorique sur saccharose** : correspond à l'éthanol qui peut être produit pour un gramme de saccharose si celui-ci est utilisé uniquement pour produire de l'éthanol par voie fermentaire. Le rendement théorique sur saccharose est de  $0,538 \frac{\text{g}_{\text{éthanol}}}{\text{g}_{\text{saccharose}}}$

**SBP** : sirop basse pureté, nouvelle nomenclature désignant l'EP2 communément utilisée depuis 2010. (Pureté ~75%)

**Sirop** : liquide issu de la concentration de jus clair. (Pureté ~90%)

**Temps de séjour** : rapport entre le volume du réacteur et le débit d'alimentation

**TAV** : titre alcoométrique volumique

**vvh** : unité de débit correspondant au volume de gaz injecté par volume de milieu et par heure

**vvm** : unité de débit correspondant au volume de gaz injecté par volume de milieu et par minute

# Sommaire

## Sommaire

<b>Résumé :</b> .....	<b>3</b>
<b>Abstract:</b> .....	<b>3</b>
<b>Introduction générale</b> .....	<b>17</b>
<b>I. Etude bibliographique</b> .....	<b>22</b>
I.1. Introduction.....	22
I.2. Le bioéthanol carburant.....	22
I.2.1. Présentation générale.....	22
I.2.2. Avantages et inconvénients du bioéthanol.....	23
I.2.3. La production d'éthanol.....	25
I.2.4. Impact de l'utilisation du bioéthanol comme carburant sur l'environnement.....	35
I.2.4.1. Bilan énergétique.....	35
I.2.4.2. Pollution de l'air.....	35
I.2.4.3. Emission de gaz à effet de serre.....	36
I.2.4.4. Besoin en terres agricoles.....	36
I.2.4.5. Impact sur l'agriculture.....	37
I.3. La production de bioéthanol par voie fermentaire.....	37
I.3.1. Présentation générale.....	37
I.3.2. Voies métaboliques de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	38
I.3.3. Effet des paramètres physico-chimiques sur la fermentation alcoolique.....	43
I.3.3.1. La composition du milieu.....	43
I.3.3.2. Les gaz dissous.....	49
I.3.3.3. La température.....	50
I.3.3.4. L'acidité.....	50
I.3.3.5. L'inoculum.....	50
I.3.3.6. L'éthanol.....	51
I.3.4. Les procédés de fermentation.....	52
I.3.4.1. Un système multiphasique.....	52
I.3.4.2. Les modes de conduites de fermentations.....	52
I.3.4.3. Les systèmes d'agitation.....	54
I.4. Les fermentations à haute densité.....	54
I.4.1. Présentation générale.....	54
I.4.2. Intérêts et défis techniques des fermentations à haute densité.....	54
I.4.3. L'adaptation des procédés pour les fermentations à haute densité.....	55
<b>II. Matériels et Méthodes</b> .....	<b>60</b>
II.1. Le matériel biologique.....	60
II.2. Les milieux de culture.....	60
II.2.1. Conservation des souches.....	60
II.2.2. Précultures.....	60
II.2.3. Inoculation.....	60
II.2.4. Composition des milieux de fermentation.....	60
II.3. Cultures.....	61
II.3.1. Cultures en erlenmeyer.....	61
II.3.2. Cultures en réacteur.....	62
II.3.3. Mesure du $K_La$ .....	62
II.4. Méthodes de suivi des fermentations.....	63
II.4.1. Numération cellulaire.....	63
II.4.2. Estimation des cellules viables.....	64

II.4.3.	Le pH.....	64
II.4.4.	Mesure de l'acidité.....	64
II.4.5.	Dosage de l'azote assimilable.....	64
II.4.6.	Dosage de l'azote total.....	65
II.4.7.	Dosage de l'éthanol et des sucres.....	65
II.5.	Screening des composés bénéfiques pour la production d'éthanol.....	62
II.6.	Technique des pulses en culture continue.....	62
II.7.	Réalisation des fermentations batch multi-étagées.....	70
II.8.	Réalisation des fermentations en fed-batch.....	71
II.9.	Plan d'expériences.....	72
II.9.1.	Définition des réponses étudiées.....	72
II.9.2.	Construction du plan d'expériences.....	73
<b>III.</b>	<b>Résultats et discussion.....</b>	<b>78</b>
III.1.	Visites réalisées en distillerie.....	72
III.1.1.	Rapport sur le site N°1 – Avril 2010.....	78
III.1.2.	Rapport sur le site N°2 – Mai 2010.....	81
III.1.3.	Rapport sur le site N°3 – Novembre 2010.....	82
III.1.4.	Rapport sur le site N°4 – Février 2011.....	85
III.1.5.	Tableau comparatif des sites.....	86
III.2.	Amélioration des conditions de culture.....	22
III.2.1.	Expériences préliminaires.....	88
III.2.1.1.	Première fermentation.....	88
III.2.1.2.	Seconde fermentation.....	89
III.2.2.	Optimisation des concentrations en azote et en phosphore ajoutés.....	92
III.2.2.1.	Régression sur la productivité en éthanol.....	93
III.2.2.2.	Régression sur la concentration finale en éthanol.....	95
III.2.2.3.	Recherche d'optimum.....	97
III.2.2.4.	Validation de la supplémentation optimale en azote.....	101
III.2.3.	Effets de l'ajout d'ions métalliques.....	104
III.2.3.1.	Effets des pulses d'ions métalliques sur la fermentation continue.....	104
III.2.3.2.	Effets des ions métalliques sur la fermentation en batch.....	106
III.2.4.	Tests sur l'inoculum.....	107
III.2.4.1.	Etude de différentes souches de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	107
III.2.4.2.	Etude sur la quantité d'inoculum.....	108
III.2.5.	Screening sur les compléments.....	111
III.2.5.1.	Composés complexes.....	111
III.2.5.2.	Milieu MS300.....	112
III.2.5.3.	Lipides insaturés.....	113
III.2.5.4.	Le chitosan.....	114
III.2.5.5.	Les vinasses.....	115
III.2.6.	Conclusion intermédiaire sur l'amélioration de la composition du milieu.....	115
III.2.7.	Etude sur le moment de l'apport des nutriments.....	116
III.2.7.1.	L'oxygène tout au long de la fermentation.....	116
III.2.7.2.	L'azote et le phosphore tout au long de la fermentation.....	123
III.2.7.3.	Conclusion sur les apports de nutriment en cours de fermentation.....	126
III.3.	Recherche du procédé de fermentation le plus performant.....	126
III.3.1.	Procédé batch bi-étagé avec tous les composés bénéfiques.....	127
III.3.2.	Procédé tri-étagé.....	129
III.3.3.	Procédé fed-batch.....	132
III.3.3.1.	Fed-batch alimentation longue / débit constant : Influence de la température.....	132
III.3.3.2.	Fed-batch alimentation longue / débit variable.....	136
III.3.3.3.	Fed-batch alimentation courte / débit constant.....	139
III.3.3.4.	Bilan intermédiaire sur la recherche du type de fermentation le plus performant....	141
III.3.3.5.	Fed-batch alimentation courte épuisement des sucres.....	141



---

<b>IV. Conclusions et perspectives .....</b>	<b>148</b>
IV.1. Conclusion Générale .....	148
IV.2. Proposition d'application à un atelier de production .....	151
IV.3. Perspectives .....	154
<b>Références .....</b>	<b>156</b>
ANNEXE 1 : Compositions des différentes solutions servant à la réalisation des compléments utilisés pour le milieu nommé MS300.....	163
ANNEXE 2 : Questionnaire envoyé aux ateliers de production d'éthanol .....	165
ANNEXE 3 : Résultats des dosages des acides aminés dans le SBP réalisés par Invivo Labs.....	176
ANNEXE 4 : Résultats des dosages effectués sur le SBP par l'UNGDA .....	177

## Liste des figures

Figure 1: Le bioéthanol de la production à l'utilisation .....	23
Figure 2: Schéma de production de bioéthanol à partir de betteraves sucrières .....	26
Figure 3: Schéma de transformation des céréales en éthanol par voie "dry milling" .....	28
Figure 4: Schéma de transformation des céréales en éthanol par la voie "wet milling" .....	29
Figure 5 : Localisation de l'ensemble des sites métropolitains de production d'éthanol (source UNGDA) .....	33
Figure 6: Evolution de la production mondiale d'éthanol carburant. (Renewable Fuels Association, 2009 ; France Agrimer, 2011).....	34
Figure 7: La glycolyse (Dickinson et Schweizer, 1999) .....	39
Figure 8: Nœud métabolique du pyruvate.....	39
Figure 9: Le cycle de l'acide citrique (Dickinson et Schweizer, 1999). Pi correspond à du phosphate inorganique en solution. ....	40
Figure 10: Voie des pentoses phosphates.....	41
Figure 11: Production des alcools supérieurs (Walker, 1999) .....	43
Figure 12: La fermentation: un système triphasique.....	52
Figure 13: Schéma du quadrillage présent dans la cavité de la cellule de Thoma. ....	63
Figure 14: Droite d'étalonnage de l'éthanol dosé par HPLC. ....	66
Figure 15: Droite d'étalonnage du fructose dosé par HPLC.....	67
Figure 16: Droite d'étalonnage du glucose dosé par HPLC. ....	67
Figure 17: Droite d'étalonnage du saccharose dosé par HPLC. ....	68
Figure 18: Schéma du montage utilisé pour la réalisation des pulses.....	69
Figure 19: Technique des pulses: réponses attendues pour un composé limitant dans le cadre de la production d'éthanol. Les valeurs 0, 1, 2 et 3 correspondent à concentrations croissantes d'un composé limitant. ....	69
Figure 20: Schéma de la fermentation bi-étagée .....	70
Figure 21: Schéma de la fermentation tri-étagée .....	71
Figure 22: Schéma de la fermentation en fed-batch.....	71
Figure 23: Schéma de la cuverie du site n°1. Les débits indiqués sont données pour une production journalière d'environ 2000 hL d'éthanol par jour durant l'inter-campagne (calcul prévisionnel pour un vin à 12 % v/v d'éthanol). Les durées indiquées sous les cuves correspondent aux temps de séjour dans chaque cuve.....	80
Figure 24: Schéma de la cuverie du site n°3. Les débits indiqués sont en rouge sous les cuves correspondent aux temps de rétention dans chaque cuve. ....	84
Figure 25: Evolution de la perte de masse durant la fermentation de milieu à 325 et 245 g.L <sup>-1</sup> de sucre additionnés ou non d'azote et de phosphore. Les $\square$ représentent le milieu 245, les $\square$ le milieu 245 N+P et les $\square$ le milieu 325 N+P. Les valeurs indiquées prennent en compte l'évaporation mesurée par un témoin.....	88
Figure 26: Evolution de la concentration cellulaire totale durant la fermentation de milieu à 325 et 245 g.L <sup>-1</sup> de sucre additionnés ou non d'azote et de phosphore. Comptages réalisés sur cellule de Thoma. Les barres d'erreurs présentées ici sont issues du calcul de l'écart type réalisé sur cinq comptages du même milieu. Les $\square$ représentent le milieu 245, les $\square$ le milieu 245 N+P et les $\square$ le milieu 325 N+P....	89
Figure 27: Evolution de la perte de masse durant la fermentation de milieu à 230 g.L <sup>-1</sup> de sucres additionnés d'azote et de phosphore. Les $\square$ correspondent aux milieux X8, les $\square$ à X7 et les $\square$ à X6. La perte de masse représentée tient compte de l'évaporation du milieu. ....	90

Figure 28: Evolution de la concentration cellulaire durant la fermentation de milieu à 230 g.L <sup>-1</sup> de sucres additionnés d'azote et de phosphore inoculé à 10 <sup>7</sup> levures.mL <sup>-1</sup> et incubé à 33°C. Comptages réalisés sur cellule de Thoma. Les barres d'erreurs présentées ici sont issues du calcul de l'écart type réalisé sur les trois mesures au même temps. Les , et les représentent les trois répétitions. ....	91
Figure 29: Représentation graphique de la surface de réponse pour la productivité avec les facteurs X <sub>1</sub> et X <sub>2</sub> . X <sub>3</sub> a été fixé au niveau 0 pour cette représentation. ....	94
Figure 30: Représentation graphique de la surface de réponse pour la productivité avec les facteurs X <sub>1</sub> et X <sub>3</sub> . X <sub>2</sub> a été fixé au niveau 0 pour cette représentation. ....	95
Figure 31: Représentation graphique de la surface de réponse pour la productivité avec les facteurs X <sub>2</sub> et X <sub>3</sub> . X <sub>1</sub> a été fixé au niveau 0 pour cette représentation. ....	95
Figure 32: Représentation graphique de la surface de réponse pour le TAV final avec les facteurs X <sub>1</sub> et X <sub>2</sub> . X <sub>3</sub> a été fixé au niveau 0 pour cette représentation. ....	96
Figure 33: Représentation graphique de la surface de réponse pour le TAV final avec les facteurs X <sub>1</sub> et X <sub>3</sub> . X <sub>2</sub> a été fixé au niveau 0 pour cette représentation. ....	97
Figure 34: Représentation graphique de la surface de réponse pour le TAV final avec les facteurs X <sub>2</sub> et X <sub>3</sub> . X <sub>1</sub> a été fixé au niveau 0 pour cette représentation. ....	97
Figure 35: Recherche d'optima sur la productivité. Les lignes pointillées verticales localisent l'optimum pour les X <sub>i</sub> . y correspond à la valeur de la productivité à l'optimum. Les intersections entre les courbes de réponses et la ligne pointillée horizontale représentent graphiquement les valeurs optimales. ....	98
Figure 36: Recherche d'optima sur la concentration en éthanol. Les lignes pointillées verticales localisent l'optimum pour les X <sub>i</sub> . y correspond à la valeur du TAV final à l'optimum. Les intersections entre les courbes de réponses et la ligne pointillée horizontale représentent graphiquement les valeurs optimales. ....	99
Figure 37: Recherche d'optima sur la productivité et le TAV final. Les lignes pointillées verticales localisent l'optimum simultanément pour les deux réponses pour les X <sub>i</sub> . Les y correspondent aux valeurs de la productivité et du TAV final à l'optimum. Les intersections entre les courbes de réponses et les lignes pointillées horizontales représentent graphiquement les valeurs optimales. ....	100
Figure 38: Evolution en milieu optimisé pour les concentrations en azote, phosphore et sucre initial, de la concentration cellulaire totale ( ) et de la concentration en azote assimilable ( ). ....	102
Figure 39: Evolution, en milieu optimisé pour les concentrations en azote, phosphore et sucre initial, de la concentration cellulaire viable ( ) et de la concentration en azote assimilable ( ). ....	103
Figure 40: Suivi des concentrations en sucre et du TAV lors de l'ajout de magnésium dans un réacteur continu à l'état stationnaire. Les représentent la concentration en sucre et les le TAV. Les lignes horizontales représentent l'état stationnaire. ....	105
Figure 41: Evolution du TAV final en fonction de la concentration cellulaire à l'inoculation. Les ( ) représentent les Milieux S et les ( ) représentent la série Test X0. ....	109
Figure 42: Evolution du rendement en fonction de la concentration cellulaire à l'inoculation. Les ( ) représentent les Milieux S et les ( ) représentent la série Test X0. ....	110
Figure 43: Evolution du rendement de conversion du sucre en éthanol en fonction du TAV final. Les ( ) représentent les Milieux S et les ( ) représentent la série Test X0. ....	110
Figure 44 : Schéma de la fermentation batch bi-étagée réalisée pour le test sur l'apport d'oxygène. ....	117
Figure 45: Suivi des concentrations en sucre équivalent saccharose au cours du temps. Les ( ) représentent les concentrations en sucre équivalent saccharose pour le milieu avec apport d'oxygène tout au long de la fermentation (O2) et les ( ) représentent celles du milieu sans apport d'oxygène en phase de production (ANA). ....	118
Figure 46: Suivi des TAV au cours du temps. Les ( ) représentent les TAV pour le milieu avec apport d'oxygène tout au long de la fermentation (O2) et les ( ) représentent les TAV du milieu sans apport d'oxygène en phase de production (ANA). ....	118
Figure 47: Suivi des concentrations cellulaires au cours du temps. Les ( ) représentent les concentrations cellulaires pour le milieu avec apport d'oxygène tout au long de la fermentation et les ( ) représentent celles du milieu sans apport d'oxygène en phase de production. ....	119

Figure 48: Suivi des viabilités au cours du temps. Les ( ) représentent les viabilités pour le milieu avec apport d'oxygène tout au long de la fermentation et les ( ) représentent celles du milieu sans apport d'oxygène en phase de production.....	120
Figure 49: Suivi des concentrations cellulaires au cours du temps. Les ( ) représentent les concentrations cellulaires pour le milieu avec une aération de 10 vvh tout au long de la fermentation, les ( ) représentent celles du milieu avec une aération de 10 vvh en phase de propagation puis 1 vvh en phase de production.....	121
Figure 50: Suivi des viabilités au cours du temps. Les ( ) représentent les viabilités pour le milieu avec une aération de 10 vvh tout au long de la fermentation, les ( ) représentent celles du milieu avec une aération de 10 vvh en phase de propagation puis 1 vvh en phase de production. ....	121
Figure 51: Suivi des concentrations en sucre au cours du temps. Les ( ) représentent les concentrations en sucre pour le milieu avec une aération de 10 vvh tout au long de la fermentation et les ( ) représentent celles du milieu avec une aération de 10 vvh en phase de propagation puis 1 vvh en phase de production.....	122
Figure 52: Suivi des TAV au cours du temps. Les ( ) représentent les TAV pour le milieu avec une aération de 10 vvh tout au long de la fermentation et les ( ) représentent ceux du milieu avec une aération de 10 vvh en phase de propagation puis 1 vvh en phase de production. ....	122
Figure 53: Suivi des concentrations en sucre équivalent saccharose au cours du temps. Les ( ) représentent les concentrations en sucre équivalent saccharose pour le milieu avec apport d'azote et de phosphore au cours des deux phases de la fermentation (NP) et les ( ) représentent celles du milieu avec apport d'azote et de phosphore uniquement durant la phase de propagation (NPX3). ...	124
Figure 54: Suivi des TAV au cours du temps. Les ( ) représentent les TAV pour le milieu avec apport d'azote et de phosphore au cours des deux phases de la fermentation (NP) et les ( ) représentent ceux du milieu avec apport d'azote et de phosphore uniquement durant la phase de propagation (NPX3).....	124
Figure 55: Suivi des concentrations cellulaires au cours du temps. Les ( ) représentent les concentrations cellulaires pour le milieu avec apport d'azote et de phosphore au cours des deux phases de la fermentation et les ( ) représentent celles du milieu avec apport d'azote et de phosphore uniquement durant la phase de propagation.....	125
Figure 56: Suivi des viabilités au cours du temps. Les ( ) représentent les viabilités pour le milieu avec apport d'azote et de phosphore au cours des deux phases de la fermentation et les ( ) représentent celles du milieu avec apport d'azote et de phosphore uniquement durant la phase de propagation..	126
Figure 57: Suivi des concentrations cellulaires au cours du temps lors du bi-étagé à 30 °C avec milieu optimisé. Les ( ) représentent les concentrations de cellules viables et les ( ) représentent celles de cellules totales. ....	128
Figure 58: Suivis du TAV et de la concentration en sucres équivalent saccharose au cours du temps lors du bi-étagé à 30 °C avec milieu optimisé. Les ( ) représentent le TAV et les ( ) représentent la concentration en sucres équivalent saccharose.....	128
Figure 59: Schéma de la fermentation batch tri-étagée.....	130
Figure 60: Suivi des concentrations cellulaires au cours du temps lors du tri-étagé avec milieu optimisé. Les ( ) représentent les concentrations de cellules viables et les ( ) représentent celles de cellules totales. ....	130
Figure 61: Suivis du TAV et de la concentration en sucres équivalent saccharose au cours du temps lors du tri-étagé avec milieu optimisé. Les ( ) représentent le TAV et les ( ) représentent la concentration en sucres équivalent saccharose.....	131
Figure 62: Evolution du volume et de la concentration en sucre dans le milieu dans l'hypothèse d'un milieu non inoculé lors d'un fed-batch réalisé à 30°C. Les ( ) représentent la concentration en sucre équivalent saccharose et les ( ) représentent le volume de milieu dans le réacteur.....	133
Figure 63: Suivi des concentrations cellulaires au cours du temps lors d'un fed-batch réalisé à 30°C. Les ( ) représentent les concentrations de cellules viables et les ( ) représentent celles de cellules totales.....	134

Figure 64: Suivis du TAV et de la concentration en sucres équivalent saccharose au cours du temps lors d'un fed-batch réalisé à 30°C. Les ( ) représentent le TAV et les ( ) représentent la concentration en sucres équivalent saccharose. ....	134
Figure 65: Suivi des concentrations cellulaires au cours du temps lors d'un fed-batch réalisé à 33°C. Les ( ) représentent les concentrations de cellules viables et les ( ) représentent celles de cellules totales. ....	135
Figure 66: Suivis du TAV et de la concentration en sucres équivalent saccharose au cours du temps lors d'un fed-batch réalisé à 33°C. Les ( ) représentent le TAV et les ( ) représentent la concentration en sucres équivalent saccharose. ....	135
Figure 67: Evolution de la vitesse de consommation de sucre observée lors du fed-batch 1. Les points représentés à chaque temps t correspondent aux vitesses moyennes observées entre les mesure t et t+dt. L'équation $y_1$ représente le polynôme utilisé pour modéliser la vitesse de consommation de sucre entre T0 et T29 et $y_2$ pour celle observée entre T29 et T77. ....	137
Figure 68: Evolution du débit d'alimentation de la cuve de fermentation. Les ( ) représentent les débits calculés et les ( ) représentent les débits réellement appliqués lors de la réalisation de la fermentation. ....	137
Figure 69: Suivi des concentrations cellulaires au cours du temps lors du fed-batch 3. Les ( ) représentent les concentrations de cellules viables et les ( ) représentent celles de cellules totales. ....	138
Figure 70: Suivis du TAV et de la concentration en sucres équivalent saccharose au cours du temps lors du fed-batch 3. Les ( ) représentent le TAV et les ( ) représentent la concentration en sucres équivalent saccharose. ....	138
Figure 71: Suivi des concentrations cellulaires au cours du temps lors du fed-batch 4. Les ( ) représentent les concentrations de cellules viables et les ( ) représentent celles de cellules totales. ....	140
Figure 72: Suivis du TAV et de la concentration en sucres équivalent saccharose au cours du temps lors du fed-batch 4. Les ( ) représentent le TAV et les ( ) représentent la concentration en sucres équivalent saccharose. ....	140
Figure 73: TAV obtenus en fin de fermentation et durée de fermentation pour les différents procédés testés à 30 °C. Les barres représentent les TAV et les    représentent les durées de fermentation... 141	141
Figure 74: Suivi des concentrations cellulaires au cours du temps lors fed-batch 5. Les ( ) représentent les concentrations de cellules viables et les ( ) représentent celles de cellules totales. ....	143
Figure 75: Suivis du TAV et de la concentration en sucres équivalent saccharose au cours du temps lors du fed-batch 5. Les ( ) représentent le TAV et les ( ) représentent la concentration en sucres équivalent saccharose. ....	144
Figure 76: Exemple de schéma de principe pour l'utilisation du procédé proposé. Le schéma présente l'état dans lequel serait l'ensemble de la cuverie à un moment donné. Les flèches horizontales indiquent le sens de changement de séquence. ....	152
Figure 77: Exemple de schéma de principe pour l'utilisation du procédé proposé. Le schéma présente l'état dans lequel serait l'ensemble de la cuverie après la première rotation de séquence. ....	153

## Liste des tableaux

Tableau 1: Comparaison des avantages et inconvénients de l'utilisation du bioéthanol en tant que carburant (Didderen et col, 2008 ; Oestling , 2001).....	24
Tableau 2: Composition des différents jus formés lors de la production de sucre de betterave (Ranković et col., 2009) .....	27
Tableau 3: Composition moyenne du blé tendre en pourcentage sur matière totale (Das Neves et col, 2006) .....	27
Tableau 4 : Répartition de la production d'éthanol en 2010 en fonction du substrat utilisé. Les valeurs sont indiquées en milliards de m <sup>3</sup> (France Agrimer, 2011). Le terme « Autres » regroupe une grande diversité de matières premières comme les substrats viniques, le manioc ou encore le sorgho.....	30
Tableau 5: Exigences sur la qualité de l'éthanol carburant destiné au mélange avec l'essence (AFNOR, 2008).....	31
Tableau 6: Groupes et sociétés productrices d'éthanol en France ainsi que les matières premières utilisées pour la production (source UNGDA). La dénomination « Rectificateur » indique que les groupes concernés achètent des alcools, généralement brut, les rectifient, les distillent pour répondre aux cahiers des charges de leurs clients. ....	33
Tableau 7: Bilan des émissions de gaz à effets de serre incluant l'utilisation des coproduits. Bilan par rapport à l'essence (Réseau Action Climat-France, 2006 ; Cherubini et col. 2009 ; DEPD-ADEME, 2010). ....	36
Tableau 8: Composition approximative de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en macroéléments (Ingledew, 1999) .....	44
Tableau 9: Composition approximative de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en ions métalliques, besoins et limites dans le milieu (Ingledew, 1999)(Heggart et col., 1999)(Jones et Greenfield, 1984).....	44
Tableau 10 : Résultats des analyses des concentrations en sucre et en azote assimilable des SBP utilisés pour chaque chapitre. Les concentrations en sucre sont issues des dosages fait par l'UNGDA et les concentrations en azote assimilable ont été mesuré comme expliqué partie II.4.5. ....	61
Tableau 11: Mesure des KLa et des transferts d'oxygène pour les réacteurs Setric Set 2 utilisés à 33°C sous 120 rpm d'agitation. ....	63
Tableau 12: Résultats des dosages d'azote assimilable réalisés à pH 7,5. ....	65
Tableau 13 : Récapitulatif des conditions opératoires testées en fed-batch.....	72
Tableau 14: Table de correspondance entre les valeurs réelles et les valeurs codées. ....	73
Tableau 15: Table de correspondance expérimentale entre les valeurs réelles et les valeurs codées pour les concentrations en azote et phosphore.....	73
Tableau 16: Composition des différents milieux réalisés pour le plan d'expériences. Chaque ligne représente pour une expérience les valeurs codées et les valeurs réelles du milieu pour X1 la concentration en azote, X2 la concentration en phosphore et X3 la concentration en sucre initial. ....	74
Tableau 17: Comparatif des données recueillies lors des visites réalisées sur les sites de production d'éthanol. Ce tableau compare les données concernant uniquement la production d'éthanol lors de l'utilisation de sirop basse pureté.....	87
Tableau 18: Récapitulatif des résultats obtenus par dosages des milieux du plan d'expériences, réalisés en fin de fermentation. ....	93
Tableau 19: Coefficients significatifs de la régression de l'équation 13 pour la productivité. ....	94
Tableau 20: Coefficients significatifs de la régression de l'équation 13 pour le TAV final.....	96
Tableau 21: Résultats obtenus pour les dosages de l'azote assimilable dans les conditions optimales prédites par le plan d'expériences .....	102
Tableau 22: Concentration en azote total dans les différentes phases pour T0 et Tfinal.....	103
Tableau 23: Résultats obtenus pour la production d'éthanol .....	103
Tableau 24: Perturbations maximales observées par rapport à l'état stationnaire après injection des composés testés. La concentration de 300 ppm de magnésium ayant dans un premier temps été	

inhibitrice puis activatrice de la fermentation, ces valeurs sont présentées sous la forme : minimum de la phase d'inhibition/maximum de la phase d'activation. ....	105
Tableau 25: Résultats obtenus en fin de fermentation pour l'ajout d'ions métalliques dans un milieu à 220 g.L <sup>-1</sup> de sucre. Les résultats sont exprimés par comparaison avec le témoin réalisé en même temps que cette série.....	106
Tableau 26: Résultats obtenus en fin de fermentation pour l'ajout d'ions métalliques dans un milieu à 300 g.L <sup>-1</sup> de sucre. Les résultats sont exprimés par comparaison avec le témoin réalisé en même temps que cette série.....	107
Tableau 27 : Résultats obtenus pour les différentes souches utilisées pour inoculer le milieu S pour la concentration cellulaire, la viabilité, la concentration en éthanol, le rendement et la concentration en sucre consommé en fin de fermentation. Les résultats sont exprimés par comparaison avec le milieu S inoculé avec la souche C10 utilisée comme référence.....	108
Tableau 28: Résultats obtenus pour les différentes concentrations cellulaires utilisées pour inoculer le milieu S pour les concentrations cellulaires en début et en fin de fermentation, la viabilité, la concentration en éthanol, le rendement et la concentration en sucre consommé en fin de fermentation. ....	109
Tableau 29: Résultats obtenus pour l'ajout de composés complexes pour les viabilités, les concentrations en levure, en éthanol et en sucre consommé en fin de fermentation. Les résultats sont exprimés par comparaison avec le milieu S utilisé comme référence.....	112
Tableau 30: Résultats obtenus pour l'ajout des compléments utilisés pour la réalisation du milieu MS300. La viabilité, la concentration en éthanol, le rendement et la concentration en sucre consommé en fin de fermentation sont exprimés par comparaison avec le milieu S.....	112
Tableau 31: Résultats obtenus pour l'ajout des huiles. La viabilité, la concentration en éthanol, le rendement et la concentration en sucre consommé en fin de fermentation sont exprimés par comparaison avec le milieu S utilisé comme référence.....	113
Tableau 32 : Résultats obtenus pour l'ajout de chitosan. La viabilité, la concentration en éthanol, le rendement et la concentration en sucre consommé en fin de fermentation sont exprimés par comparaison avec le milieu S utilisé comme référence.....	114
Tableau 33: Résultats obtenus pour des fermentations réalisées avec différents pourcentages de vinasses pour les viabilités, les concentrations en levure, en éthanol et en sucre consommé en fin de fermentation. Les résultats sont exprimés par comparaison avec le milieu S, réalisé sans vinasses, utilisé comme référence.....	115
Tableau 34: Résultats obtenus pour les différentes phases de fermentation réalisées. O2 et ANA correspondent respectivement au milieu avec et sans aération lors de la phase de production.....	119
Tableau 35: Résultats obtenus pour les différentes phases des fermentations réalisées. NP correspond au milieu avec apport d'azote et de phosphore au cours des deux phases de la fermentation et NP X 3 au milieu avec apport d'azote et de phosphore uniquement durant la phase de propagation.....	125
Tableau 36: Résultats obtenus pour les différentes phases de la fermentation batch bi-étagée tous composés. Les résultats pour les fermentations O2 et NP correspondent au milieu à 300 g.L <sup>-1</sup> de sucre avec ajout d'azote et phosphore incubé à 33 °C. Les phases de propagation ont toutes duré 12 heures avant le transfert d'un tiers du milieu dans une cuve contenant du milieu frais. ....	129
Tableau 37: Résultats obtenus pour les différentes phases de la fermentation tri-étagée. La phase 1 correspond à la phase de propagation a duré 12 heures avant le transfert d'un tiers du milieu dans une cuve contenant du milieu frais. La phase 2 correspond à la première phase de production qui a duré 24 h. La phase 3 correspond à la seconde phase de production.....	132
Tableau 38 : Résultats obtenus pour les deux températures de fermentation en fed-batch pour les concentrations en levure, en éthanol et en sucre et les rendements observés. ....	136
Tableau 39: Résultats des dosages effectués par l'UNGDA sur le vin en fin de fermentation pour le fed-batch 5. Les notations < indiquent que les concentrations des composés concernés sont inférieures au seuil de détection. Les résultats sont présentés dans ce tableau tel qu'ils ont été fournis par l'UNGDA. La colonne production indique les concentrations estimées des composés produits en cours de fermentation. ....	145

---

Tableau 40: Composition de la solution de facteurs de croissance en anaérobie. Après mélange des composés, la solution a été chauffée à 70°C pendant 5 minutes afin de permettre la dissolution de l'ergostérol. Solution utilisée à 1 mL.L <sup>-1</sup> de milieu final. ....	163
Tableau 41: Composition de la solution mère de vitamines. Solution utilisée à 10 mL.L <sup>-1</sup> de milieu final. ....	163
Tableau 42: Composition de la solution mère d'oligo-éléments. Solution utilisée à 1 mL.L <sup>-1</sup> de milieu final.....	163
Tableau 43: Composition de la solution mère d'acides aminés. La dissolution des acides aminés a été effectuée dans de l'eau distillée à 100°C contenant 20 g.L <sup>-1</sup> de NaHCO <sub>3</sub> . Solution utilisée à 13 mL.L <sup>-1</sup> de milieu final.....	164
Tableau 44: Concentrations en acides aminés dans le SBP. Les concentrations sont exprimées en g d'acides aminés par kg de SBP. La notation <0,2 indique que les concentrations sont inférieures au seuil de détection des acides aminés. ....	176
Tableau 45: Résultats des dosages effectués par l'UNGDA sur le SBP. Les notations < indiquent que les concentrations des composés concernés sont inférieures au seuil de détection. Les résultats sont présentés dans ce tableau tel qu'ils ont été fournis par l'UNGDA.....	177





# Introduction générale

Les premières traces écrites citant la betterave datent d'environ 420 avant J.-C.. Il aura fallu deux millénaires pour retrouver cette plante cultivée dans l'Europe entière. Ce n'est qu'en 1600 que Olivier de Serres, agronome français, s'aperçut qu'il était possible de produire une substance sucrée en cuisant le jus issu de certaines variétés de betterave. Un siècle et demi plus tard, en 1747, le chimiste prussien Andreas Margraaf, découvrit que la betterave contenait effectivement du saccharose à l'instar de la canne à sucre qui était à l'époque la seule source de saccharose (Zysset, 2002). Le 21 Novembre 1806, après la défaite des anglais à Trafalgar, Napoléon 1<sup>er</sup> instaura le blocus continental, ce qui interdisait aux bateaux anglais l'accès des ports européens et donc limitait fortement l'importation du sucre de canne provenant des colonies. Seulement deux années auront été nécessaires aux scientifiques français pour présenter à l'empereur deux pains de sucre de betterave. C'est alors que la betterave a réellement connu son essor agronomique grâce aux affiliations de terre pour la culture de la betterave et aux subventions pour la construction de sucreries. Si le sucre de canne réapparut en quantité en Europe à la fin du blocus continental, la production de sucre de betterave perdura grâce à des progrès agronomiques et techniques lui permettant d'être rentable.

La production de sucre à partir de canne ou de betterave génère un sous-produit appelé mélasse. Ce sous-produit contient encore du sucre mais son extraction est difficile et onéreuse. A partir du 16<sup>ème</sup> siècle la mélasse de canne à sucre servit à produire de l'alcool par fermentation ce qui aboutit à la production de rhum. Cependant, l'alcool obtenu après fermentation et distillation de la mélasse de betterave s'étant révélé impropre à la consommation (mauvais goût), la valorisation de ce sous-produit a été orientée vers l'éthanol pur et l'alimentation animale.

Suite à la forte industrialisation de l'agriculture opérée dans la seconde moitié du 20<sup>ème</sup> siècle, la production de sucre est devenue excédentaire par rapport à la demande. Ceci a entraîné des fluctuations du cours du sucre et des quotas ont donc été instaurés. C'est alors que des intermédiaires de la chaîne de production ont commencé à être fermentés (Gillis, 1999). Aujourd'hui, la production d'éthanol à partir de jus vert (jus d'extraction) ou de sirops (jus vert clarifié et concentré par évaporation) est couramment réalisée ce qui permet de stabiliser les revenus des ateliers de production en fonction à la fois du cours du sucre mais aussi celui de l'éthanol.

A présent, l'éthanol n'est plus le co-produit de la production de sucre mais un produit à part entière. En effet, suite à l'augmentation du prix du pétrole, la déplétion de ces réserves, des problèmes de sécurisation de ses importations et ses effets notoires sur l'environnement, l'éthanol devient de jour en jour plus intéressant, non plus pour la consommation en tant qu'alcool de bouche mais pour son utilisation en tant que carburant renouvelable.

La production d'éthanol par la levure *Saccharomyces cerevisiae* à partir de substrat betteravier est bien connue en France. Une amélioration de l'étape de fermentation reste néanmoins nécessaire afin de diminuer les coûts de production. Une des solutions proposées est la fermentation à haute densité (>250 g.L<sup>-1</sup>) permettant d'obtenir des concentrations finales en éthanol supérieures à 15% (v/v), contrairement aux fermentations classiquement mises en œuvre à l'échelle industrielle qui aboutissent à des vins entre 10 et 12 % (v/v) (Puligundla et col., 2011). Cependant, de fortes concentrations en sucre entraînent souvent des fermentations languissantes ou incomplètes, liées au stress osmotique, à la toxicité de l'éthanol, ou à des carences nutritionnelles. L'ajout de nutriments (azote, phosphore, ions métalliques,...) ou de facteurs osmoprotectants (ajout d'acides gras, micro-aération,...) sont des paramètres qui peuvent permettre d'améliorer les performances des fermentations à haute densité (D'Amore et col., 1990 ; Bvochora et col., 2000 ; Bai et col., 2008 (b); Breisha, 2010). Quelques résultats ont été rapportés pour des fermentations à partir de biomasse amylacée (Das Neves et col., 2006 ; Srichuwong et col., 2009) mais très peu d'études se sont intéressées aux substrats issus de la betterave sucrière.

Les fermentations à haute densité permettrait par unité d'alcool, à la fois de diminuer la consommation en eau pour la réalisation des milieux de fermentation, diminuer le volume de déchet à traiter ainsi la quantité d'énergie nécessaire pour la distillation. Ce qui aurait pour effet de diminuer l'impact environnemental de la production d'éthanol mais aussi de diminuer les coûts de production et ainsi d'augmenter la compétitivité de l'éthanol de betterave en tant que carburant renouvelable. Cependant, en dépit de leurs avantages, les fermentations à haute densité ne se sont pas encore implantées pour la production d'éthanol en France à l'échelle industrielle. Ceci s'explique à la fois par les problèmes que ce type de fermentation pose mais aussi par un manque de connaissance de ce procédé pour la production d'éthanol à partir de substrat betteravier.

Ainsi, l'objectif de ce travail est d'optimiser les conditions de culture de *Saccharomyces cerevisiae* pour des milieux à haute densité, réalisés à partir de produits industriels nommés sirops basse pureté

---

(SBP), issus de la seconde cristallisation de jus de betteraves concentrés. Pour ce faire il a fallu à la fois optimiser la composition du milieu de culture mais aussi le procédé de fermentation.

La première partie de cette étude a consisté en un état de l'art expliquant à la fois pourquoi et comment l'éthanol peut être un carburant de choix pour l'avenir. Cette partie présente aussi ce que sont les fermentations à haute densité, les défis qu'elles posent, leurs intérêts économiques et environnementaux et les améliorations possibles à apporter à ce type de milieu. Ceci a permis à la fois de cerner les enjeux et les moyens à mettre en œuvre pour la réalisation de projet. Cependant, l'état de l'art a montré qu'il n'y avait que peu d'études menées sur la production industrielle d'éthanol en milieu à haute densité ( $>250 \text{ g.L}^{-1}$ ) à partir de substrat betteravier. Pour pallier ce problème, des visites dans quatre ateliers de production ont été effectuées.

Il est alors apparu qu'une étude exhaustive de tous les paramètres permettant d'augmenter la concentration finale des vins en éthanol était impossible. En effet, il aurait fallu pour cela tester tous les paramètres modifiant la composition du milieu à différentes concentrations, et ce pour les différents procédés et conditions physico-chimiques testés. Conscient de cette limite, la stratégie de recherche a été de réaliser dans un premier temps une étude sur la composition du milieu de fermentation pour la production d'éthanol puis de tester différents procédés avec le milieu ainsi défini.

La seconde partie de cette étude présente l'ensemble du matériel utilisé ainsi que les méthodes appliquées pour la réalisation de ces travaux de thèse.

La troisième partie de cette étude présente les résultats obtenus divisés en trois sous parties :

- Une étude de quatre ateliers de productions.
- Une étude sur le milieu de culture avec la détermination des compléments permettant d'améliorer les performances fermentaires. Ceci avait pour objectifs d'établir une composition de milieu en début de fermentation permettant à *Saccharomyces cerevisiae* de produire la concentration finale en éthanol la plus élevée possible, ainsi que de déterminer si les besoins nutritifs de la levure se limitaient à la phase de croissance ou s'ils s'étalaient tout au long de la fermentation. De cette partie a découlé le choix des procédés testés par la suite.
- Une étude concernant les procédés de fermentation, qui a été réalisée en utilisant les résultats obtenus précédemment pour aboutir à une fermentation très performante à haute densité pour la production d'éthanol à partir de SBP.

Enfin, ce projet ayant un objectif industriel, les démarches à réaliser avant son application dans les ateliers de productions sont indiquées en conclusion.



# **Chapitre I :**

# **Etude bibliographique**

## I. Etude bibliographique

### I.1. Introduction

Le monde fait actuellement face à une diminution de ses ressources énergétiques principalement basées sur des énergies non renouvelables à l'échelle d'une vie d'homme tel le pétrole. De plus ces ressources deviennent de plus en plus difficiles à exploiter et donc de moins en moins bon marché (Sanchez et Cardona, 2008). Face à cet épuisement des réserves, l'émergence de certains pays, comme la Chine et l'Inde, augmente la pression exercée sur les ressources énergétiques et active les spéculations boursières. Par ailleurs, l'utilisation massive de ces énergies a pour effet d'augmenter la concentration en dioxyde de carbone dans l'atmosphère, augmentant l'effet de serre et engendrant un changement climatique.

Des alternatives d'énergies, qui sont renouvelables à court terme, existent comme: l'éolien, la géothermie, le solaire, l'énergie marémotrice, la biomasse... Certains organismes vivants sont capables de capter l'énergie solaire et de la stocker, ce phénomène est appelé la photosynthèse. Ce sont eux qui, après des millions d'années d'enfouissement, sont à l'origine du pétrole stocké dans le manteau terrestre. Il n'est donc pas surprenant que les plantes cultivées aujourd'hui permettent de produire des carburants aux propriétés similaires : léger, liquide et concentré en énergie.

Les biocarburants, appelés aussi agrocarburants, sont des carburants issus de la biomasse destinés au moteur thermique pouvant se substituer partiellement ou totalement aux carburants pétroliers. On distingue actuellement deux filières principales à partir des végétaux supérieurs terrestres :

- La filière biodiesel, à partir d'huiles végétales (colza, palme, tournesol...), de déchets (huiles alimentaires usagées, graisses animales), comprenant à la fois les esters méthyliques (filière majoritaire) et huiles hydrogénées
- La filière éthanol à partir de la fermentation de sucres de betterave ou de canne, de l'amidon de blé ou de maïs ou encore à partir de végétaux complets...

L'analyse bibliographique comporte trois parties. La première présente le bioéthanol carburant, ses avantages et inconvénients, un résumé de sa production à partir des différentes matières premières ainsi que les impacts sur le milieu rural et l'environnement. La seconde partie décrit de manière détaillée la production de bioéthanol à partir de substrat fermentescible à l'aide de *Saccharomyces cerevisiae*, qui est actuellement le micro-organisme le plus largement utilisé pour la production d'éthanol. Il sera donc exposé dans cette partie les voies métaboliques des levures appartenant à cette espèce. Enfin, la troisième partie présente les fermentations à haute densité, les défis qu'elles posent, leurs intérêts économiques et environnementaux et les améliorations possibles que peut apporter ce type fermentation.

### I.2. Le bioéthanol carburant

#### I.2.1. Présentation générale

L'éthanol, mélangé avec de la térébenthine, fut le premier carburant utilisé pour l'automobile dans le moteur à combustion interne inventé par Samuel Morey en 1826. Puis l'éthanol fut utilisé dans le premier moteur à explosion en 1876 créé par Nicholas Otto. Ce n'est qu'au début des années 1900 que l'éthanol fut remplacé par l'essence issue d'un pétrole très bon marché à cette époque et qui le resta jusqu'aux chocs pétroliers de 1973 et 1979 (Easterly et col, 2007). C'est alors que la communauté internationale s'est rendue compte de sa dépendance vis-à-vis des pays producteurs de pétrole. Des pays comme les Etats-Unis d'Amérique, la Chine, le Brésil ou encore le Zimbabwe décidèrent alors de lancer des programmes visant à la production d'éthanol et à son incorporation dans l'essence.

L'Europe a adopté en 2003 la directive européenne 2003/30/CE, visant à promouvoir l'utilisation de biocarburant, soit sous forme pure soit en mélange avec un carburant fossile. Cette directive prévoyait une incorporation des biocarburants dans les carburants consommés annuellement de 2 % (en contenu énergétique) en 2005, puis de 5 % en 2010, avec en parallèle la mise en place du SP95-E10. Cette orientation a été confirmée et élargie en 2009 par l'adoption de la directive 2009/28/CE, portant sur la promotion de l'utilisation de l'énergie produite à partir de sources renouvelables. Celle-ci

instaure notamment un objectif contraignant pour chaque Etat Membre d'une part minimum de 10 % d'énergies renouvelables dans la consommation finale d'énergie de son secteur des transports.

L'éthanol utilisé sous forme pure ou à forte teneur (ex : 85 % dans le superéthanol) impose une adaptation du moteur. Néanmoins, l'éthanol mélangé avec de l'essence peut être utilisé sans adaptation du moteur jusqu'à hauteur de 10 % (v/v) ou jusqu'à 22 % (v/v) si, avant incorporation, l'éthanol est transformé en ETBE (éthyl tertio butyl éther).

En 2010, le bioéthanol était le biocarburant le plus utilisé dans le monde il représentait alors 73% de la production de biocarburants (IFP énergies nouvelles, 2012). Il est principalement produit à partir de plantes saccharifères comme la canne à sucre ou la betterave sucrière, et amylacées comme le blé ou le maïs, comme indiqué sur la figure 1. Les deux principaux producteurs sont les Etats-Unis d'Amérique essentiellement à partir de maïs et le Brésil à partir de canne à sucre, représentant respectivement 48,0% et 19,2% sur un marché mondial de 109 562 millions de litres d'éthanol en 2011 (Renewable Fuels Association, 2011). L'Union Européenne quant à elle ne représentait que 4,0% de la production cette même année.

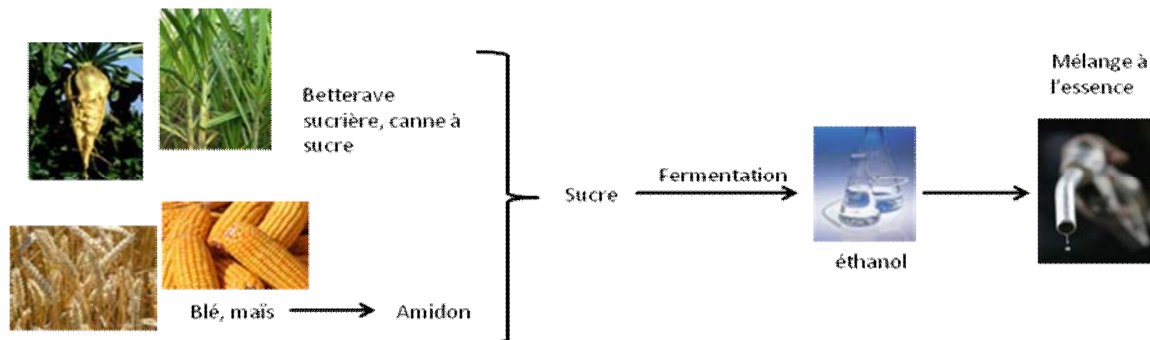


Figure 1: Le bioéthanol de la production à l'utilisation

### I.2.2. Avantages et inconvénients du bioéthanol

Le bioéthanol présente de nombreuses dualités comme résumé, de manière non exhaustive dans le tableau 1. Sa formule chimique étant  $C_2H_5OH$ , il est qualifié de carburant oxygéné.

Un litre d'éthanol contient environ les deux tiers de l'énergie contenue dans un litre d'essence. Cependant, l'éthanol ayant un fort indice d'octane, il peut améliorer, dans le cas d'un mélange, les performances de l'essence en diminuant les problèmes de combustion à hauts régimes (Easterly et col, 2007).

L'oxygène contenu dans l'éthanol améliore la combustion du carburant, en diminuant la production de monoxyde de carbone, les quantités d'hydrocarbures non brûlés qui participent à la formation de l'ozone dans les couches inférieures de l'atmosphère et les particules émises responsables de nombreux troubles respiratoires et du noircissement des bâtiments. De plus, il contient des quantités infimes de soufre par rapport aux carburants fossiles. Donc sa combustion ne produit qu'une infime quantité d'oxyde de soufre. Ces derniers sont à l'origine des pluies acides. Néanmoins, la combustion de l'éthanol peut provoquer la formation d'oxyde d'azote (NOx) formant alors de l'ozone dans les couches inférieures de l'atmosphère.

Le bioéthanol étant produit à partir de la biomasse créée par photosynthèse, l'hypothèse est faite que le dioxyde de carbone créé pendant la combustion est celui qui avait été précédemment fixé par la plante, d'où le bilan nul sur l'étape combustion du véhicule dans le moteur pour le biocarburant. Cependant le bilan GES global sur l'ensemble du cycle de vie du biocarburant n'est pas nul car les procédés de production, de transformation ou de transport sont aussi à prendre en compte. Il ne s'agit donc que d'une réduction des émissions de GES par rapport à l'essence.

L'éthanol étant un solvant hygroscopique, il pose aussi le problème de la corrosion de certaines pièces métalliques et la dégradation de certains caoutchoucs ou plastiques. Cela nécessite donc une adaptation des matériaux utilisés pour la construction du circuit d'alimentation en essence des véhicules utilisant l'éthanol pur ou le superéthanol. L'éthanol étant aussi miscible à l'eau, il peut se produire une séparation de phase dans les mélanges essence-éthanol.



D'autres avantages d'ordre plus économique et stratégique, sont la contribution à la diminution de la dépendance aux pays producteurs de pétrole ou encore la stimulation agricole en créant des débouchés diversifiés pour les produits agricoles.

**Tableau 1: Comparaison des avantages et inconvénients de l'utilisation du bioéthanol en tant que carburant (Didderen et col, 2008 ; Oestling , 2001).**

Avantages	Inconvénients
Diminution des émissions de dioxyde de carbone et meilleur rendement énergétique des moteurs à explosion	Les véhicules utilisant l'E85 produisent des émissions plus élevées d'oxyde d'azote, d'éthylène et d'acétaldéhyde que les véhicules à essence
Indice d'octane* élevé permettant une meilleure efficacité des moteurs à explosions	Indice de cétane** faible ne permettant pas son utilisation dans les moteurs à combustion interne sans l'ajout d'un accélérateur d'ignition
Diminution des émissions de particules, de soufre, de benzène et de butadiène 1-3	Augmentation des émissions d'hydrocarbures par évaporation nécessitant un réglage de la pression de vapeur du carburant
Risque moins élevé de formation d'ozone que l'essence et le diesel	Emission d'acide acétique en cas de réaction entre le catalyseur et le carburant résiduel à l'échappement
Biodégradable	Corrosion des pièces en contact avec l'éthanol
Utilisation flexible de 0 à 100%	Problèmes de stabilité de phase dans le mélange d'essence en cas de présence d'eau (démiscibilité).
Capacité énergétique inférieure à celle de l'essence (21285 kJ.kg <sup>-1</sup> pour l'éthanol contre 32020 kJ.kg <sup>-1</sup> pour l'essence)	Augmentation de la consommation volumique de carburant
Diminution de la dépendance au pays producteurs de pétrole	Prix encore élevé
Stimulation du milieu rural	Concurrence entre alimentation et énergie

\*L'indice d'octane exprime les caractéristiques antidétonantes d'un carburant. Il correspond au pourcentage d'iso-octane contenu dans un mélange d'iso-octane et d'heptane normal qui lorsqu'il est utilisé pour alimenter un moteur CFR (Cooperative Fuel Research) fonctionnant dans des conditions normalisées, provoque la même intensité de détonation que l'essence testée.

\*\* L'indice de cétane correspond à la capacité qu'a un carburant à s'enflammer. Il est particulièrement important pour les moteurs diesel où le carburant doit s'auto-enflammer sous l'effet de la compression. Un indice de cétane élevé facilite donc l'auto-combustion d'un carburant.

Comme il est possible de le voir dans le tableau 1, un certain nombre d'inconvénients sont associés à l'utilisation du bioéthanol. Mais les industriels mettent en avant les contributions positives de ce carburant sur la qualité de l'air, la diversification de l'approvisionnement énergétique et le développement de l'économie rurale. Même s'il est vrai que l'éthanol est encore un carburant coûteux à produire, des incitations fiscales existent et les procédés sont encore améliorables. De plus, afin de diminuer les coûts de production du bioéthanol, la valorisation des différents coproduits est recherchée. Le bioéthanol pourrait donc apporter sa contribution à la diversification énergétique dans le secteur des transports tout en permettant la diminution des émissions de gaz à effet de serre, en l'absence d'effets liés à des changements d'affectation des sols.

### **I.2.3. La production d'éthanol**

Contrairement au pétrole, l'éthanol n'est pas une ressource minière, mais tout comme lui il est issu de la dégradation de végétaux. Cependant, l'éthanol possède l'avantage d'être un carburant renouvelable à une échelle de temps humaine alors que le pétrole ne l'est qu'à une échelle de temps géologique. En effet, les sucres contenus dans les plantes peuvent être transformés par des micro-organismes en différents composés comme l'acide lactique, le dioxyde de carbone ou encore de l'éthanol... Aujourd'hui le micro-organisme le plus utilisé est *Saccharomyces cerevisiae*, à la fois pour ses performances fermentaires mais aussi pour sa valorisation en tant que coproduit. Ici il sera uniquement présenté la production d'éthanol du point de vue des matières premières, des procédés de production (en résumé) et des volumes d'éthanol produits. Le détail de l'étape de fermentation alcoolique est décrit partie I.3. La production de bioéthanol par voie fermentaire.

#### **I.2.3.1. Les procédés de production**

Actuellement, la production industrielle de bioéthanol de 1<sup>ère</sup> génération est effectuée à partir de produits agricoles riches en amidon ou en saccharose qui sont facilement fermentescibles. Ces sucres servent de réserve d'énergie pour les végétaux et sont à ce titre stockés dans des tissus spécifiques à chaque plante. Deux voies sont donc distinguées : une utilisant les plantes saccharifères et une autre basée sur les plantes amylacées.

##### **I.2.3.1.a. A partir de plantes saccharifères**

La canne à sucre, avec son utilisation massive au Brésil, est la plante saccharifère la plus utilisée au niveau mondial pour la production de bioéthanol. En 2010, l'éthanol de canne à sucre représentait un tiers de la production d'éthanol au niveau mondial (France Agrimer, 2011). Mais elle ne pousse qu'en milieu tropical. La betterave sucrière est beaucoup mieux adaptée à l'Europe et à son climat tempéré. Il existe aussi une troisième plante utilisée à moindre échelle, le sorgho sucrier. Il provient d'Afrique, mais est adaptable au climat tempéré et présente l'avantage d'avoir des besoins réduits en eau pour se développer. Les plantes saccharifères ont l'inconvénient d'être riches en eau et ne peuvent donc pas être stockées dans le temps pour une utilisation ultérieure. En effet leurs teneurs en sucre diminuent rapidement après arrachage ou coupage.

La production d'éthanol à partir de betterave sucrière débute, comme pour la production de sucre, avec le lavage des racines, leur découpage en cossettes et l'extraction des sucres à l'eau chaude qui est appelé diffusion. Pour ce qui est de la canne à sucre, la première étape est la coupe, suivie du broyage des cannes puis enfin leur pressage. Par la suite les différences entre la canne à sucre et la betterave sucrière dépendent essentiellement des unités de production. La figure 2 illustre le procédé de production d'éthanol à partir de betterave sucrière. Cette figure montre que la fermentation n'est qu'une des nombreuses étapes. Les pulpes et la vinasse, produites durant le procédé peuvent être valorisées en aliment pour animaux ou par méthanisation.

Les jus d'extraction appelés jus verts peuvent être utilisés directement pour la fermentation par *Saccharomyces cerevisiae* durant la campagne sucrière. Cette levure a la capacité d'hydrolyser le saccharose et ainsi de libérer les deux sucres simples dont il est composé, qui sont le glucose et le fructose. Ces sucres simples sont fermentescibles. Une autre caractéristique de ce micro-organisme est sa faculté de croître en aérobiose comme en anaérobiose. Il s'agira ensuite de distiller le vin obtenu pour récupérer l'éthanol.

Les jus clairs, sirops et mélasse sont issus respectivement des étapes de clarification, évaporation et cristallisation (cf. figure 2). Le tableau 2 présente les compositions moyennes de ces différents jus. La phase de clarification est effectuée par chaulage. Le jus chaulé sera ensuite carbonaté puis subira un second chaulage et une seconde carbonatation. Sous l'action de la chaux, les acides minéraux et un certain nombre de matières organiques, comme les pectines et les protéines, sont transformés en sels insolubles. Il se forme un précipité qui entraîne les impuretés en se déposant. Le chaulage entraîne l'élimination presque totale du fer. Le fer peut catalyser des réactions d'oxydations entraînant la formation de couleur et mener à la formation de sucres blanc-grisâtre (Arzate, 2005), il est donc indésirable pour la production de sucre. La fraction liquide, appelée jus clair, est alors récupérée.

Le sirop correspond au jus clair concentré par évaporation de l'eau. Le saccharose représente alors plus de 90 % de la matière sèche totale. Le passage de sirop à mélasse consiste en une cristallisation du sucre, ce sont donc les autres constituants qui sont concentrés et le sucre lui est en partie éliminé.

Le but de cette opération est de former la masse-cuite (sucre refroidi) par cristallisation du sucre contenu dans le sirop. L'introduction de très fins cristaux dans le sirop amorce la cristallisation du sucre, qui se propage spontanément. L'essorage permettra de séparer d'une part le sucre cristallisé et la mélasse.

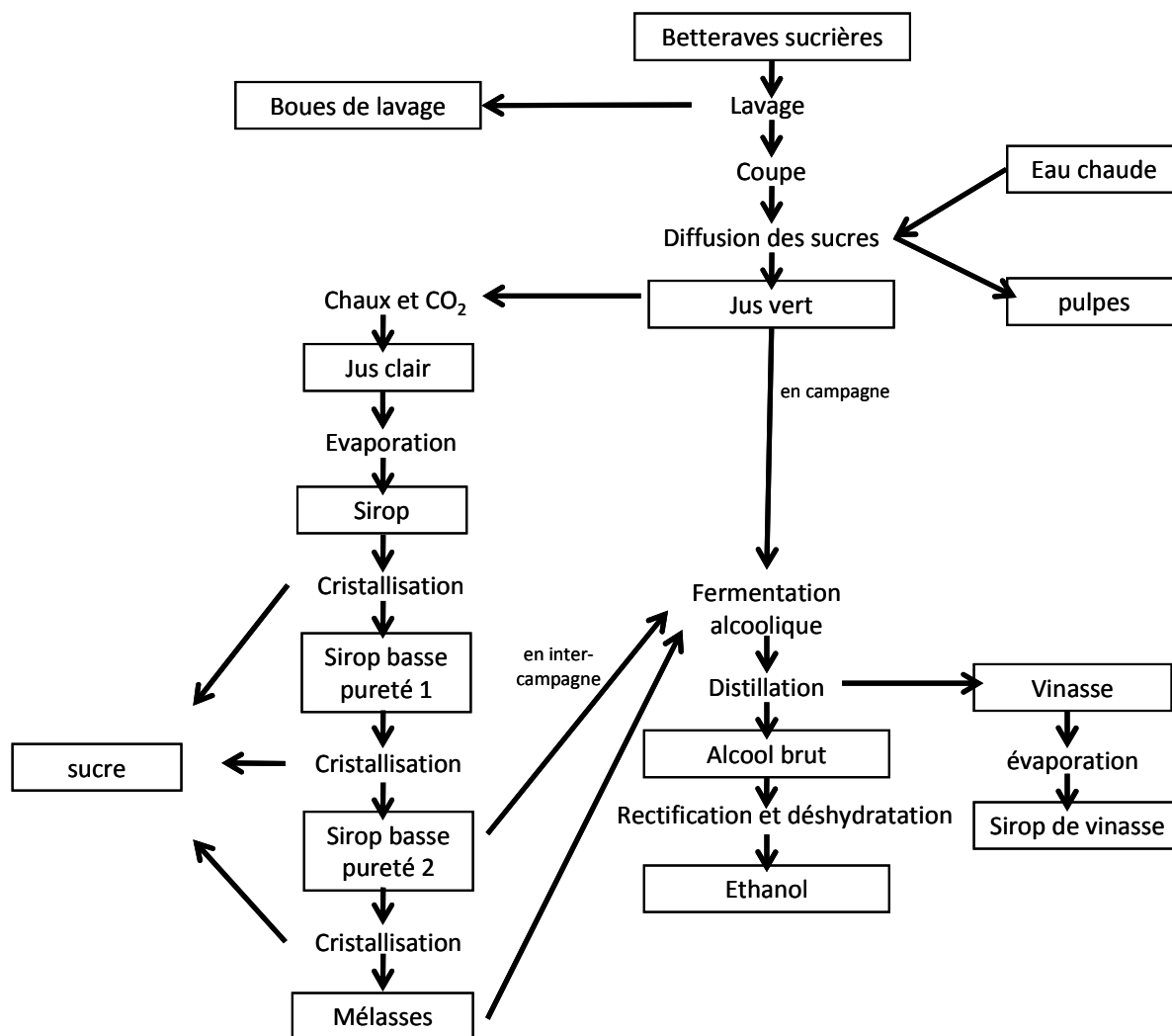


Figure 2: Schéma de production de bioéthanol à partir de betteraves sucrières

Les valeurs présentées tableau 2 ne sont que des moyennes observées car la composition des différents jus peut fortement varier selon les procédés utilisés, selon les variétés de betteraves sucrières utilisées ou encore selon les sols cultivés.

**Tableau 2: Composition des différents jus formés lors de la production de sucre de betterave (Ranković et col., 2009)**

	Jus de diffusion	Jus clair	Sirop	Mélasses
Matière sèche (% m/m)	14,70	14,50	58,80	80,80
Saccharose (% m/m)	12,85	13,13	53,00	49,20
Azote total (% m/m)	0,13	0,13	0,14	1,82
Substances réductrices (% m/m)	0,07	0,01	0,47	0,86
Cendres (% m/m)	0,28	0,34	1,85	9,86
pH	6,30	9,25	7,27	6,98

Les jus posent un problème de taille puisque ils ne peuvent pas être stockés car ils sont fermentescibles et donc susceptibles d'être dégradés. Le stockage ne peut se faire qu'avec des produits à forte pression osmotique comme les sirops ou les mélasses afin de limiter les risques de contamination, ce qui permet de produire de l'éthanol tout au long de l'année.

#### **I.2.3.1.b. A partir de plantes amylacées**

Le maïs est la plante la plus utilisée pour la production d'éthanol aux Etats-Unis d'Amérique (Renewable Fuels Association, 2008). Cependant, cette plante, grande consommatrice en eau, est bien moins adaptée aux étés généralement secs de l'Europe. Néanmoins d'autres plantes sont utilisables comme le blé et l'orge (moins gourmande en eau en été), la pomme de terre ou encore le manioc, ce dernier étant particulièrement bien adapté au climat tropical. Les réserves d'amidon dans les céréales s'effectuent dans leurs graines. Celles-ci étant pauvres en eau, elles peuvent être stockées et utilisées ultérieurement. Ce n'est pas le cas pour la pomme de terre ou le manioc qui sont riches en eau et doivent donc être transformés rapidement après récolte.

A l'instar des jus de betterave, la composition des jus sucrés à partir d'amidon peut varier selon les procédés utilisés, selon les variétés de plantes utilisées ou encore selon les sols. Cependant dans ce cas l'influence de la technique utilisée pour obtenir les jus sucrés est encore plus importante. En effet, l'amidon contenu dans les plantes n'est ni fermentescible ni accessible directement, il doit donc être transformé en glucose. Il existe alors deux types de procédés, le premier est la voie sèche ou « dry milling » et le second est la voie humide ou « wet milling ». Le procédé « dry milling » permet l'obtention d'un jus à la composition très proche de celle du grain de blé, présentée tableau 3, à la différence que l'amidon est transformé en glucose. Ce procédé consiste en un prétraitement enzymatique permettant de dégrader l'amidon pour produire du glucose qui lui pourra être fermenté par la levure. Le procédé « wet milling » provoque des réactions secondaires dues à l'action de l'acide utilisé durant l'étape de trempage (Sanchez et Cardona, 2008). De plus, durant ce procédé des composés de la plante sont extraits. La composition des jus sucrés utilisant le « wet milling » est donc très variable.

**Tableau 3: Composition moyenne du blé tendre en pourcentage sur matière totale (Das Neves et col, 2006)**

	Blé tendre % m/m
Humidité	13,1
Amidon	62,0
Protéine	10,4
Fibre	0,2
Cendres	0,6

Dans le cas du « dry milling », illustré figure 3, les grains sont nettoyés et broyés. L'amidon est hydrolysé en deux étapes par voie enzymatique. La première étape, réalisée à l'aide d'une  $\alpha$ -amylase est appelée liquéfaction. La seconde étape est appelée saccharification et utilise une amyloglucosidase. Ceci aboutit à la formation d'un sirop de glucose. Ce sirop sera alors utilisé pour produire de l'éthanol par fermentation. Les drèches et les vinasses seront valorisées en alimentation animale. Les étapes de saccharification et de fermentation peuvent être associées afin de diminuer la durée du procédé. Ceci permet de libérer le glucose au rythme souhaité dans le milieu par la régulation de l'activité amylytique.

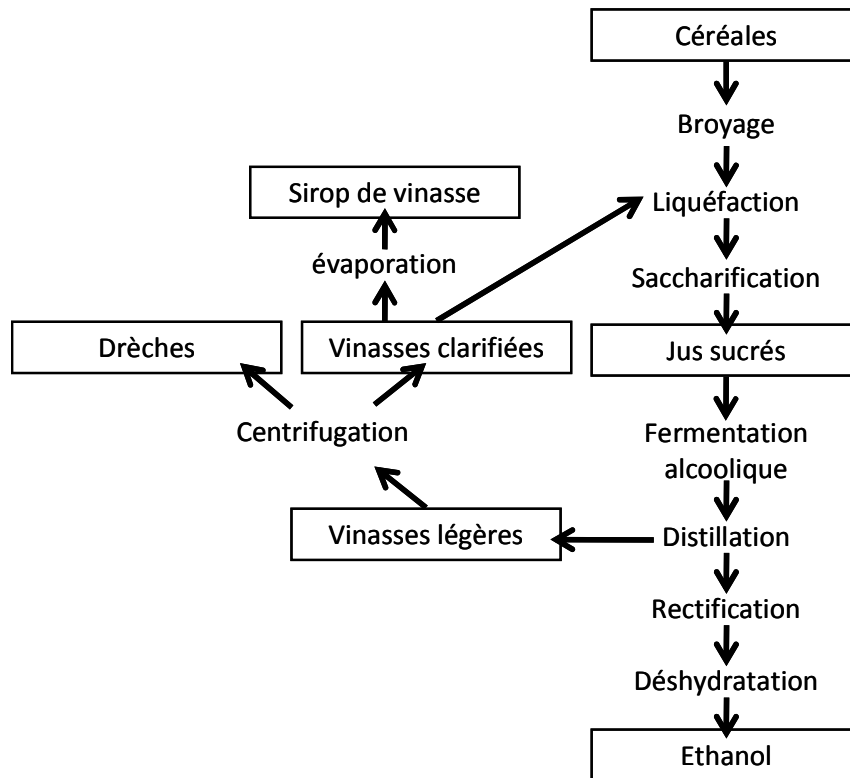


Figure 3: Schéma de transformation des céréales en éthanol par voie "dry milling"

Pour ce qui est de la voie humide, ou « wet milling », illustrée figure 4, les grains sont trempés dans une solution aqueuse contenant de l'acide sulfurique qui facilite la séparation des composants. Un broyage est ensuite réalisé afin de séparer les composants. Ceci permet de séparer l'amidon du reste de la plante et de générer de nombreux coproduits comme des huiles ou du gluten servant pour l'alimentation humaine ou animale. L'amidon ainsi obtenu est ensuite liquéfié et saccharifié par voie enzymatique.

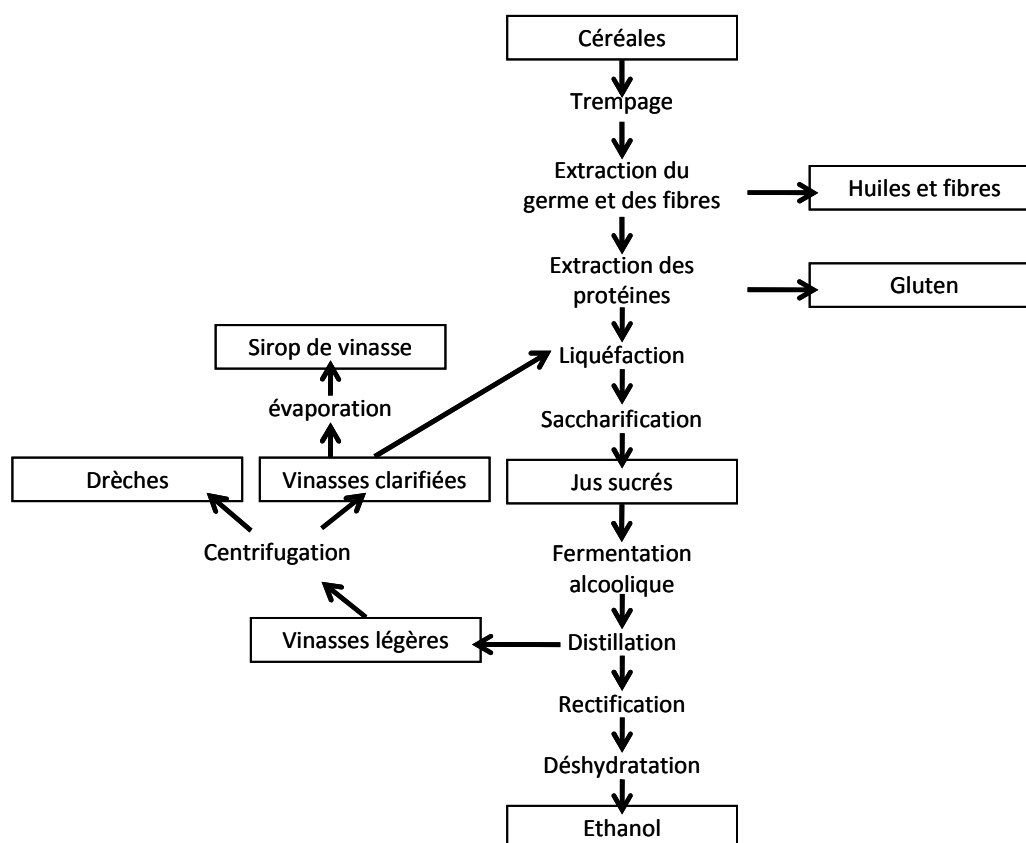


Figure 4: Schéma de transformation des céréales en éthanol par la voie "wet milling"

#### I.2.3.1.c. A partir de matières premières lignocellulosiques

L'éthanol peut aussi être produit à partir de matière lignocellulosique, comme le bois, la paille, les herbacées..., il est alors dit biocarburant de 2<sup>nd</sup>e génération. Contrairement à l'amidon ou au saccharose qui servent de réserves d'énergie pour la plante en vue d'une utilisation ultérieure, la matière lignocellulosique sert de structure pour les plantes. Il s'agit donc d'une matière stable et résistante aux agents extérieurs et donc plus difficile à dégrader. Elle est composée principalement de lignines qui sont des composés polyphénoliques inutilisables par la levure, de cellulose et d'hémicelluloses qui sont des composés polysidiques. Comme pour l'amidon, la cellulose et les hémicelluloses doivent être hydrolysées avant utilisation par la levure car elle n'a pas le pool enzymatique nécessaire pour cela. Les procédés d'hydrolyse ressemblent à ceux employés pour l'amidon, ils emploient soit un traitement acide soit un traitement enzymatique. Le premier est certes peu cher mais il produit des inhibiteurs de fermentation et a un faible rendement d'hydrolyse. Le traitement enzymatique à l'inverse, est onéreux à cause du coût de l'enzyme mais il est performant et ne produit pas d'inhibiteurs (Tahezadeh et Karimi, 2007). Cependant, le développement des technologies portant sur la production de carburant 2<sup>nd</sup>e génération tendent diminuer le coût de l'hydrolyse enzymatique.

La production d'éthanol cellulosique fait actuellement l'objet de nombreuses recherches. Elle reste une voie d'avenir due à la disponibilité de la matière première ainsi que la possibilité de fermenter l'ensemble de la plante simultanément.

#### I.2.3.1.d. Représentation mondiale des matières premières utilisées pour la production d'éthanol

Selon les régions du monde l'éthanol est produit à partir de différentes matières premières comme le montre le tableau 4. Ceci s'explique à la fois par les climats rencontrés dans chaque pays mais aussi par les spécificités historiques des pays comme pour la betterave en France. Les Etats-Unis

produisent essentiellement leur éthanol à partir de céréales et le Brésil à partir de canne à sucre. Dans l'union européenne les matières premières sont plus diversifiées puisque l'éthanol est produit à partir de céréales, de betterave sucrière ainsi que de substrats viniques. Comme le montre le tableau 4, la production mondiale d'éthanol est réalisée pour plus de 60 % avec des céréales et pour un tiers avec la canne à sucre. La betterave sucrière est donc une spécificité européenne.

**Tableau 4 : Répartition de la production d'éthanol en 2010 en fonction du substrat utilisé. Les valeurs sont indiquées en milliards de m<sup>3</sup> (France Agrimer, 2011). Le terme « Autres » regroupe une grande diversité de matières premières comme les substrats viniques, le manioc ou encore le sorgho.**

	Céréales	Betteraves	Canne	Autres
Brésil			28,0	
Canada	1,5			
Chine	6,3			0,7
Colombie			0,3	
Inde			1,9	
Pakistan			0,2	
Thaïlande			0,8	
UE	3,4	1,5		0,4
USA	51,8			
Autres			3,1	3,1
Total	63,0	1,4	34,3	4,2
Part	61,2 %	1,4 %	33,3 %	4,1 %

Cependant, quelque soit la matière première utilisée, les vins obtenus en fin de fermentation contiennent toujours plus de 80 % (v/v) d'eau ce qui rend leur utilisation directe comme carburant impossible. C'est pourquoi une étape de séparation de l'éthanol est indispensable.

#### **I.2.3.2. La distillation**

L'éthanol utilisé comme carburant doit être pur et anhydre s'il est mélangé à l'essence, ou contenir moins de 5 % (v/v) d'eau s'il est utilisé seul pour la carburation. Les différents procédés de fermentations présentés ci-avant permettent l'obtention de vins contenant entre 10 et 12 % d'éthanol dans le cas des plantes saccharifères et jusqu'à 18 % pour les plantes amylacées, il est donc nécessaire de séparer l'éthanol de l'eau contenue dans les vins. Le principe de la distillation est de récupérer des vapeurs plus riches en constituants les plus volatils du mélange de départ. Le mélange de départ n'est pas un binaire eau-éthanol, même s'il représente l'essentiel, mais un mélange complexe où viennent s'ajouter des produits secondaires issus eux aussi de la fermentation comme des aldéhydes, des esters, du méthanol ou encore des alcools dits supérieurs possédant plus de deux carbones. La présence de ces produits secondaires est réglementée, pour l'alcool carburant, par la norme NF EN 15376 comme illustré tableau 5.

**Tableau 5: Exigences sur la qualité de l'éthanol carburant destiné au mélange avec l'essence (AFNOR, 2008)**

Propriétés	Unités	Limites		Méthode d'essai
		Minimum	Maximum	
Teneur en éthanol + alcools supérieurs saturés	% (m.m <sup>-1</sup> )	98,7		CE/2870/2000 - Méthode I, Annexe II, Méthode B
Teneur en mono-alcools supérieurs saturés (C3-C5)	% (m.m <sup>-1</sup> )		2,0	CE/2870/2000 - Méthode III
Teneur en méthanol	% (m.m <sup>-1</sup> )		1,0	CE/2870/2000 - Méthode III
Teneur en eau	% (m.m <sup>-1</sup> )		0,300	EN 15489
Teneur en chlorures minéraux	mg.L <sup>-1</sup>		20,0	EN 15484 ou EN 15492
Teneur en cuivre	mg.kg <sup>-1</sup>		0,100	EN 15488
Acidité totale (exprimée en teneur en acide acétique)	% (m.m <sup>-1</sup> )		0,007	EN 15491
Apparence		Clair et limpide		Inspection visuelle
Teneur en phosphore	mg.L <sup>-1</sup>		0,50	EN 15487
Teneur en produits non volatils	mg.100mL <sup>-1</sup>		10	CE/2870/2000 - Méthode II
Teneur en soufre	mg.kg <sup>-1</sup>		10,0	EN 15485 ou EN 15486

Il est à noter que la commission de normalisation qui a abouti à cette réglementation était composée de représentants des constructeurs automobiles, de la marine nationale et à plus de 60% de groupes pétroliers et de raffinage. Si l'on comprend l'intérêt des constructeurs automobiles pour cette réglementation, il est néanmoins plus difficile de comprendre la présence majoritaire des groupes pétroliers, même s'ils distribuent les carburants, et l'exclusion des producteurs d'alcool pour la décision d'une telle norme.

Cependant, l'alcool carburant doit respecter cette norme. Les distillats, appelés bruts, obtenus par cette distillation contiennent généralement des quantités d'eau, de produits secondaires et d'ions indésirables, supérieures à la réglementation. Il est donc nécessaire de purifier l'alcool

### I.2.3.3. L'obtention d'éthanol pur

Pour obtenir de l'éthanol pur, dit absolu, deux étapes sont nécessaires après la distillation. La première étape a pour but de purifier l'alcool contenu dans les bruts en éliminant les impuretés. Ce procédé consiste en une succession de distillations à des températures allant de 85 à 102°C. La première partie de ce procédé est destinée à extraire les produits de tête (aldéhydes, acétate d'éthyle...). La seconde partie, est destinée à concentrer l'alcool et à éliminer les impuretés de queue (alcools supérieurs). Enfin la dernière partie élimine le méthanol contenu dans l'alcool. L'alcool ainsi produit peut alors directement servir de carburant. Mais si celui-ci doit être mélangé à l'essence il est nécessaire d'ajouter une étape de déshydratation pour obtenir l'alcool anhydre.

La seconde étape pour l'obtention de l'éthanol pur consiste à éliminer l'eau résiduelle. En effet, par distillation, une fois arrivé à la proportion de 96 % (v/v) d'éthanol pour 4 % (v/v) d'eau, le gaz issu de l'ébullition a lui aussi une composition de 96 % (v/v) d'éthanol pour 4 % (v/v) d'eau. Par conséquent, la distillation n'a plus aucun effet. Ceci correspond au point azéotropique. La solution utilisée en industrie pour pallier ce problème est l'utilisation de tamis moléculaire permettant de séparer l'éthanol de l'eau en fonction de la différence de taille existant entre ces deux molécules.



#### **I.2.3.4. Utilisation en tant que carburant**

##### **I.2.3.4.a. L'éthanol utilisé directement**

L'éthanol peut être utilisé directement en tant que carburant. Il s'agit de la voie la plus directe et la plus écologique car il n'est ni transformé ni mélangé à des produits pétroliers. Cependant l'éthanol pur pose des problèmes de démarrage à froid et de lubrification. Cela nécessite donc des adaptations des moteurs. Néanmoins, les capacités d'un moteur utilisant l'éthanol sont bien supérieures à celles d'un moteur essence car la puissance est augmentée à tous les régimes, la diminution de la consommation en décélération est plus efficace, l'efficacité thermique du carburant est meilleure et le couple moteur est augmenté (Nag, 2008).

##### **I.2.3.4.b. L'éthanol mélangé à l'essence**

Dans la plupart des pays l'éthanol a été introduit sur le marché directement mélangé avec l'essence. Pour ce faire les raffineurs de pétrole ont dû modifier leur essence de base afin d'en diminuer la pression de vapeur afin de garder les mêmes propriétés du carburant (Easterly et col, 2007). En effet l'ajout d'éthanol dans l'essence augmente cette pression de vapeur.

La plupart des constructeurs automobiles garantissent que leurs voitures peuvent utiliser un mélange essence-éthanol contenant jusqu'à 10 % d'éthanol (E10) sans dommage. Cependant, l'Union Européenne n'autorise que 5 % d'éthanol s'il n'y a pas d'avertissement auprès du consommateur, afin de prévenir tout risque sur le parc automobile. L'E10, quant à lui, peut être commercialisé s'il est clairement affiché qu'il contient 10 % d'éthanol. Le Brésil autorise la distribution d'essence mélangée avec jusqu'à 25 % d'éthanol.

Afin d'augmenter les proportions d'éthanol dans le mélange, les véhicules flex-fuel ont été créés. Ils permettent l'utilisation d'une gamme de mélange de carburant contenant de 0 à 85 % d'éthanol. Les autres véhicules peuvent aussi utiliser des carburants contenant jusqu'à 85 % d'éthanol mais cela nécessite des modifications d'injection. Cependant en Juillet 2012 il y avait en France moins de 350 points de distributions ouverts d'E85 contre environ 7000 pour le SP95 (source <http://www.prix-carburants.economie.gouv.fr>).

Pour effectuer les mélanges essence-éthanol, l'éthanol doit être anhydre afin de limiter les phénomènes de séparation de phases. Ce qui impose aux distilleries une étape supplémentaire de déshydratation. Ces mélanges sont effectués avant distribution par « splash blending » et non pas en raffinerie afin d'éviter la séparation de phase.

##### **I.2.3.4.c. L'éthyl tertio butyl ether (ETBE)**

L'ETBE est un composé produit en raffinerie par réaction entre l'éthanol (47 % m/m) et l'isobutène (53 % m/m), ce dernier étant un produit de l'industrie pétrolière. L'ETBE est donc moins respectueux de l'environnement que l'éthanol pur ou en mélange. De plus cette transformation implique une filière plus longue ne favorisant ni les consommateurs ni les producteurs d'éthanol. Les seuls avantages sont d'ordre technique.

Le mélange ETBE-essence présente les avantages de limiter les séparations de phase, de ne pas être corrosif et de moins provoquer de problème de démarrage à froid lors de son utilisation dans les moteurs actuels conçus pour l'essence. L'ETBE permet, tout comme l'éthanol, un gain d'indice d'octane. Celui-ci peut être mélangé, avec l'essence, jusqu'à 22 % (J/J) (Ballerini et Alazard-Toux, 2006 ; directive 2009/28/CE).

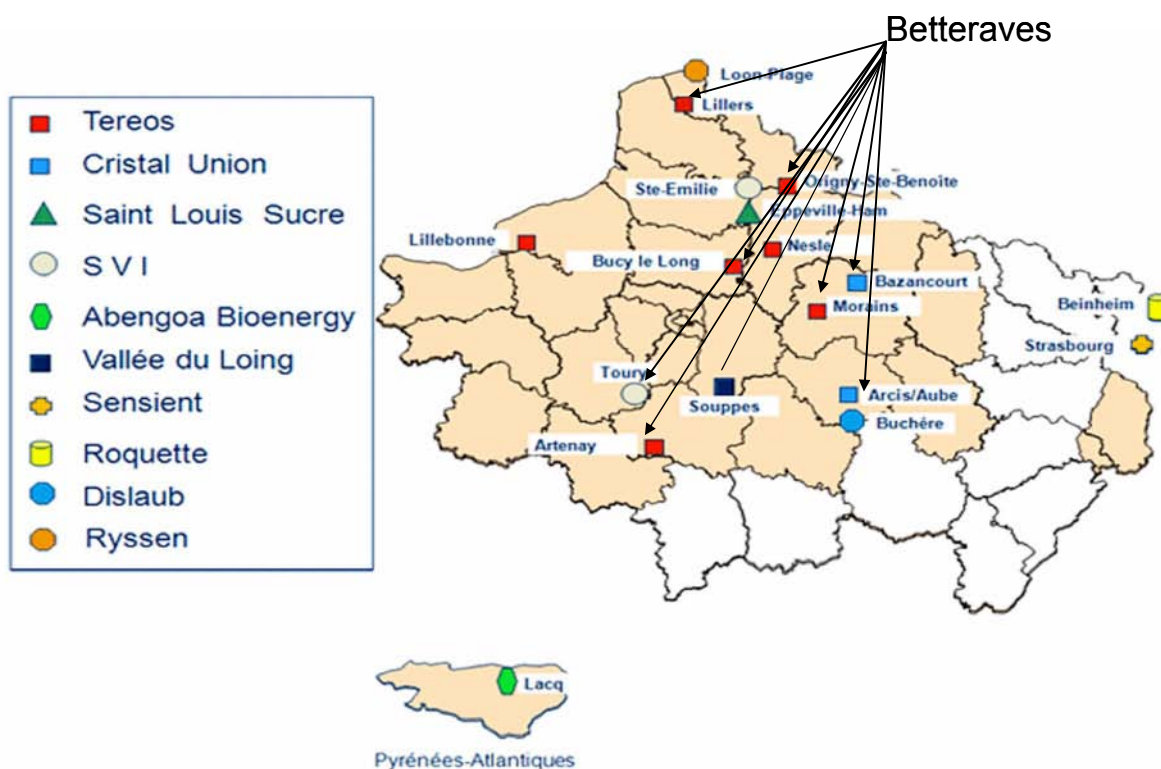
#### **I.2.3.5. La production d'éthanol en France**

La figure 5 et le tableau 6 présentent l'ensemble des sites de production français ainsi que les matières premières qui y sont utilisées. Comme le montre la figure 5, la production de bioéthanol se fait essentiellement dans le nord de la France. Sur 18 sites de production, la moitié produit de l'éthanol à partir de betterave à sucre.

**Tableau 6: Groupes et sociétés productrices d'éthanol en France ainsi que les matières premières utilisées pour la production (source UNGDA).**

Groupes ou sociétés	Matières premières
Tereos	Betterave
Tereos-BENP	Céréales
Tereos-DVO	Céréales
Cristal Union	Betterave, céréales
Cristanol	Betterave, céréales
Roquette Frères	Céréales
Saint Louis Sucre	Betterave
Sensient Flavors	Blé
Sica Vallée du Loing	Betterave
S.V.I	Betterave
Sedalcol	Céréales
Abengoa Bioenergy France	Céréales
Ryssen Alcools	Rectificateur*
Dislaub	Rectificateur*

La dénomination « Rectificateur » indique que les groupes concernés achètent des alcools, généralement brut, les rectifient, les distillent pour répondre aux cahiers des charges de leurs clients.



**Figure 5 : Localisation de l'ensemble des sites métropolitains de production d'éthanol (source UNGDA).**

En 2010, la France était le premier producteur européen d'éthanol avec un total de 18 372 827 m<sup>3</sup> d'éthanol soit 34 % de la production européenne. La production française d'éthanol de betterave représentait cette même année 904 568 m<sup>3</sup> et celle d'éthanol de céréale 875 306 m<sup>3</sup>, soit respectivement 59 % de la production européenne d'éthanol de betterave et 25% de l'éthanol

européen de céréales. Le reste de la production en France est essentiellement représenté par l'éthanol vinique (France Agrimer, 2011).

### I.2.3.6. Evolution du marché mondial

Il y a quelques années, deux types d'éthanol existaient sur le marché, celui produit par hydratation de l'éthylène produit en raffinerie pétrolière et celui produit à partir de produits agricoles appelé bioéthanol. L'éthanol à partir du pétrole représentait 7% du marché de l'éthanol dans les années 1990. En 2006 ce même éthanol représentait moins de 4% du marché et en 2009 il n'était plus produit que par voie fermentaire. Ceci peut s'expliquer par deux choses ; l'augmentation du prix du pétrole depuis les années 2000, et donc celui de l'éthylène, et la baisse du prix de l'éthanol. L'éthanol a différents débouchés, l'alcool de bouche, l'alcool industriel et l'éthanol carburant. L'évolution de la production d'éthanol pour l'industrie ou pour la consommation humaine a été relativement stable de 2001 à 2010 passant de 12 000 000 m<sup>3</sup> à 15 000 000 m<sup>3</sup>. L'augmentation de la production est essentiellement liée à l'utilisation de l'éthanol en tant que carburant. En effet, la part de l'éthanol carburant sur le marché de l'éthanol est passée de 2001 à 2010 de 58 à 80 % (France Agrimer, 2011).

L'augmentation de la production d'éthanol carburant, présentée figure 6, est devenue presque exponentielle depuis 2000. Cette tendance devrait être conservée au moins jusqu'en 2015 suite à (Nag, 2008) :

- l'augmentation du prix du pétrole et à son instabilité
- l'augmentation des demandes énergétiques des pays émergents
- la diminution des réserves de pétrole
- l'intérêt environnemental de l'utilisation d'éthanol carburant
- l'instabilité politique des régions productrices de pétrole

La production d'éthanol ne devrait cependant que peu augmenter pour cette année 2012. En effet, suite à une forte sécheresse sur le continent nord américain et donc de faibles récoltes, la FAO a demandée aux Etats-Unis de limiter la production d'éthanol pour réorienter une partie du maïs vers le marché de l'alimentaire.

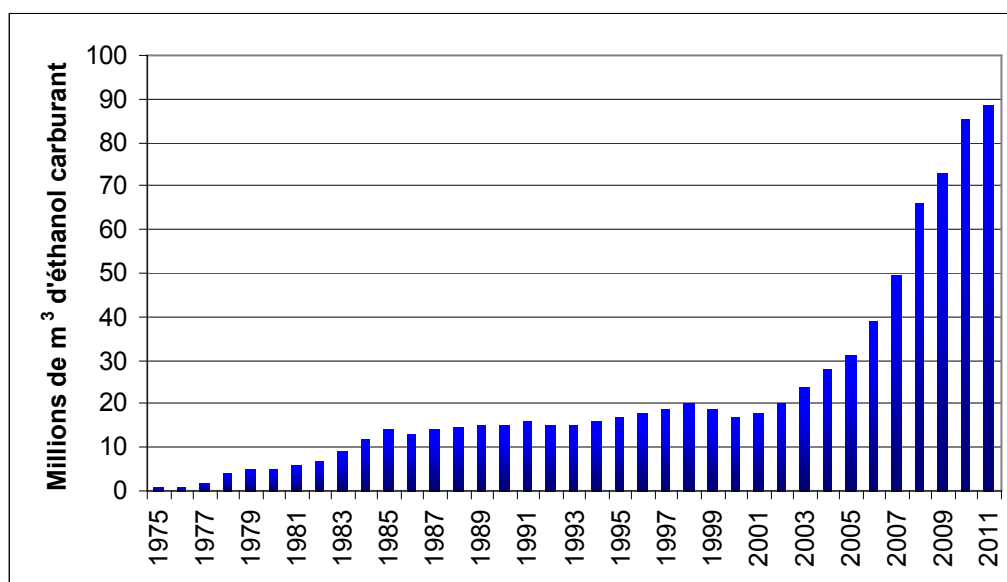


Figure 6: Evolution de la production mondiale d'éthanol carburant. (Renewable Fuels Association, 2009 ; France Agrimer, 2011)

Au vu de cette envolée de la production d'éthanol et donc de sa consommation, il est légitime de s'interroger sur l'effet sur l'environnement que peut avoir l'utilisation massive de ce carburant.

#### **1.2.4. Impact de l'utilisation du bioéthanol comme carburant sur l'environnement**

L'évaluation de l'impact du bioéthanol sur l'environnement est une chose complexe. Il ne s'agit pas d'uniquement prendre en compte la combustion du carburant mais l'ensemble de la filière « du champ à la roue ». Il est donc nécessaire de prendre en compte à la fois les pratiques agricoles, la production du carburant ainsi que son utilisation. Comme le montre l'étude DEPD-ADEME, 2010, la prise en compte de toutes ces étapes rend difficile l'analyse et peut entraîner de fortes variations selon les hypothèses utilisées, l'année et lieu pris en compte. De plus, dans certains cas, comme pour l'eutrophisation ou la toxicité humaine, le devenir exact des composés est complexe à modéliser, l'analyse en devient peu robuste. La partie exposée ci-après présente donc des résultats qui peuvent varier en fonction des hypothèses d'analyses choisies.

##### **1.2.4.1. Bilan énergétique**

Le bilan énergétique est le gain énergétique d'un carburant par rapport à la quantité d'énergie fossile nécessaire à sa production. Afin de calculer ce bilan, il est nécessaire de prendre en compte l'énergie contenue dans le produit final, l'énergie utilisée pour produire l'éthanol ou l'essence et l'énergie consommée indirectement (transport des matières premières, distribution...).

Les critères étudiés, pour le calcul de ce bilan, font qu'un résultat n'est applicable qu'à un moment précis pour une unité de production donnée. En effet, que ce soit en distillerie ou en raffinerie, les matières brutes utilisées ne sont pas identiques tout au long de l'année. De plus, pour les distilleries le bilan énergétique dépend aussi des rendements agricoles obtenus et des procédés utilisés. Ceci fait que certaines études s'opposent sur les résultats de ce bilan énergétique (Shapouri et col., 1995).

Les valeurs ne peuvent donc être données qu'à titre indicatif. Avec la prise en compte des coproduits, les valeurs globales déterminées dans le cadre de l'étude DEPD-ADEME, 2010 pour les carburants consommés en France sont:

- Pour l'essence, un bilan énergétique de 1,22, c'est-à-dire que pour 1 MJ produit 1,22 MJ ont été consommés
- Pour l'éthanol de blé, un bilan énergétique de 0,62 soit 49 % d'économie d'énergie par rapport au carburant fossile. Pour l'éthanol de betterave 0,59 soit 52 % d'économie.

Ce bilan est souvent soumis à controverses, car si les coproduits ne sont pas inclus dans les calculs (affectation des impacts à la fois au biocarburant et aux coproduits selon un prorata énergétique, massique, économique,...), le bilan énergétique peut être beaucoup moins favorable. De plus le choix des unités pour exprimer ce bilan peut influencer sur les résultats. Selon le consortium JRC/EUCAR/CONCAWE, l'essence consomme 255 MJ d'énergie fossile par kilomètre parcouru contre 224 MJ pour l'éthanol de blé et 206 MJ pour l'éthanol de betterave. Ce qui correspond à une économie de 12 et 19 % respectivement par rapport au carburant fossile (Ballerini et Alazard-Toux, 2006).

##### **1.2.4.2. Pollution de l'air**

La combustion de l'éthanol engendre l'émission de formaldéhyde et d'acétaldéhyde. Ces aldéhydes sont irritants et cancérigènes. Ils peuvent également réagir dans l'atmosphère pour former de l'ozone, de l'acide acétique, de l'acide formique ou de l'eau oxygénée. La combustion de l'éthanol produit plus d'émission de NOx que l'essence. Pour l'E10 l'augmentation est de 5% de NOx émis par rapport à l'essence (Health Effect Institute, 1996).

Face à cela, l'utilisation de l'éthanol comme carburant permet de diminuer les émissions de composés carbonés cancérigènes produits pendant la combustion de l'essence. L'utilisation de l'E10, par rapport à l'essence, permet la diminution de 5% des émissions d'hydrocarbures, de 13% celles de monoxyde de carbone, de 12% celles de benzène, de 6% celles de 1-3 butadiène, l'éthanol est aussi moins

réactif dans l'atmosphère que l'essence (Gaffney et Marley, 2009). Tous ces pourcentages augmentent en fonction de la proportion d'éthanol utilisée dans le mélange. L'éthanol n'est donc pas un carburant sans impact sur la qualité de l'air, mais ce carburant est nettement moins nocif que l'essence comme le présente l'étude de la DEPD-ADEME de 2010.

### I.2.4.3. Emission de gaz à effet de serre

Les émissions de gaz à effet de serre (GES) sont calculées en prenant en compte toutes les émissions de GES du berceau à la tombe d'un produit. Dans le cas des biocarburants, le calcul est réalisé de la production des matières premières jusqu'à la combustion en passant par la transformation et le transport. Les GES, comme CH<sub>4</sub> ou N<sub>2</sub>O, sont exprimés en équivalent-CO<sub>2</sub>, en utilisant comme coefficients de pondération leur Potentiel de Réchauffement Global.

A l'instar du bilan énergétique, le calcul de ce bilan n'est applicable qu'à un moment précis pour une unité de production donnée. Le tableau 7 présente une fourchette de valeurs obtenues. Ce tableau montre que de grandes variabilités existent pour l'utilisation de la même matière première. Ceci peut être expliqué en partie par la variabilité des sols, des pratiques culturales, les procédés de transformation utilisés ainsi que par les variétés de betteraves et autres plantes cultivées (Mehdikhani et col., 2011) et également la méthode d'allocation des impacts (étude DEPD-ADEME, 2010).

**Tableau 7: Bilan des émissions de gaz à effets de serre incluant l'utilisation des coproduits. Bilan par rapport à l'essence (Réseau Action Climat-France, 2006 ; Cherubini et col. 2009 ; DEPD-ADEME, 2010).**

Carburant	Emission de GES (gCO <sub>2</sub> équivalent.MJ <sup>-1</sup> )		Différentiel d'émission de GES (%)	
	maximum	minimum	maximum	minimum
Essence	90	87	0	0
Ethanol canne à sucre (Brésil)	48	25	-45	-72
Ethanol maïs (USA)	129	40	+48	-56
Ethanol blé (Europe)	144	46	+66	-49
Ethanol betterave sucrière (Europe)	74	30	-15	-66

Comme le tableau 7 le montre, la diminution des émissions de GES avec l'utilisation du bioéthanol est discutable. Cela s'explique par la consommation de ressources fossiles pour la production d'engrais chimiques, l'utilisation de ces engrais produisant des émissions de N<sub>2</sub>O, l'utilisation de carburant non-renouvelable pour la récolte, la distribution et la distillation. L'amélioration de ces points pourrait permettre d'amener les émissions de GES proche de 0 (Easterly et col., 2007). Ceci souligne l'importance de chaque intervenant dans la filière bioéthanol.

### I.2.4.4. Besoin en terres agricoles

L'impact de la production de bioéthanol, sur les besoins de terres agricoles, dépend des politiques menées. En 2006, l'utilisation de la totalité du maïs produit aux Etats-Unis d'Amérique ne permettait de couvrir que 12% de leur consommation en essence (Morrison, 2006). Il est donc impossible de remplacer toute l'essence consommée actuellement par de l'éthanol. Mais plusieurs solutions existent : les économies d'énergie sur la consommation de carburants, l'intensification des cultures ou encore la création de nouvelles terres agricoles. Mais certaines de ces solutions ne sont pas sans risques et dépendent des pratiques agricoles menées.

Dans certains pays, l'implantation intensive de culture de canne à sucre pour la production de bioéthanol a nécessité l'élimination de forêts et par conséquent a détruit des écosystèmes bien particuliers, a appauvri les sols et augmenté leur érosion (Powlson et col., 2005). De plus, la mise en culture de forêts pour la production de bioéthanol engendre la libération dans l'atmosphère de grande

quantité de dioxyde de carbone contenue dans les plantes et dans les sols. Ce critère n'est jamais pris en compte à part entière dans les analyses de cycle de vie du bioéthanol, or il pourrait avoir un impact significatif sur le bilan environnemental du bioéthanol provenant de certains pays pratiquant massivement le défrichage.

#### **I.2.4.5. Impact sur l'agriculture**

##### **I.2.4.5.a. Un autre débouché pour les produits agricoles**

Lorsque l'on voit une telle augmentation des volumes de bioéthanol produit, il est légitime de se demander l'impact que cela peut avoir sur les matières premières. Les principales craintes portent sur l'utilisation de matières premières comestibles pour la production de carburant. En effet, l'augmentation de la demande et les spéculations boursières font augmenter les prix, par exemple la production de biodiesel en Europe a fait augmenter les prix du colza et la production de bioéthanol au Brésil a fait augmenter le prix du sucre.

Cependant, il faut noter que des prix plus élevés ne sont pas nécessairement néfastes pour les producteurs des pays pauvres. Les pays du Sud, possèdent les proportions les plus importantes d'agriculteurs. Ceux-ci, pourraient donc être mieux payés pour leur production, permettant de développer ainsi l'agriculture et alors l'autosuffisance alimentaire. Mais le plus important est, la possibilité d'écouler les surproductions des pays du nord dans d'autres filières que l'alimentation. En effet, ces surproductions engendrent des prix bas et des manœuvres de « dumping » des états pour écouler leurs productions sur les marchés internationaux (Easterly et col., 2007), défavorisant l'agriculture locale des pays pauvres et augmentant le déficit de leur balance économique ainsi que leur dépendance vis-à-vis des pays riches.

##### **I.2.4.5.b. La stimulation du milieu rural**

L'augmentation de la demande de matières premières agricoles crée l'augmentation de la production et de facto l'augmentation du nombre d'emplois dans le secteur primaire. La transformation des produits agricoles en éthanol, produit aussi de l'emploi, dans le secteur secondaire mais aussi dans le secteur tertiaire comme la recherche et la distribution. La production d'éthanol s'effectuant à proximité des lieux de production de matières premières, c'est donc tout le milieu rural qui est susceptible de bénéficier des retombées de la production de biocarburants comme le bioéthanol. En France, par exemple, la production d'éthanol permet de garantir un revenu aux agriculteurs tout en maintenant des emplois industriels dans le secteur agro-alimentaire.

Dans les pays en voie de développement, les bioénergies peuvent être une source à la fois de revenus et d'énergie pour les populations si elles sont produites et aussi utilisées localement. Dans les pays développés, les bioénergies peuvent permettre de résoudre en partie les problèmes d'émission de gaz à effet de serre, de dépendance énergétique et de crise agricole. Il a été montré que dans l'Union Européenne, la création d'emploi grâce aux bioénergies, ne se cantonne pas seulement aux acteurs directs de la filière énergie mais s'étend à toute une région (Domac et col, 2005).

Cette approche macroscopique concernant la production et l'utilisation du bioéthanol a permis de mettre en avant le bioéthanol en tant que carburant. Cependant, cette première partie n'explique pas comment la levure produit l'éthanol. C'est pourquoi, la partie suivante décrit la production de bioéthanol à partir de substrat fermentescible à l'aide de *Saccharomyces cerevisiae*, qui est actuellement le micro-organisme le plus largement utilisé pour la production d'éthanol.

### **I.3. La production de bioéthanol par voie fermentaire**

#### **I.3.1. Présentation générale**

Les espèces microbiennes actuellement utilisées au niveau industriel pour la production d'éthanol sont *Saccharomyces cerevisiae* et *Zymomonas mobilis* (Didderen et col., 2008). Cette dernière donne un meilleur rendement en éthanol et a une meilleure productivité parce que moins de biomasse est produite et le métabolisme est plus intensif. Cependant, *Zymomonas mobilis* est plus sensible à la contamination des milieux (Schmid, 2005), et la biomasse produite n'est pas utilisable en alimentation animale (Bai et col., 2008 (a)). Pour ces raisons, le micro-organisme le plus utilisé dans l'industrie et en particulier dans la fabrication d'éthanol est aujourd'hui *Saccharomyces cerevisiae*.

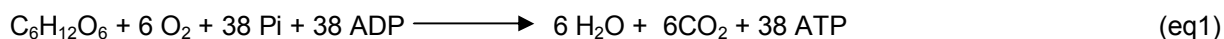
Cette levure est utilisée depuis plus de 8000 ans pour produire de la bière en Egypte. Aujourd'hui elle est utilisée dans les agro-industries pour la fabrication de produits panifiés, de boissons alcoolisées, de produits lactés ou encore d'éthanol carburant. La valorisation de la biomasse produite pendant la fermentation est une véritable plus-value car elle peut être valorisée dans l'alimentation animale mais aussi humaine en tant que complément alimentaire ou de probiotique (Pennacchia et col., 2008).

*Saccharomyces cerevisiae* possède un métabolisme très particulier. En effet, généralement les levures ont en présence d'oxygène un métabolisme oxydatif et en absence d'oxygène un métabolisme fermentaire. Cependant, cette levure cultivée en présence de concentrations élevées en glucose possède un métabolisme oxydo-réductif et ce quelque soit la quantité d'oxygène dans le milieu. Ce changement métabolique est appelé effet Crabtree.

### **I.3.2. Voies métaboliques de *Saccharomyces cerevisiae***

#### **I.3.2.1. Métabolisme oxydatif**

Le métabolisme oxydatif du glucose et du fructose aboutit à l'oxydation complète des ces substrats carbonés pour former de l'énergie. Ce métabolisme contient trois étapes principales qui sont, la glycolyse, le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative. Le bilan de l'oxydation totale du glucose est :



Glucose + Oxygène + Phosphate inorganique+ Adénosine diphosphate  $\longrightarrow$  Eau + dioxyde de carbone + énergie

Le nombre d'ATP est de 38, s'il est considéré que la totalité des coenzymes d'oxydoréduction sert à produire de l'ATP au cours de la phosphorylation oxydative.

#### **I.3.2.1.a. La glycolyse**

La première phase de la dégradation du substrat chez la levure *Saccharomyces* est la glycolyse, aussi appelée voie d'Embden-Meyerhof, illustrée figure 7. L'hydrolyse de l'amidon aboutit à la formation de glucose et l'hydrolyse du saccharose à la formation de glucose et de fructose. La première étape est le transport du glucose, et/ou du fructose, du milieu extérieur au milieu intérieur. Le fructose rejoint la glycolyse après avoir été phosphorylé en fructose 6 phosphate. La transformation du glucose ou du fructose par la glycolyse produit 2 pyruvates et a un bilan net de 2 ATP (adénosine triphosphate) et de 2 NADH+H<sup>+</sup> (Nicotinamide adénine dinucléotide). Ces NADH+H<sup>+</sup> seront réoxydées au niveau de la chaîne de transporteurs d'électrons ce qui permettra à la cellule la production d'énergie sous forme de gradient membranaire de protons pouvant être utilisés pour le transport membranaire ou la production d'ATP (Campbell et Reece, 2004).

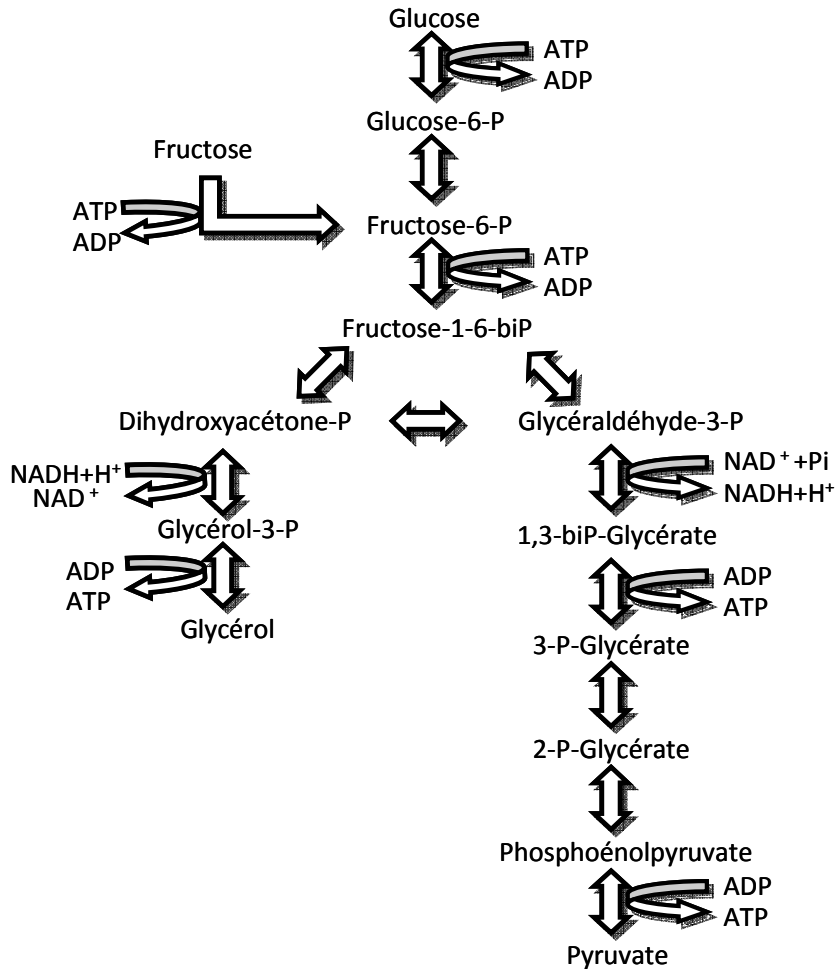


Figure 7: La glycolyse (Dickinson et Schweizer, 1999)

### I.3.2.1.b. Le nœud métabolique du pyruvate

Après la glycolyse le pyruvate peut être orienté, comme illustré figure 8, soit vers le cycle de l'acide citrique soit vers la production d'éthanol. Lorsque le pyruvate est présent en grande quantité dans la cellule, suite à une activité glycolytique intense, il est orienté vers la production d'éthanol.

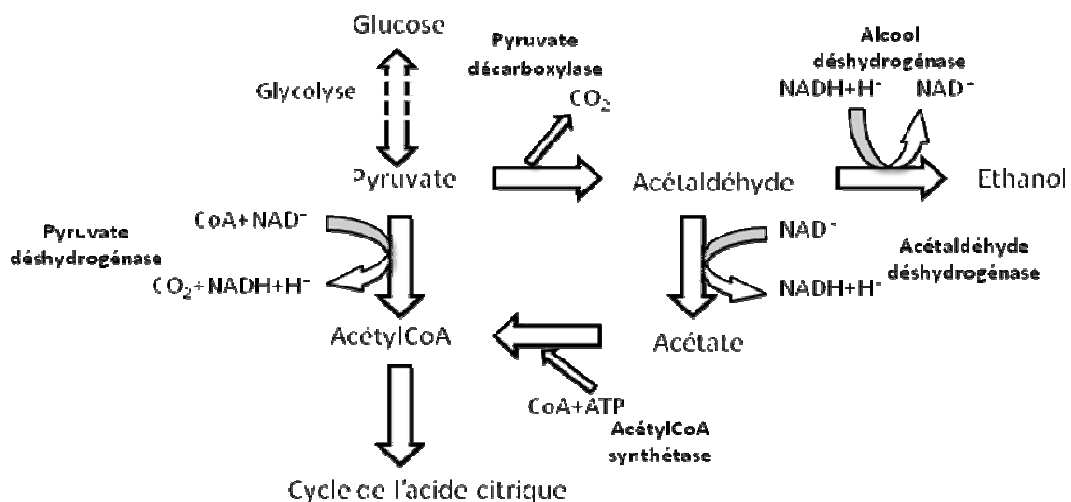


Figure 8: Nœud métabolique du pyruvate



### I.3.2.1.c. Le cycle de l'acide citrique

Le cycle de l'acide citrique, aussi appelé cycle de Krebs, consiste en une succession de réactions d'oxydations et de décarboxylations, illustrées figure 9. Cela permet la réduction de FAD (flavine adénine dinucléotide) en  $FADH_2$  et de  $NAD^+$  (nicotinamide adénine dinucléotide) en  $NADH+H^+$  ainsi que la production d'un GTP (guanosine triphosphate) qui sera convertie en ATP (adénosine triphosphate). L'ATP est une molécule utilisée chez tous les organismes vivants pour fournir de l'énergie aux réactions chimiques. Le FAD et le  $NAD^+$  sont des coenzymes d'oxydo-réduction. Ceux-ci peuvent être soit utilisés par la cellule pour accomplir des réactions rédox ou peuvent, sous leurs formes réduites, donner leurs électrons à des protéines membranaires. Chaque cycle produit un  $FADH_2$  et trois  $NADH+H^+$ ; une fois réoxydés grâce à la chaîne de transporteur d'électrons ils peuvent produire jusqu'à 11ATP. Les réactions du cycle de Krebs sont effectuées, chez les eucaryotes comme les levures, par les mitochondries.

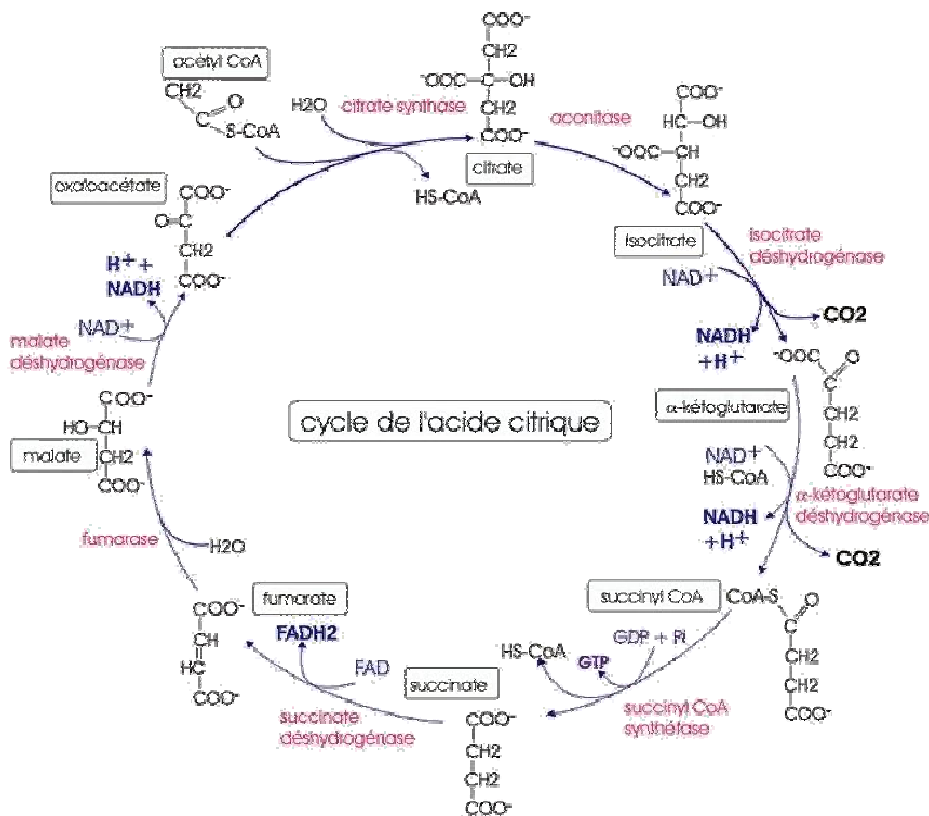


Figure 9: Le cycle de l'acide citrique (Dickinson et Schweizer, 1999). Pi correspond à du phosphate inorganique en solution.

### I.3.2.1.d. La phosphorylation oxydative

Le  $NADH+H^+$  et  $FADH_2$ , produits au cours des étapes précédentes, sont des molécules riches en énergie car elles possèdent une paire d'électrons ayant un haut potentiel de transfert. La phosphorylation oxydative désigne le processus par lequel l'ATP est formé lorsque des électrons sont transférés du  $NADH+H^+$  ou du  $FADH_2$  à l'oxygène qui est pour *Saccharomyces cerevisiae* l'accepteur final d'électron par une série de transporteur d'électrons. Chez les eucaryotes, comme les levures, la chaîne de transport d'électrons est localisée dans la membrane interne des mitochondries. L'oxydation du  $NADH+H^+$  donne 3 ATP et celle du  $FADH_2$  donne 2 ATP.

Les chaînes respiratoires contiennent de nombreux transporteurs d'électrons comme les cytochromes. Le transfert d'électrons conduit à un transfert de protons à l'extérieur de la matrice mitochondriale. Une force protomotrice est générée consistant en un gradient de pH et un potentiel électrique transmembranaire. L'ATP est synthétisé quand les protons reviennent dans la matrice mitochondriale à travers l'ATP synthase. L'oxydation et la phosphorylation sont donc couplées par un gradient de protons établi à travers la membrane mitochondriale interne.

### I.3.2.1.e. La voie des pentoses phosphates

Le glucose 6-phosphate est à la fois le substrat de la glycolyse et celui de la voie des pentoses phosphates, illustrée figure 10. Le choix entre ces deux voies dépend des exigences cellulaires ponctuelles en énergie métabolique (ATP), en précurseurs biosynthétiques et en potentiel redox. En effet, la voie des pentoses phosphates sert à la production de NADPH qui est indispensable aux réactions d'oxydoréduction des levures (Cipollina et col., 2009). Alors que la glycolyse est ralentie lorsque la charge énergétique est élevée, la glucose 6-phosphate déshydrogénase (et donc la voie des pentoses phosphates) est inhibée par des concentrations élevées de NADPH et par les intermédiaires de la biosynthèse des acides gras. Ceci permet un maintien de l'équilibre entre l'énergie et le pouvoir réducteur contenu dans la cellule.

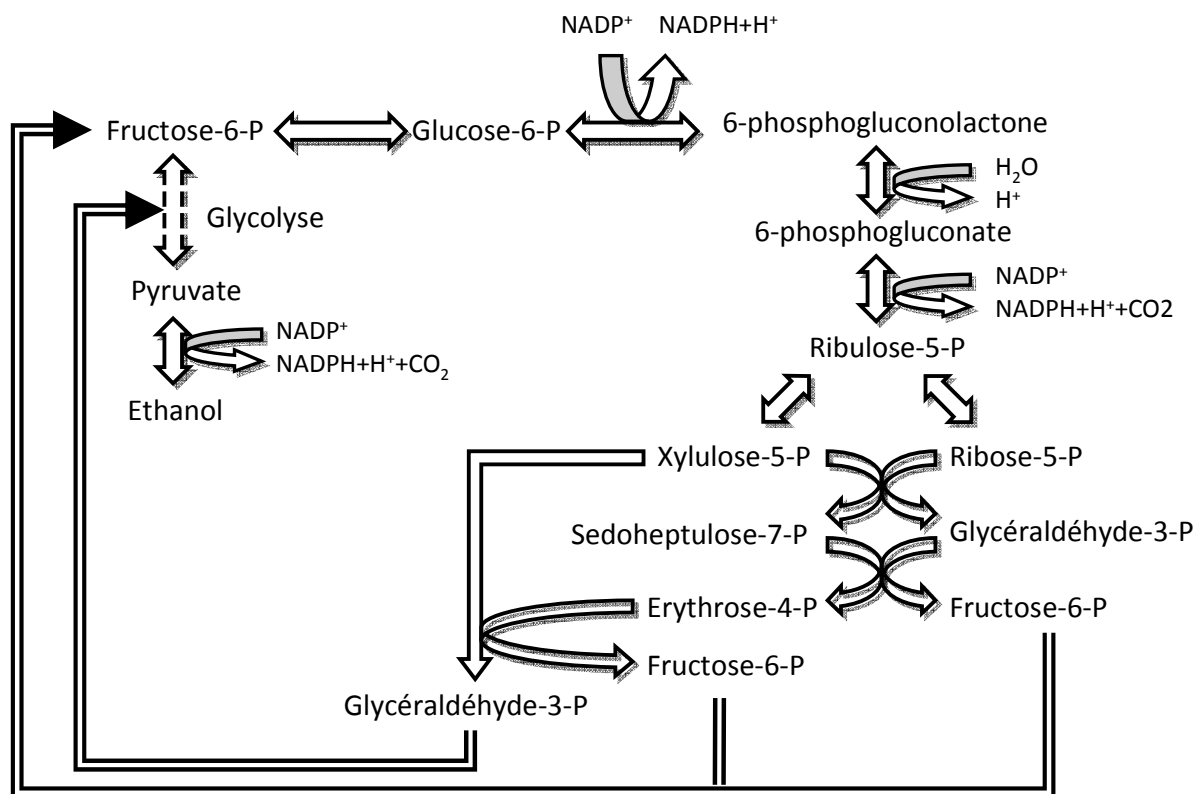


Figure 10: Voie des pentoses phosphates

### I.3.2.2. Le métabolisme fermentaire

La fermentation est une réaction biochimique, à localisation cytoplasmique, permettant la libération de l'énergie contenue dans un substrat organique par l'action d'enzymes microbiennes et qui aboutit à l'oxydation incomplète du substrat. Cette réaction ne fait pas intervenir la chaîne de transporteurs d'électrons. Elle se distingue de la respiration par son faible rendement énergétique et la diversité des produits d'oxydation.

#### I.3.2.2.a. La fermentation anaérobie

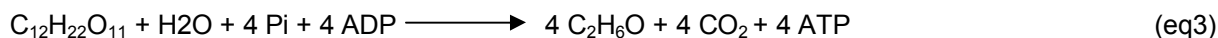
En anaérobiose, *Saccharomyces cerevisiae* est privée de son accepteur final d'électron qui est l'oxygène. Les coenzymes d'oxydoréduction, comme le  $NADH+H^+$ , ne peuvent donc plus être réoxydés. La cellule doit donc utiliser un autre accepteur final d'électron qu'elle doit fabriquer à partir de son substrat. Pour *Saccharomyces cerevisiae* il s'agit principalement de l'acétaldéhyde. La réduction de l'acétaldéhyde en éthanol permet ainsi de maintenir l'équilibre redox en réoxydant le  $NADH+H^+$  produit au cours de la glycolyse.

L'équation bilan de la réaction de fermentation du glucose par *Saccharomyces cerevisiae* est :



Glucose + Phosphate inorganique + Adénosine diphosphate  $\longrightarrow$  Ethanol + Dioxyde de carbone + énergie

Le rendement énergétique maximal (en énergie disponible pour la cellule) de cette réaction est inférieur de 19 fois à celui de l'oxydation complète du glucose par le métabolisme oxydatif. Le rendement théorique limite de conversion du glucose en éthanol est donc de 0,511 gramme d'éthanol par gramme de glucose. Pour le saccharose, ce rendement est de 0,538 comme le montre l'équation 3 :



Saccharose + Eau + Phosphate inorganique + Adénosine diphosphate  $\longrightarrow$  Ethanol + Dioxyde de carbone + énergie

Cependant l'utilisation du substrat est un phénomène plus complexe car elle contribue à trois fonctions dont les proportions varient en fonctions de nombreux paramètres (cf. partie I.3.3 Effets des paramètres physico-chimiques sur la fermentation alcoolique) :

- La formation de biomasse
- La formation de produits. L'éthanol n'est pas le seul produit de fermentation, on trouve, entre autres, l'acétate, le succinate, les alcools supérieurs et le glycérol
- La maintenance, c'est-à-dire la part du métabolisme destiné au simple maintien en vie des cellules (métabolisme basal)

Tout ceci fait qu'en pratique on ne peut pas dépasser 90 à 95% du rendement théorique en éthanol. La formation du glycérol pendant la glycolyse permet de réoxyder le  $\text{NADH}+\text{H}^+$ . Cependant la formation de glycérol ne permet pas la production d'ATP mais juste de compenser les deux ATP utilisés pour former le glucose-6-phosphate et le fructose-1-6-biphosphates (figure 7).

#### I.3.2.2.b. L'effet Crabtree

L'effet Crabtree décrit les phénomènes par lesquels un micro-organisme produit de l'éthanol en aérobiose lorsque le milieu présente une forte concentration en substrat. Plusieurs hypothèses sur l'origine de cet effet existent.

Ce shift métabolique pourrait être dû aux caractéristiques de la pyruvate décarboxylase (PDC) et de la pyruvate déshydrogénase (PDH). En effet, la PDH a une affinité plus forte que la PDC pour le pyruvate, néanmoins la vitesse spécifique de la PDH est inférieure à celle de la PDC. Quand le flux glycolytique dépasse une valeur critique, la PDC est saturée et l'acétaldéhyde est formé (Lei et col., 2001).

Il pourrait y avoir répression de la respiration par la fermentation en présence de concentrations en oxygène non-limitantes. Cette répression se fait à des concentrations en substrat différentes selon le micro-organisme, par exemple 0,1 à 1  $\text{g.L}^{-1}$  de glucose suffit à *Saccharomyces cerevisiae* pour que la répression de la respiration apparaisse et ainsi qu'il y ait production d'éthanol (Ratledge, 1991). Au niveau du nœud métabolique du pyruvate, figure 8, le flux de pyruvate issu de la glycolyse est donc orienté vers la production d'acétaldéhyde et d'éthanol et non plus vers le cycle de Krebs.

Enfin, le passage du métabolisme respiratoire au métabolisme fermentaire pourrait être dû à la limitation des capacités respiratoires des cellules. Pour *Saccharomyces cerevisiae*, le taux de consommation maximum en oxygène est de 5,5  $\text{mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Cette limitation provoquerait, dans un milieu riche en substrat carboné, une augmentation de la concentration en pyruvate qui serait alors utilisé par la voie de la PDC (Petrik et col., 1983)

#### I.3.2.2.c. La production d'alcools supérieurs

Lors de la fermentation alcoolique des alcools à plus longues chaînes carbonées sont produits. Les principaux étant le n-propanol, l'alcool amylique, l'alcool isoamylique et le 2-phenylethanol. Deux voies métaboliques amènent à la formation de ces alcools supérieurs, la voie catabolique et l'anabolique.

La voie catabolique, aussi appelée réaction d'Ehrlich, consiste en une transamination des acides aminés produisant alors un acide  $\alpha$ -cétonique, suivie d'une décarboxylation formant un aldéhyde qui sera alors réduit par le  $\text{NADH}+\text{H}^+$  pour aboutir à la formation d'un alcool comme illustré figure 11. Cette voie n'est possible que lorsqu'il y a suffisamment d'acides aminés intracellulaires.

La voie anabolique utilise les mêmes voies métaboliques que pour la synthèse des acides aminés à partir du glucose. Mais les intermédiaires réactionnels que sont les acides α-cétoniques sont décarboxylés pour former des aldéhydes puis réduits en alcools, comme présenté figure 11.

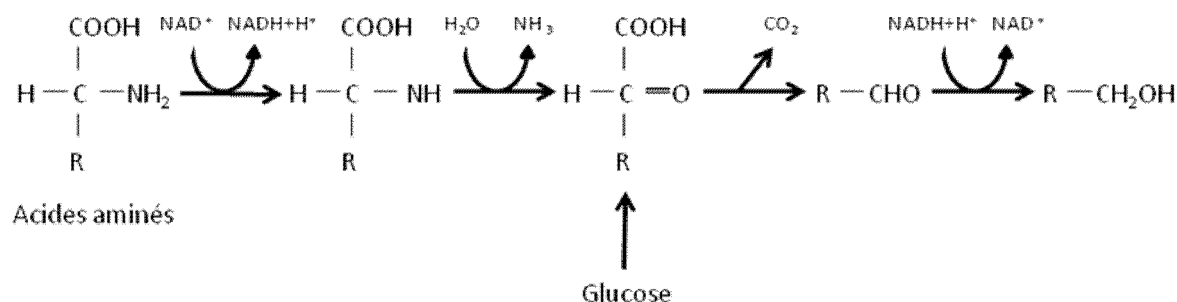


Figure 11: Production des alcools supérieurs (Walker, 1999)

La contribution de la voie catabolique dépend de la quantité d'acides aminés présents mais aussi de la nature de ces derniers (Watson, 1976). La voie anabolique, quant à elle, est favorisée lorsque le milieu contient peu d'azote ou lorsque la source principale d'azote est l'ammonium ou l'urée (Jacques et col., 2003). Néanmoins d'autres paramètres influencent la production d'alcools supérieurs comme la nature du substrat carboné, la température de fermentation, le pH, l'aération ou encore la souche utilisée (Letourneau, 1986).

### I.3.3. Effet des paramètres physico-chimiques sur la fermentation alcoolique

Le métabolisme présenté précédemment correspond aux réactions principales intervenant dans la production d'éthanol. Cependant, la levure a besoin de plus que d'un substrat énergétique carboné pour l'ensemble de son métabolisme. Elle requiert par exemple de l'azote, pour ses protéines, des ions pour ses enzymes ou encore des conditions de pH et de température lui permettant de vivre. C'est pour cela que cette partie présente les paramètres pouvant influencer sur *Saccharomyces cerevisiae* et donc la production d'éthanol.

#### I.3.3.1. La composition du milieu

La fermentation alcoolique se découpe généralement en deux phases. La première correspond à la croissance de la biomasse couplée à une production d'éthanol. La seconde, durant laquelle la croissance est nulle, sert uniquement à la production de l'éthanol. La phase de propagation, aussi appelée pré-culture ou pied de cuve, s'effectue dans des milieux permettant un développement rapide et optimal des levures. L'objectif des pré-cultures est de produire de la biomasse le plus vite possible. Par contre, pour la phase de production le substrat carboné prend toute son importance puisqu'il doit permettre la production d'éthanol mais aussi être le moins cher possible. Il s'agit donc de faire un compromis entre coût du milieu et productivité.

Les besoins nutritifs de la levure ne se limitent pas à une source carbonée, mais comprennent aussi une source d'azote, de phosphore, de soufre, illustrés tableau 8, de sels minéraux, illustrés tableau 9 et de vitamines. Ceci permet d'assurer la synthèse des composants cellulaires, mais aussi le fonctionnement des enzymes et donc d'influencer la productivité de la levure ainsi que sa tolérance au stress dû à l'éthanol ou au substrat (Alfenore et col., 2002 ; Dragone et col., 2004).

Les milieux utilisés pour la production de bioéthanol sont des milieux complexes. Leurs avantages sont leurs faibles coûts et leurs capacités à apporter un mélange comprenant des acides aminés, des vitamines et des sels mais en faible quantité. Outre les considérations de coût des substrats il est important de considérer leurs disponibilités, la constance de leurs qualités, leurs stabilités au stockage ou encore leurs caractéristiques rhéologiques. Tous ces critères font que chaque fermentation à partir de produits agricoles est unique.

**Tableau 8: Composition approximative de *Saccharomyces cerevisiae* en macroéléments (Ingledew, 1999)**

	Oses	Protéines	Cendres	Acides nucléiques	Lipides	Azote	Phosphore	Soufre
<b>Composition cellulaire (g.kg<sup>-1</sup> levure sèche)</b>	180-440	380-590	45-75	52-95	40-50	30-90	10-19	3-9

**Tableau 9: Composition approximative de *Saccharomyces cerevisiae* en ions métalliques, besoins et limites dans le milieu (Ingledew, 1999)(Heggart et col., 1999)(Jones et Greenfield, 1984)**

	Composition cellulaire (g.kg <sup>-1</sup> levure sèche)	Besoin dans le milieu (mg.L <sup>-1</sup> )	Concentration inhibitrice dans le milieu (mg.L <sup>-1</sup> )
<b>Potassium</b>	20-21	80 - 7900	390
<b>Magnésium</b>	1,3-1,65	39 -144	24000
<b>Calcium</b>	0,6-0,75	180 -1500	1000
<b>Sodium</b>	0,12-0,3		
<b>Zinc</b>	0,17-0,2	0,3 - 3	65
<b>Fer</b>	0,02-0,03	0,001- 0,8	840
<b>Manganèse</b>	0,008	0,06 - 0,12	55
<b>Cuivre</b>	0,008	0,1 - 0,6	0,6

Tous les ions métalliques présents dans le tableau 9 sont indispensables pour une croissance optimale de la levure. Cependant la présence en excès de ces ions peut entraîner des diminutions de rendements, de viabilité ou encore limiter la croissance de la levure. Le sodium n'a pas de rôle métabolique apparent pour la levure mais celui-ci a un impact sur la pression osmotique et sur le gradient électrochimique (Heggart et col., 1999), sa présence doit donc être limitée.

Il est possible d'observer des variations importantes, voir contradictoires, des concentrations requises et inhibitrices selon les auteurs. En effet, ces concentrations dépendent à la fois de la souche utilisée, des conditions opératoires (température, pH...) ainsi que de la composition du milieu. Une étude plus approfondie présentée ci-après a donc été réalisée afin de comprendre comment ces différents éléments agissent sur la fermentation.

#### **I.3.3.1.a. L'azote**

L'azote est un élément indispensable à la fabrication de nombreux composants cellulaires comme les protéines ou les acides nucléiques, d'où l'importance d'augmenter sa disponibilité dans le milieu. En effet, si les concentrations en azote assimilable deviennent trop faibles la fermentation peut s'arrêter à cause de la diminution de la viabilité cellulaire, et au contraire l'augmentation de sa disponibilité peut augmenter la productivité de la fermentation par les levures (Srichuwong et col., 2009). Il est généralement admis que la quantité d'azote dans la levure varie de 3 à 9 % du poids sec (Jacques, 2003). Néanmoins, ces valeurs peuvent varier en fonction de la souche ou du milieu de fermentation.

Les sources d'azote utilisables par les levures sont très nombreuses :

- Le sulfate d'ammonium ou l'ammoniac gazeux sont très utilisés car peu coûteux, de qualité constante et pouvant servir en partie à la régulation de l'acidité. Néanmoins le sulfate peut causer la diminution de la production d'éthanol, jusqu'à 14%, selon les concentrations en sulfate (Laopaiboon et col., 2009). D'autres contre-ions peuvent néanmoins être associés à l'ammonium comme les phosphates, participant ainsi à l'équilibre acido-basique
- L'urée est un composé azoté peu coûteux et disponible en grande quantité, mais celui-ci peut réagir avec l'éthanol et former de l'éthyle carbamate, ce qui diminue le rendement (Laopaiboon et col., 2009)
- Le Corn Steep Liquor qui est une source d'azote peu coûteuse mais qui nécessite d'être utilisée en grande quantité pour avoir un effet significatif (Jørgensen, 2009)
- Les hydrolysats de protéines, aussi appelés peptones, apportent directement les acides aminés et augmentent de manière significative le rendement de fermentation (Wang et col., 2007 (a))
- Les extraits de levure semblent être le substrat le plus performant pour améliorer les milieux de cultures à haute densité. Ils apportent non seulement des acides aminés mais aussi des minéraux et des vitamines. Le problème majeur est que ces extraits sont chers, il convient donc d'ajouter la quantité la plus petite possible (Jørgensen, 2009). Cependant, les levures peuvent être utilisées sous d'autres formes moins chères, comme les « dried spent yeast » (Laopaiboon et col., 2009).

#### **I.3.3.1.b. Le phosphore**

Le phosphore permet à la levure de produire des composants cellulaires tels que les acides nucléiques mais aussi d'améliorer la productivité de *Saccharomyces cerevisiae* lors la production d'éthanol (Silva et col. 2008 (a)). Ceci s'explique par une augmentation de la synthèse de polyphosphates de faible poids moléculaire participant dans les cellules au transport et au piégeage de cations mono et divalents (Lichko et col., 1982) permettant ainsi une activation générale du métabolisme. En règle générale, le phosphore doit être disponible à des concentrations représentant entre 1 à 2 % (m/v) de la masse de matière sèche par unité de volume (Jacques et col., 2003).

#### **I.3.3.1.c. Les ions métalliques**

Les ions métalliques permettent, s'ils sont présents en quantité adéquate, d'augmenter le métabolisme de la levure et la vitesse de la glycolyse et donc la conversion du pyruvate en éthanol (Soyuduru et col., 2009). En effet, les ions métalliques sont vitaux pour les levures car de nombreuses enzymes les utilisent comme cofacteurs. Ces enzymes voient, en l'absence de ces ions, leur activité fortement diminuer ou devenir nulle. Cependant, ces ions, s'ils sont présents en trop grandes quantités, deviennent toxiques pour la levure et donc pour la production d'éthanol (Jacques et col., 2003). Ceci souligne l'importance d'apporter les bons ions métalliques en bonne quantité. Enfin, les concentrations optimales en ions métalliques sont spécifiques de la souche utilisée et du milieu (Rees et Stewart, 1997), ce qui rend indispensable l'étude expérimentale.

##### **I.3.3.1.c.i. Le calcium**

Le calcium est indispensable à la levure pour assurer le bourgeonnement et la division cellulaire (Poreda et col., 2009). De plus, cet ion participe à la protection et au maintien de la structure de la membrane (Rees et Stewart, 1997). Le calcium est stocké, dans la levure, à 95 % dans la vacuole. Le calcium se lie à la calmoduline lorsque la concentration cytosolique en calcium augmente. Cette liaison permet l'interaction du couple calcium-calmoduline avec de nombreuses protéines dont elle stimule l'activité (Rees et Stewart, 1997).

D'après la bibliographie (Rees et Stewart, 1997 ; Jacques et col., 2003 ; Poreda et col., 2009), la concentration optimale en calcium est comprise entre 180 et 1500 ppm et la concentration minimale requise est d'environ 15 ppm.

#### **I.3.3.1.c.ii. Le potassium**

Le potassium joue un rôle essentiel dans de nombreuses fonctions cellulaires vitales : la régulation osmotique de la cellule, l'équilibre des charges ioniques, la régulation et le transport des ions et l'assimilation du phosphore (Tosun et Ergun, 2007). Cet ion possède donc l'essentiel de son activité au niveau de la membrane cellulaire.

Le potassium permet à la levure de rejeter le sodium à l'extérieur de la cellule. En effet le sodium, même à de faibles concentrations, provoque l'inhibition compétitive de l'assimilation du potassium, ce qui entraîne une perte globale de l'activité cellulaire (Garcia et col., 1997). Les concentrations optimales en potassium sont comprises entre 80 et 7900 ppm (Garcia et col., 1997 ; Jacques et col., 2003 ; Tosun et Ergun, 2007).

#### **I.3.3.1.c.iii. Le magnésium**

Le magnésium est le cation divalent le plus abondant dans la levure. Cet ion est transporté de manière active dans le cytosol dans lequel il agit de manière ubiquitaire. En effet, le magnésium est retrouvé comme co-facteur de plus de 300 enzymes, dont l'hexokinase, la phosphofructokinase, la phosphoglycerate kinase, la pyruvate kinase et l'énolase. Ces enzymes participent à la glycolyse, d'où l'importance du magnésium dans les milieux de fermentation utilisés pour la production d'alcool (Rees et Stewart, 1997 ; Xue et col., 2008).

Le magnésium est aussi impliqué dans la stabilisation de la membrane, des acides nucléiques, des polysaccharides ainsi que des lipides. Ce dernier point souligne l'importance de cet ion pour la protection de la cellule contre les stress dus à l'éthanol, la température et le stress osmotique. Enfin le magnésium est indispensable à la fois, à la division et à la croissance cellulaire (Xue et col., 2008 ; Soyuduru et col., 2009).

Une compétition existe entre le calcium et le magnésium. En effet si la disponibilité du magnésium est trop faible par rapport à celle du calcium, les enzymes ayant le magnésium comme cofacteur utiliseront le calcium, ce qui entraîne une forte diminution de l'activité cellulaire. Le ratio calcium-magnésium est donc un paramètre à prendre en compte dans le cas de concentration en calcium supérieures à l'optimum (Poreda et col., 2009 ; Soyuduru et col., 2009).

Les optima trouvés dans la bibliographie (Rees et Stewart, 1997 ; Jacques et col., 2003 ; Xue et col., 2008 ; Soyuduru et col., 2009) sont compris entre 39 et 144 ppm. La tolérance de *Saccharomyces cerevisiae* est élevée vis-à-vis du magnésium. En effet, l'inhibition a lieu pour des concentrations supérieures à 24 g.L<sup>-1</sup> (Jacques et col., 2003).

#### **I.3.3.1.c.iv. Le zinc**

À l'instar du magnésium, le zinc joue lui aussi un rôle essentiel comme cofacteur enzymatique et participe à la stabilité structurelle de nombreuses protéines (Tosun et Ergun, 2007). Cet ion permet aussi d'augmenter la viabilité cellulaire, la production d'éthanol et la vitesse de croissance des levures (Stehlik-Tomas et col., 2004).

Il a été observé que la présence de zinc provoque l'augmentation de la résistance à l'éthanol (Xue et col., 2008) et l'augmentation des vitesses de conversion des sucres en éthanol et en biomasse (Chandrasena et Walker, 1997). En effet, le zinc permet d'augmenter la production d'ergostérol et de tréhalose, qui sont des molécules protectrices des stress. De plus cet ion permet de modifier les flux métaboliques au profit de la production d'éthanol. Cette réorientation permet aussi de diminuer la production de glycérol et de protéines et l'activité de la voie des acides tricarboxyliques (Xue et col., 2010).

Cependant le zinc, s'il est présent en trop grande quantité, entraîne une diminution globale de l'activité fermentaire et de la croissance levurienne. De plus, l'excès de zinc perturbe la perméabilité membranaire, entraînant la diminution de la concentration en potassium dans le cytosol (Stehlik-Tomas et col., 2004) perturbant ainsi tout le métabolisme cellulaire. D'après la bibliographie (Chandrasena et Walker, 1997 ; Jacques et col., 2003 ; Tosun et Ergun, 2007 ; Xue et col., 2008), la concentration optimale en zinc dans les milieux est comprise entre 0,3 et 3 ppm.

### **I.3.3.1.c.v. Le fer**

Le fer est indispensable à de nombreuses protéines pour maintenir leurs structures. Il intervient aussi dans une large gamme de réactions d'oxydo-réduction au sein de la cellule. En effet cet ion est essentiel au transport d'électron et aux réactions incluant l'oxygène comme la production de stérols ou de lipides insaturés (Kaplan et col., 2006). Le fer est généralement présent sous deux états dans les milieux, ferreux ( $Fe^{2+}$ ) et ferrique ( $Fe^{3+}$ ), ce dernier état étant le plus fréquent. Si le fer ferreux est utilisable par la cellule, son homologue ferrique, est quant à lui le plus souvent présent sous forme de sels ou lié à des molécules organiques, ce qui le rend inaccessible à la levure (Stehlik-Tomas et col., 2003). Selon la littérature (Jacques et col., 2003 ; Stehlik-Tomas et col., 2003), les concentrations optimales en fer sont comprises entre 1 et 800 ppm.

La formation de complexe entre le fer et les phosphates est un phénomène très répandu et étudié dans de nombreux domaines allant de l'agronomie (Nanzyo et col., 2010), à l'électrochimie (Volkand et col., 2000) en passant par la géologie (Manning et col., 1991). En effet, ce phénomène a lieu dès que le fer et les phosphates sont présents dans un milieu, et est facilité dans des milieux réducteurs. Dans la nature on retrouve ce complexe généralement dans des milieux anoxiques comme les eaux profondes, les marais, les sédiments ou au fond des lacs (Lemos et col., 2007). Les milieux de fermentation réalisés au laboratoire sont eux aussi réducteurs. En effet, l'oxygène diffusant dans les milieux est simultanément utilisé, de plus les milieux de fermentation utilisés sont acides.

Dans les conditions de culture appliquées aux fermentations, le pH est compris entre 4,7 et 5,2, les phosphates, ajoutés sous forme d'acide orthophosphorique, sont alors présents à plus de 99% sous la forme  $H_2PO_4^-$ . En présence de fer ces phosphates peuvent se complexer pour former de la vivianite  $[Fe_3(PO_4)_2 \cdot 8H_2O]$  qui précipite et devient alors inaccessible pour la levure (Manning et col., 1991 ; Fagel et col., 2005). Le phosphore comme le fer deviennent alors inaccessibles pour les microorganismes.

### **I.3.3.1.c.vi. Le cuivre**

Le cuivre est un métal essentiel à tous les organismes, jouant le rôle de cofacteur enzymatique pour certaines enzymes comme la cytochrome c oxydase ou la  $Cu^{2+}$ - $Zn^{2+}$  superoxyde dismutase servant à détoxifier la levure (Stehlik-Tomas et col., 2004).

Cependant, cet ion possède une gamme optimale réduite et devient toxique dès que sa concentration devient supérieure à cette gamme (Azenha et col., 2000). En effet dès qu'il y a excès en cuivre dans le milieu, cet ion déstabilise la membrane cytoplasmique et entraîne une rapide diminution de la concentration cytosolique en potassium (Avery et col. 1996).

Les optima trouvés dans la bibliographie (Avery et col. 1996 ; Azenha et col., 2000 ; Jacques et col., 2003 ; Stehlik-Tomas et col., 2004) sont compris entre 0,1 et 0,6 ppm.

### **I.3.3.1.c.vii. Le manganèse**

Le manganèse, de par ses propriétés chimiques proches du magnésium entre en compétition avec ce dernier dans le rôle de cofacteur enzymatique (Blackwell et col., 1997). Cependant, certaines enzymes ont une affinité spécifique pour le manganèse, comme la pyruvate carboxylase (Stehlik-Tomas et col., 2004), ce qui le rend indispensable au bon fonctionnement de la cellule.

Il a été montré que le manganèse permet d'augmenter légèrement la viabilité cellulaire et la production d'éthanol (Xue et col., 2010). D'après la bibliographie (Blackwell et col., 1997 ; Jacques et col., 2003 ; Stehlik-Tomas et col., 2004), les concentrations optimales en manganèse sont comprises entre 0,06 et 0,12 ppm.

### **I.3.3.1.c.viii. Prévention et traitements des mélasses contre les ions toxiques**

Si tous les ions précités peuvent permettre une amélioration des milieux de culture de *Saccharomyces cerevisiae* pour la production d'éthanol, ils peuvent aussi en cas d'excès entraîner l'inhibition de la production d'éthanol. De plus d'autres ions métalliques comme le sodium, cadmium, osmium, argent, plomb, chrome, arsenic, mercure, n'apportent aucun bénéfice à la fermentation et sont toxiques à des concentrations très faibles (Wang et Chen, 2006). Il est donc nécessaire de maîtriser les



concentrations des ces deux catégories d'ions dans les milieux. Les ions, dans les milieux de fermentations, ont trois origines principales :

- L'eau utilisée tout au long du procédé aboutissant à l'obtention des milieux de culture
- La terre restée collée aux betteraves après la récolte et non éliminée par le lavage des betteraves avant diffusion des sucres
- Les betteraves elles-mêmes.

Les levures et les vinasses étant souvent recyclées en industrie, des phénomènes d'accumulation peuvent alors avoir lieu. Ce dernier point souligne encore l'importance de la qualité de l'eau et du nettoyage des betteraves utilisées en sucrerie.

Afin de pallier des problèmes de procédé, quelques solutions ont été mises au point pour le traitement des milieux de fermentation à partir de substrats betteraviers. La dialyse peut être utilisée pour diminuer la concentration en potassium, parfois trop élevée, directement sur les SBP (Ryan et Johnson, 2001). La zéolite NaY, ajoutée au milieu, permet de diminuer les concentrations en zinc, manganèse et fer. Enfin, il a été montré que le complexe Ca-Montmorillonite permet de diminuer la concentration en sodium des milieux (Tosun et Ergun, 2008). NaY et Ca-Montmorillonite sont des chélatants sélectifs, les ions cibles ne sont donc ni détruits ni éliminés du milieu mais sont rendus inaccessibles.

#### **I.3.3.1.d. Composés complexes**

Il est possible de compléter le milieu de culture avec de nombreux composés. Ceux-ci peuvent varier selon les procédés utilisés ou la disponibilité des produits. La mélasse de canne à sucre peut, par exemple, servir de supplément aux fermentations à haute densité du sorgho sucrier (Laopaiboon et col., 2009). Des vitamines peuvent être ajoutées, cependant celles-ci sont très chères et n'affectent que peu les productivités et la viabilité cellulaire (Wang et col., 2007 (a)). Le millet peut aussi servir de supplément, il a pour effet de diminuer la production de glycérol et d'augmenter la résistance des levures au stress (Reddy et Reddy, 2006).

#### **I.3.3.1.e. L'acétaldéhyde**

L'acétaldéhyde aussi appelé éthanal, permet de diminuer le temps de latence s'il est utilisé en début de fermentation et peut diminuer le temps de fermentation s'il est ajouté de manière continue au milieu pour un total de 4 g.L<sup>-1</sup>. L'acétaldéhyde permet aussi de diminuer la quantité de glycérol produite, mais augmente le butanediol, le methylpropanol et l'acétate produit (Barber et col., 2002). Ce produit semble très intéressant, néanmoins il est cancérigène pour les animaux et anticipé comme tel pour l'homme (IARC, 1999), ce qui handicape d'une part, la valorisation des coproduits de fermentation dans l'alimentation animale et d'autre part, l'utilisation d'un tel produit à une échelle industrielle.

#### **I.3.3.1.f. Les composés lipidiques insaturés**

Les lipides sont les composants majoritaires de la membrane cellulaire. Cette membrane possède deux rôles essentiels ; elle est à la fois une barrière physique et un haut lieu d'échange avec le milieu extérieur. La membrane cellulaire contient de nombreuses enzymes, certaines servant au transport et d'autres à des fonctions métaboliques vitales (You et col., 2003). Ainsi, la composition en lipides de la membrane influe à la fois sur les fonctions de transport (entrée des substrats et sortie des déchets métaboliques) et sur l'activité métabolique de la levure.

Une des possibilités qu'a la levure pour contrer les effets néfastes de l'éthanol est de modifier la composition lipidique de sa membrane en augmentant la concentration de cette dernière en acide gras insaturés, comme l'acide oléique, et en ergostérol (Thomas et col., 1978 ; Shobayashi et col., 2005). La synthèse des lipides insaturés ne peut se faire qu'en présence d'oxygène mais si ceux-ci sont présents dans le milieu, la levure peut les utiliser directement pour les incorporer à sa biomasse.

### I.3.3.1.g. L'ergostérol

L'ergostérol, analogue structurel du cholestérol, est un précurseur des stérols retrouvés dans les membranes des eucaryotes inférieurs. Les différences sont que l'ergostérol possède deux doubles liaisons sur le carbone 7 et le carbone 22 et un groupe méthyle sur le carbone 24. Les stérols membranaires, de par leurs structures, permettent de stabiliser les lipides composant la membrane et ainsi d'augmenter la résistance à l'éthanol des levures (Buttke et col., 1980).

La composition de la membrane levurienne est dynamique et dépend des conditions de culture. En effet, il a par exemple été montré qu'un stress dû à l'éthanol pouvait provoquer l'augmentation de la production et de l'incorporation des stérols dans la membrane (Dickey et col., 2009). Enfin, l'ergostérol joue un rôle important dans la diminution du stress oxydatif (Higgins et al., 2003). L'ergostérol montre des effets bénéfiques sur la production d'éthanol à des concentrations de l'ordre de 15 ppm.

### I.3.3.1.h. Les acides gras insaturés

Tout comme pour l'ergostérol, il a été montré qu'un stress dû à l'éthanol pouvait provoquer l'augmentation de la concentration en acides gras insaturés dans la membrane cellulaire de la levure. Les acides palmitoléique (16:1) et oléique (18:1) sont des acides gras mono-insaturés. Ils représentent la majeure partie des acides gras retrouvés dans la levure (You et col., 2003). La composition de la membrane en ces acides est déterminante pour la résistance à l'éthanol de *Saccharomyces cerevisiae* (Sajbidor et col., 1995). Cependant, l'acide oléique semble être le plus efficace pour augmenter la résistance des levures à l'éthanol (Landolfo et col., 2010) et ce à des concentrations d'environ 5 ppm.

## I.3.3.2. Les gaz dissous

### I.3.3.2.a. L'oxygène

La présence d'oxygène dans le milieu de culture des levures est à l'origine de l'effet Pasteur. Cet effet correspond à une inhibition de la fermentation, et donc de la production d'éthanol, par la respiration. L'effet est d'autant moins marqué que la levure est sensible à l'effet Crabtree. Ainsi chez *Saccharomyces cerevisiae* l'effet Pasteur est presque inexistant (Poilpré, 2002).

Cependant l'oxygène permet une meilleure conversion du substrat en diminuant la production de glycérol. Ceci s'explique par le fait qu'il participe à la ré-oxydation du coenzyme  $\text{NADH} + \text{H}^+$  qui, en cas de manque d'oxygène est ré-oxydé en produisant du glycérol durant la glycolyse. Il est donc préférable que l' $\text{O}_2$  dissous soit non-limitant (Alfenore et col., 2004). L'oxygène permet aussi la production d'acides gras insaturés et de stérols, ce qui permet à la levure de se protéger contre la pression osmotique et l'éthanol et ainsi améliore la viabilité cellulaire au cours de la fermentation (Lin et col., 2002). En effet, La synthèse de lipides insaturés ne peut se faire qu'en présence d'oxygène. Lorsque la levure se divise, les lipides insaturés sont divisés entre la cellule fille et la cellule mère. En anaérobiose, la concentration membranaire des levures en lipides insaturés diminue jusqu'à atteindre un seuil de viabilité en-dessous duquel les levures meurent (Henry, 1982). Les besoins en oxygène dissous, durant la phase de croissance, varient de 4 à 40 ppm (Jacques et col., 2003). L'oxygène doit donc être apporté lorsque la population levurienne augmente.

L'oxygène est aussi connu pour intervenir dans de nombreuses réactions métaboliques comme la synthèse des hèmes, les réactions réalisées par les oxydases ou encore la chaîne respiratoire, cependant ces voies ne sont encore décrites en détail (Rosenfeld et col., 2003).

Les effets bénéfiques de l'oxygène sont plus importants à saturation du milieu, néanmoins ils restent significatifs en micro-aération (Alfenore et col., 2004). La micro-aération semble être un bon compromis entre augmentation de la production et une oxygénation complète du milieu qui est très énergivore et donc coûteuse.

Ces faibles apports en oxygène n'influencent en rien la production d'éthanol. En effet, 20 ppm d'oxygène, s'ils sont utilisés uniquement par la respiration, ne permettent de dégrader que de 35 ppm de saccharose. Cela ne représente que 0,016 % des sucres présents dans un milieu contenant  $220 \text{ g}_{\text{sucres}} \text{ équivalent saccharose} \cdot \text{L}^{-1}$ .

### **I.3.3.2.b. Le dioxyde de carbone**

Au cours de la fermentation alcoolique du dioxyde de carbone est produit. Celui-ci constitue un des produits majeurs de la fermentation comme l'indiquent les équations 2 et 3. La viabilité cellulaire diminue à mesure que la pression de  $\text{CO}_2$  dissous augmente ce qui peut entraîner une inhibition complète des levures (Saez, 1986). De plus, le  $\text{CO}_2$  peut dénaturer la structure de la membrane et modifier sa composition et donc fragiliser les levures vis-à-vis de l'éthanol. Enfin le dioxyde de carbone dissous forme un acide faible ce qui peut altérer le pH et poser des problèmes de régulation à cause du pouvoir tampon des espèces  $\text{H}_2\text{CO}_3/\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ . Cependant les effets du dioxyde de carbone n'ont été relevés que pour des concentrations en  $\text{CO}_2$  dissous supérieures de 15% à la saturation à pression atmosphérique (Kruger et col., 1992).

### **I.3.3.3. La température**

La température agit sur les vitesses de croissances et de production de métabolites. Plus la température est élevée plus la croissance sera rapide et ce jusqu'à atteindre la température optimale, au-delà de laquelle la vitesse de croissance diminuera. Le choix de la température est donc primordial. La température optimale de croissance pour *Saccharomyces cerevisiae* est comprise entre de 30 et 33°C (Aldigier et col., 2004). Cela dépend néanmoins des souches, du milieu ainsi que des conditions de culture.

L'augmentation de la température, jusqu'à la température optimale, permet de diminuer le temps de fermentation. Cependant, des températures supérieures à 30°C peuvent avoir pour effets de diminuer la concentration finale en éthanol dans le milieu (Reddy et Reddy, 2006).

La température optimale pour la production d'éthanol n'est pas forcément la température optimale pour la croissance de la biomasse. En effet, plus la température est élevée plus la levure est soumise au stress. De plus, la température optimale de production, dépend à la fois de la souche et de la composition du milieu de culture (Jones et Ingldew, 1994). Enfin, au delà de 25°C la levure devient significativement plus sensible à la pression osmotique et la présence d'éthanol. Il a été observé que pour des températures supérieures à 25°C, il y a augmentation des sucres résiduels et diminution du rendement de conversion des sucres en éthanol (Bvochora et col, 2000). Actuellement dans les ateliers de production d'éthanol la température recherchée est au maximum de 33°C.

### **I.3.3.4. L'acidité**

Les différents produits sucriers utilisés en fermentation ont des pH et des concentrations en non-sucres (différence entre matières sèches et sucre) très variables. Ces derniers déterminent les qualités nutritives du moût mais ont aussi un pouvoir tampon très important. L'acidité se mesure en gramme équivalent d'acide sulfurique par litre de milieu. Plus l'acidité augmente, plus la vitesse de croissance diminue pour devenir nulle à une concentration de 5 g.L<sup>-1</sup> exprimée en équivalent acide sulfurique.

La mesure de l'acidité est un paramètre complémentaire à celle du pH qui dépend du moût utilisé. Par exemple, le pH 4 correspond pour un sirop à environ 1,5 g.L<sup>-1</sup> d'acide sulfurique et pour une mélasse à 5 g.L<sup>-1</sup> d'acide sulfurique. Cependant même si ce pH est compatible avec le développement de la levure, dans le cas de la mélasse pH 4, l'acidité est inhibitrice.

L'acidité sert essentiellement à limiter le développement bactérien ce qui est très important dans les milieux non stériles comme les produits sucriers. Une acidité comprise entre 1,5 et 2,5 g.L<sup>-1</sup> serait un compromis entre l'effet bactériostatique et le développement optimal de la levure (De Miniac, 1988).

### **I.3.3.5. L'inoculum**

L'inoculum est le matériel vivant, sous forme de levures actives, servant à inoculer le milieu de propagation ou de production. Le succès de la fermentation est lié à la qualité et à la quantité de l'inoculum. Afin de diminuer le temps de fermentation il est nécessaire d'effectuer le transfert des levures du milieu de propagation au milieu de production lorsque la levure est en phase exponentielle de croissance. Car durant cette phase le métabolisme de la levure est à son paroxysme.

La quantité d'inoculum est aussi un facteur très important pour diminuer la durée de fermentation ce qui contribue à diminuer le stress causé par l'éthanol en limitant le temps d'exposition (Li et col.,

2009). Cette quantité d'inoculum est à considérer avec la viabilité cellulaire car les cellules inertes contenues dans la biomasse ne serviront pas à la fermentation.

L'inoculation des milieux est très importante car elle influe sur toutes les phases de la fermentation. Un inoculum apporté en quantité importante, de l'ordre de  $20 \text{ g.L}^{-1}$ , peut permettre de diminuer, jusqu'à 80%, le temps de latence et le temps de fermentation total, d'augmenter la résistance à l'éthanol et à la pression osmotique des levures ainsi que de maintenir une viabilité cellulaire élevée tout au long de la fermentation (Li et col., 2009).

Les tentatives d'améliorations génétiques des souches ont montré l'utilité de l'utilisation de souches naturellement adaptées aux conditions des fermentations à haute densité (Argueso et col., 2009). Certaines souches présentent des propriétés très intéressantes pour les milieux à haute densité, comme la résistance aux températures élevées, à des concentrations élevées en éthanol et en substrats (Wang et col., 2007 (a)). Ces souches permettraient donc une amélioration plus rapide et moins coûteuse que des améliorations génétiques des levures.

La troisième possibilité d'amélioration de l'inoculum est d'ensemencer une culture à partir des levures de la culture précédente aussi appelé « repitching ». Il a été observé que les levures s'accommodent aux conditions de cultures au fil des générations. Les membranes sont de mieux en mieux adaptées aux milieux à haute densité de par un changement des composés lipidiques et de la quantité de stérols présents. La taille des cellules s'en trouve aussi affectée, car les levures accommodées à l'éthanol sont de plus grande taille (Dinh et col., 2008).

#### **I.3.3.6. L'éthanol**

L'éthanol produit au cours de la fermentation est toxique pour la levure et entraîne des fermentations languissantes ou même des arrêts de fermentation. Les effets de l'éthanol sur *Saccharomyces cerevisiae* sont très variés (Ansanay-Galeote et col., 2001):

- diminution de la vitesse de croissance
- diminution de la viabilité
- diminution des capacités fermentaires
- déstabilisation de la membrane plasmique et augmentation de la perméabilité membranaire
- stimulation des ATPases membranaires ce qui entraîne une perte d'énergie disponible pour la cellule
- inhibition du transport du glucose et de l'azote.

Il a été démontré que même à de faibles concentrations en éthanol, comprise entre 4 et 6 % (v/v), il y a formation de « heat shock proteins » (protéine de choc thermique) indiquant un stress important subi par la levure (Ansanay-Galeote et col., 2001). Cependant, d'après la bibliographie (Ingledew et col., 2009), les effets inhibiteurs apparaissent sur la production d'éthanol à partir de concentrations comprises entre 10 et 13 % (v/v).

L'objectif de cette thèse étant d'augmenter la concentration finale en éthanol des vins, l'inhibition par l'éthanol est donc un facteur important à prendre en compte pour l'aboutissement de ces travaux. La sensibilité à l'éthanol est très variable, elle dépend à la fois du potentiel génétique de la souche (Abe et col., 2009 ; Hou et col. 2009), du milieu de culture (Ansanay-Galeote et col., 2001), de la température et du procédé de fermentation (Lima-Costa et col., 2012), c'est pour cela que de nombreux paramètres sont à prendre en compte.

Le potentiel génétique a été considéré comme fixe selon la souche étudiée car en France il n'est pas possible d'utiliser des OGM pour la production d'éthanol. L'influence du milieu de culture à elle largement été étudiée comme l'illustre la partie I.3.. Cependant, les données présentées ne se réfèrent que rarement à des fermentations industrielles à partir de substrats betteraviers. Il ne s'agit donc que de pistes d'études. Enfin, pour compléter cette étude bibliographique, nous nous sommes intéressés au dernier point souligné concernant le procédé de fermentation en lui-même.

### I.3.4. Les procédés de fermentation

#### I.3.4.1. Un système multiphasique

Comme illustré figure 12, les fermentations sont des procédés multiphasiques. Ceci pose des contraintes biologiques et physico-chimiques. Les cellules vivantes constituent un système organisé avec des entrées de substrats, d'oxygène, de facteurs de croissance et des sorties de déchets comme le CO<sub>2</sub> et l'éthanol.

La partie active de la matière vivante, que constituent les protéines, nécessite un environnement adéquat du point de vue du pH, de la température, de la force ionique, de la présence de cofacteurs enzymatique et d'effecteurs enzymatiques. Ceci permet le développement, la maintenance et la reproduction des cellules dans de bonnes conditions.

Les systèmes multiphasiques posent des problèmes de transferts entre chacune des phases, ce qui entraîne, lors de leurs mises en œuvre à grande échelle, l'hétérogénéité du milieu.

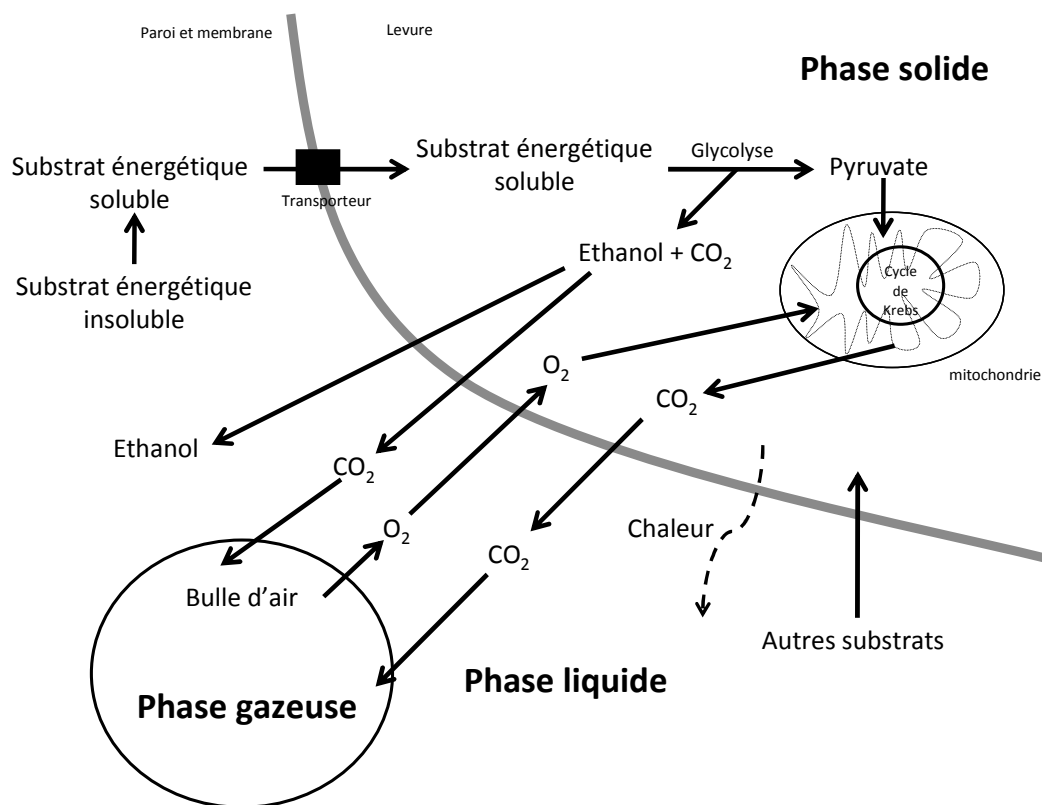


Figure 12: La fermentation: un système triphasique

#### I.3.4.2. Les modes de conduites de fermentations

##### I.3.4.2.a. Les cultures discontinues

La fabrication d'éthanol peut être réalisée à l'aide de procédés discontinus, aussi appelés batch, dans des bioréacteurs de grands volumes, de l'ordre de 500 m<sup>3</sup> (Schmid, 2005). Les cultures discontinues constituent des systèmes clos pour la phase liquide. Normalement, il n'y a pas d'addition d'éléments au milieu et la culture se développe jusqu'à ce qu'il y ait carence d'au moins un nutriment essentiel ou jusqu'à ce qu'une modification importante de l'environnement (pH, accumulation de produits toxiques...) bloque la croissance. Cependant, il est possible d'agir sur le milieu de fermentation en régulant par exemple le pH ou le niveau de mousse, le système n'est donc pas totalement clos.

Ces types de cultures n'ont pas des rendements constants tout au long du procédé car la composition du milieu évolue au cours de la fermentation. Les cultures en batch imposent des temps morts lors du remplissage et de la vidange des cuves. De plus il est nécessaire de stériliser l'installation entre chaque fermentation.

#### **I.3.4.2.b. Les cultures semi-continues**

Les techniques semi-continues appelées fed-batch obéissent aux mêmes principes, mais au cours de la fermentation, certains composants du milieu comme le substrat ou certains précurseurs sont additionnés de façon contrôlée et une partie des produits peut être enlevée du milieu. Ces procédés sont dit semi-continus et permettent de limiter à la fois les inhibitions dues au substrat ou aux produits de fermentation par la régulation de l'alimentation du réacteur.

#### **I.3.4.2.c. Les cultures continues**

Les systèmes continus sont des systèmes ouverts dans lesquels la population cellulaire est maintenue constamment dans un environnement stable et un état de croissance équilibrée, en retirant une partie de la culture et en la remplaçant par du milieu frais. Il existe deux types de systèmes continus :

- Le chémostat, dans lequel un facteur nutritif limitant est ajouté à un taux constant
- Le turbidostat, dans lequel la densité de cellules est maintenue constante

Dans un chémostat, la vitesse de croissance est déterminée par la vitesse d'addition du nutriment limitant qui peut être soit la source de carbone, soit d'azote, soit de phosphore, soit d'oligo-éléments ou de vitamines. Tous les autres facteurs nutritifs sont présents en excès.

Le turbidostat possède un système de mesure de la densité cellulaire et maintient cette densité constante par la régulation du débit d'alimentation et de soutirage corrélée au taux de dilution qui est égal au rapport entre le débit d'alimentation et le volume du réacteur. Ce taux de dilution, doit impérativement être inférieur ou égal à la vitesse spécifique de croissance maximale afin de ne pas provoquer le lavage de la culture. Dans le cas contraire, la biomasse ne pourra pas se maintenir dans le réacteur. Ces deux types de réacteurs permettent de contrôler la vitesse spécifique de croissance. En maintenant le régime permanent, la culture peut être maintenue dans un état défini, théoriquement de façon illimitée.

#### **I.3.4.2.d. Comparatif entre les différents types de cultures**

Dans un batch, la productivité n'est pas constante tout au long du procédé, alors que celle des procédés continus est toujours maximale pour le point de fonctionnement optimal et ce, pendant une longue période. Ainsi, dans les procédés continus, les périodes improductives sont négligeables devant les périodes productives, ce qui n'est pas le cas en batch.

Par ailleurs, à l'état stationnaire tous les paramètres restent constants, si bien que la régulation est plus facile à maintenir et se prête mieux à l'automatisation, alors que dans les procédés discontinus, les paramètres subissent des variations importantes et il est plus difficile de les contrôler : ainsi la demande en dioxygène est faible au début et s'accroît au fur et à mesure du fait de l'augmentation de biomasse, il en est de même pour la viscosité du milieu, la température, le pH...

Le travail exigé pour la réalisation d'une culture continue est plus régulier que celui exigé pour la réalisation d'une culture discontinue. En ce qui concerne la production industrielle de métabolites, la culture continue a également une meilleure productivité que la culture en batch, car les procédés continus permettent d'opérer à un taux de dilution qui maintient la production de métabolites aux taux les plus élevés et ne consiste pas simplement en un phénomène transitoire.

Tous ces arguments sont en faveur des procédés continus. Cependant, ceux-ci sont plus sensibles au développement de contaminants exogènes et les risques de défaillances du matériel sont plus élevés. Les souches industrielles hautement productrices ont été obtenues par mutations successives et ont souvent un taux de croissance faible, or les mutations réverses sont toujours possibles. Ces mutants réverses sont alors moins productifs mais croissent plus vite ; ils auront donc tendance à remplacer les premières souches dans le système continu. Il s'agit, dans ce cas, de contaminations endogènes.

Enfin, les fermentations en batch sont plus simples à mettre en œuvre, les installations requises sont moins onéreuses et la maintenance du matériel est plus aisée.

### **I.3.4.3. Les systèmes d'agitation**

#### **I.3.4.3.a. Agitation mécanique**

Ce type d'agitation est le plus couramment utilisé. L'agitation est assurée par un système de pales tournant grâce à un moteur. Ce moteur peut être situé au sommet du réacteur ou à sa base. L'agitation peut être renforcée par des contres-pales. Les réacteurs ont une géométrie établie selon des règles permettant une efficacité optimale de l'agitation.

Pour des réacteurs de grande capacité, lorsqu'il y a un problème d'évacuation de chaleur, il est possible d'utiliser des pales dans lesquelles circule de l'eau froide. Le nombre de pales dépend de la hauteur du liquide et du diamètre de la cuve. Pour assurer une distribution d'air optimale le système d'agitation doit être situé à une distance du fond de la cuve inférieure au diamètre celle-ci.

Divers types de mobiles d'agitation ont été développés permettant une homogénéisation et un cisaillement plus ou moins importants. Les plus couramment utilisés pour les micro-organismes sont les agitateurs de type radial à turbines ou à turbines à pales droites. Pour les cellules fragiles des hélices marines sont le plus souvent utilisées car elles permettent une bonne homogénéisation de l'air et du milieu avec vitesse de rotation réduite pour diminuer les forces de cisaillement.

#### **I.3.4.4. Agitation par l'air**

Pour supprimer les forces de cisaillement provoquées par les systèmes de pales, des bioréacteurs à agitation pneumatique « air lift » ont été développés. Ce système a aussi l'avantage de nécessiter moins de puissance pour l'agitation qu'un système avec des pales. L'air est injecté par des pompes ou distribué par surpression. Si la hauteur du système est importante, la colonne peut contenir des pales fixées ou des pales perforées avec injection latérale d'air.

Les fermenteurs à jets d'air « deep jet fermentor » utilisent des pompes centrifuges spéciales qui propulsent un mélange air-milieu à haute vitesse dans le réservoir principal, ce qui assure agitation et aération.

Après ce tour d'horizon des procédés existant, il est apparu qu'une variable importante manquait à l'analyse. En effet pour obtenir de fortes concentrations en éthanol, il est nécessaire d'utiliser des milieux de fermentations contenant de fortes concentrations en sucre, aussi appelés milieux à haute densité.

## **I.4. Les fermentations à haute densité**

### **I.4.1. Présentation générale**

L'éthanol en tant que carburant alternatif peut être produit à partir de nombreuses ressources renouvelables de biomasse végétale. Afin d'augmenter la productivité et diminuer les coûts de la production d'éthanol, de nombreuses recherches ont été menées sur la fermentation à haute densité (Das Neves et col., 2006). Ces fermentations sont dites à haute densité car les milieux utilisés contiennent plus de  $250 \text{ g.L}^{-1}$  de sucre ce qui permet d'obtenir en théorie en fin de fermentation plus de 15 % (v/v) d'éthanol contrairement aux 10 à 12 % généralement obtenus dans la plupart des distilleries à travers le monde (Puligundla et col., 2011).

Les procédés de production utilisables sont les mêmes que ceux utilisés en fermentation classique présentés partie I.3.4.. Néanmoins, l'utilisation de milieux à haute densité fait que ces fermentations sont très sensibles à la température, à la concentration et la viabilité cellulaire, à la composition du milieu, à la présence d'oxygène et à la concentration en éthanol (D'Amore et col., 1990). Chacun de ces critères a une influence notable sur la productivité de la fermentation (D'Amore, 1992).

### **I.4.2. Intérêts et défis techniques des fermentations à haute densité**

Les fermentations à haute densité possèdent de nombreux avantages. En effet, ces fermentations permettent (Bvochora et col., 2000 ; Laopaiboon et col., 2009 ; Puligundla et col., 2011):

- d'augmenter les capacités de production sans modification de la structure de production
- d'augmenter la concentration en éthanol dans le milieu

- de diminuer les coûts énergétiques par litre d'éthanol, pour l'étape de fermentation mais aussi pour l'étape de distillation. En effet, cette dernière est facilitée par des concentrations plus élevées en éthanol. Par exemple, un vin contenant 15 % (v/v) d'éthanol nécessitera 29 % d'énergie en moins par litre d'éthanol pur lors de la distillation par rapport à un vin contenant seulement 10 % (v/v) d'éthanol.
- de limiter les risques de contaminations grâce à des pressions osmotiques élevées et aux fortes concentrations en éthanol
- de diminuer la consommation en eau et la quantité d'effluents à traiter.

Tous ces facteurs ont un impact direct et significatif sur les coûts de production de l'éthanol et pourraient donc augmenter la compétitivité de ce carburant vis-à-vis de l'essence. Cette technique de fermentation pourrait aussi permettre une amélioration significative de la balance énergétique de ce biocarburant et diminuer aussi la quantité de GES émis pour sa production.

Néanmoins, les fermentations à haute densité présentent des inconvénients majeurs, (Jones et col., 2007; Pidocke et col., 2009) comme :

- la forte pression osmotique en début de fermentation et la concentration élevée en éthanol dans le milieu en fin de fermentation, affectent le développement des levures et diminuent la viabilité cellulaire en fragilisant les cellules :
- l'augmentation de la durée de fermentation
- l'utilisation incomplète du substrat et l'augmentation de la production d'acides organiques et de glycérol
- la limitation des nutriments
- l'augmentation de la viscosité, donc plus d'énergie est nécessaire pour l'agitation et l'aération
- la diminution de la solubilité de l'oxygène.

Tous ces effets néfastes, provoqués par l'utilisation de milieux à haute densité, ont une influence sur la diminution des performances de fermentation. Cependant, ces inconvénients ne sont pas insurmontables et ne sont que des défis techniques. Il existe trois possibilités pour surmonter ces problèmes :

- utiliser des souches hautement résistantes aux fortes pressions osmotiques et aux fortes concentrations en éthanol, ce qui implique l'utilisation de souche OGM. L'utilisation de tels organismes étant interdit en France pour la production d'éthanol, cette solution a été écartée.
- utiliser des milieux de cultures satisfaisant au mieux les besoins de *Saccharomyces cerevisiae* dans les conditions appliquées en termes de nutriments, de température ou encore d'acidité, comme il a été présenté dans la partie I.3.. En effet, tous les paramètres cités dans cette partie I.3. peuvent permettre de limiter les conséquences néfastes de la fermentation à haute densité (Puligundla et col., 2011).
- utiliser des procédés de fermentation adaptés à ce type de fermentation.

### **I.4.3. L'adaptation des procédés pour les fermentations à haute densité**

#### **I.4.3.1. Les procédés discontinus**

L'amélioration des procédés discontinus vise principalement le recyclage des cellules. Ceci permet de répéter les cultures avec le même inoculum. Ainsi, il y a diminution de coûts d'inoculum, diminution des temps morts imposés par les procédés discontinus, augmentation de la densité cellulaire et accommodation de la souche aux conditions de culture. Tout ceci permet de diminuer le temps de fermentation, augmente la productivité et la résistance au stress osmotique comme à l'éthanol (Argueso et col., 2009).

Cependant, si le recyclage cellulaire semble intéressant, celui-ci impose de séparer les levures du milieu. Deux possibilités se présentent alors. La première est l'utilisation de cellules immobilisées. Pour ce faire de nombreuses techniques existent comme l'adhésion, l'inclusion ou l'encapsulation (Norton et D'Amore, 1994, Radojka, 2012). Cependant, l'immobilisation des levures ajoute des coûts supplémentaires au procédé. De plus, elle impose des contraintes physiques, des problèmes d'accès



au substrat et d'élimination des déchets toxiques comme l'éthanol dus à la limitation de transfert de masse (Bai et col., 2008(a)).

La seconde possibilité pour effectuer le recyclage cellulaire est l'utilisation de cellules libres. Il est nécessaire dans ce cas de séparer les levures soit par centrifugation soit par filtration. Ces techniques de séparation requièrent à la fois de l'énergie, de la maintenance et des équipements. Ceci représente des investissements et de l'entretien mais aussi des risques de contamination, ce qui affecte la compétitivité de l'éthanol sur le marché des carburants (Li et col., 2009). Le recyclage des cellules libres après centrifugation est actuellement le procédé le plus utilisé en France pour l'inoculation des cuves de fermentation.

Certaines souches de levures possèdent des facultés d'auto-floculation. Celles-ci permettent donc de se passer d'immobilisation, de centrifugation ou de filtration. En effet, la séparation s'effectue uniquement grâce à la gravité par sédimentation, il suffit donc d'arrêter l'agitation. Ceci fait qu'il n'y a pas besoin d'équipement ni d'apport d'énergie supplémentaire pour la séparation. De plus, l'auto-floculation ne provoque pas les problèmes de transfert de masse de l'immobilisation (Bai et col., 2008(b)). Les seules contraintes qu'impose l'utilisation de levures auto-floculantes sont le temps nécessaire à la sédimentation et le besoin permanent d'une agitation suffisante pour maintenir en suspension les levures dans le milieu de fermentation. Ces souches peuvent être naturellement auto-floculantes comme la souche CHFY0321 (Choi et col., 2009) ou modifiées comme la souche 0587 de la « Chinese General Microbial Culture Collection Center » (Li et col., 2009).

#### **I.4.3.2. Les procédés fed-batch**

Le fed-batch, en vue d'application à la fermentation à haute densité, possède un atout très important qui est de pouvoir au cours du procédé réguler la concentration en sucre présente dans le milieu. Cela permet donc de limiter le stress causé par la concentration en sucre. Les études portant sur le procédé fed-batch consistent essentiellement en l'étude des stratégies d'alimentation pour soit le substrat (Hunag et col., 2012 ; Li et col., 2012), soit des nutriments (Alfenore et col., 2002 ; Barber et col., 2002 ; Alfenore et col., 2004). Ces études ont montré que par une bonne gestion de l'alimentation, il était possible en fed-batch de limiter les stress subis par la levure qu'ils soient dus au sucre ou à l'éthanol et ainsi d'augmenter la production d'éthanol dans les milieux de fermentation. Cependant, sous le nom fed-batch, une multitude de types de conduite de fermentation sont regroupés. Il peut y avoir ou non une phase de propagation durant plus ou moins longtemps, le débit d'alimentation peut être constant ou variable avec un milieu contenant du sucre ou d'autres nutriments... Si le potentiel de ce type de fermentation est très intéressant (Ingledew et col., 2009), l'étude bibliographique ne permet cependant pas de déterminer quel type de procédé fed-batch serait applicable.

#### **I.4.3.3. Les procédés continus**

L'amélioration des procédés continus porte sur trois axes de recherches. Les deux premiers sont, tout comme pour les procédés discontinus présentés précédemment, l'immobilisation des levures (Silva et col., 2008 (a)) et le recyclage cellulaire, dans lequel la biomasse est séparée du milieu en sortie de réacteur et réinjectée en entrée mais cette fois de façon continue (Gillis, 1999).

Le troisième consiste en une augmentation du nombre de réacteurs placés en série. Il s'agit alors de fermentations dites multi-étagées en continu. Ceci permet de limiter les stress sur les levures. En effet la pression osmotique diminue de réacteur en réacteur alors que la concentration en alcool augmente. Les levures ne sont donc pas exposées aux deux types de stress dans le même réacteur (Bai et col., 2004). Cependant, il existe peu de publications au sujet des fermentations continues à haute densité utilisant une série de réacteurs (Bai et col., 2008(b)).

Outre les avantages et les inconvénients des cultures continues présentés partie I.4., l'utilisation de milieu à haute densité ne permet pas d'atteindre l'état stationnaire à partir de concentrations comprises entre 12 et 14 % (v/v) d'éthanol (Verachtert et De Mot, 1990). La fermentation continue perd donc son intérêt essentiel qui est la régularité de la production. En effet, des oscillations de grande amplitude sont observées. Pour la consommation de substrat ces oscillations peuvent atteindre jusqu'à 60 g.L<sup>-1</sup> de glucose, et jusqu'à 30 g.L<sup>-1</sup> d'éthanol pour la production d'éthanol (Chen et col., 2005; Bai et col., 2008(b)). De plus, la lyse et la diminution de la viabilité cellulaire au cours du temps ne permettrait pas la production continue sur de longues périodes (Bai et col., 2004), il serait donc nécessaire de ré-inoculer le système en cours de fermentation.

## **I.5. Conclusion sur l'état de l'art**

Le travail bibliographique a permis d'obtenir des connaissances générales sur le travail à mener ainsi qu'une vue globale de la filière éthanol. Dans des conditions environnementales et nutritionnelles appropriées *Saccharomyces cerevisiae* est capable de produire et de tolérer des concentrations élevées en l'éthanol (Bvochora et col., 2000). Afin de résoudre les problèmes liés à l'utilisation des milieux à haute densité deux possibilités se présentent; une portant sur l'optimisation des milieux et l'autre sur le procédé en lui-même.

Au vu des nombreux paramètres et de leurs interactions éventuelles influençant la production d'éthanol présentés dans cet état de l'art, il s'est avéré qu'il n'était pas possible au cours du délai imparti pour ces travaux de thèse de réaliser un travail exhaustif. Une stratégie de recherche a donc dû être mise au point afin d'obtenir en fin de fermentation des vins contenant plus 15 % (v/v) d'éthanol. Cette stratégie a consisté en trois points principaux :

- rechercher une composition de milieu de fermentation permettant d'augmenter la concentration finale en éthanol
- déterminer si les besoins en nutriments se limitent uniquement à la phase de croissance ou au contraire si l'apport de ces nutriments était bénéfique tout au long de la fermentation
- utiliser l'ensemble des résultats obtenus pour définir un procédé complet, milieux et conduite de fermentation, permettant d'obtenir la concentration finale en éthanol la plus élevée possible

L'objectif final de ces travaux de thèse sur l' « Intensification de la brique fermentation alcoolique de substrats betteraviers pour la production d'éthanol » est de proposer une solution pour augmenter la concentration en éthanol dans les milieux en fin de fermentation en industrie. Cependant, la bibliographie réalisée jusqu'ici n'a concerné que la théorie sur la production d'éthanol. Il manque donc une partie essentielle à l'aboutissement du projet concernant les réalités industrielles. Pour pallier ce manque, il a été nécessaire d'effectuer des visites dans différents ateliers de production d'éthanol afin de découvrir les enjeux et les difficultés rencontrés par les acteurs de la filière éthanol. Ceci sera présenté dans la première partie des résultats et a permis d'orienter les travaux de recherches qui ont suivi.



# **Chapitre II :**

# **Matériels et Méthodes**

## II. Matériels et Méthodes

### II.1. Le matériel biologique

La levure principalement utilisée au cours des expériences présentées partie III., était la levure *Saccharomyces cerevisiae* souche C10 (nom commercial : 46 EDV, Lallemand). Cette levure a été fournie par L'UNGDA sur une gélose Sabouraud chloramphénicol en pente inclinée. La souche C10 a été isolée par Michel De Miniac à partir de prélèvements réalisés en atelier de production d'éthanol en 1994.

Les autres souches, utilisées uniquement pour le test comparatif (partie III.2.4. Etude de différentes souches de *Saccharomyces cerevisiae*), ont toutes été fournies sous forme de levure sèche :

- la souche Angel Super Alcohol Active Dry Yeast (molasses base) de la société Angel yeast Co
- la souche Ethanol Red de la société Fermentis
- la souche Hironnelle Bleue de la société Lesaffre
- la souche X (souche pour la production d'alcools)

### II.2. Les milieux de culture

#### II.2.1. Conservation des souches

Les souches ont été repiquées en milieu liquide YEPD (40 g.L<sup>-1</sup> de glucose, 15 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure et 10 g.L<sup>-1</sup> de peptone), agité à 150 rpm (rotation par minute) (INFORS AG CH-4103, Bottingen), à 30°C pendant 24h. Ces souches ont par la suite été repiquées sur pentes gélosées composées de milieu YEPD additionné de 20 g.L<sup>-1</sup> d'agar, et conservées à 4°C pour des utilisations ultérieures. Ces milieux, avant utilisation, ont été stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 20 minutes.

#### II.2.2. Précultures

Les précultures, ont été réalisées en milieu YEPD (40 g.L<sup>-1</sup> de glucose, 15 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure (AES Chemunex) et 10 g.L<sup>-1</sup> de peptone de soja). Ces précultures ont été inoculées à partir des pentes gélosées servant à conserver la souche C10. Ces milieux, avant utilisation, ont été stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 20 minutes. Les précultures ont ensuite été placées dans un agitateur orbital (INFORS AG CH-4103, Bottingen) pendant 15h avec une agitation de 120 rpm à 33°C pour les fermentations réalisées à 33 °C et à 30 °C pour les fermentations réalisées à 30 °C. Les concentrations finales en levures dans ces précultures étaient d'environ 2 x10<sup>8</sup> levures.mL<sup>-1</sup>.

#### II.2.3. Inoculation

Une aliquote suffisante du milieu de préculture a été prélevée puis centrifugée (5000 g, 10 minutes), rincée à l'eau stérile, à nouveau centrifugée, rincée à l'eau stérile une seconde fois et centrifugée une troisième fois. Ceci afin de permettre l'inoculation des milieux de fermentation à environ 1 x10<sup>7</sup> levures.mL<sup>-1</sup>, à part pour la série d'expériences nommée III.2.4.2, pour laquelle la quantité d'inoculum était comprise entre 10<sup>6</sup> et 5 x10<sup>8</sup> levures.mL<sup>-1</sup> selon les fermentations.

#### II.2.4. Composition des milieux de fermentation

Les milieux ont été réalisés par dilution de SBP (annexe 4), dans de l'eau stérilisée à 121°C pendant 20 minutes. Le SBP a été fourni par un atelier de production en bidons de 10 L conservés à température ambiante. Au cours de ces travaux de thèse, trois différents lots de SBP ont été utilisés, présenté tableau 10. Ce substrat est très visqueux et difficile à homogénéiser dans les bidons surtout lorsqu'ils sont pleins. La composition de ce substrat a donc pu varier en fonction des lots et du niveau du bidon.

**Tableau 10 : Résultats des analyses des concentrations en sucre et en azote assimilable des SBP utilisés pour chaque chapitre. Les concentrations en sucre sont issues des dosages fait par l'UNGDA et les concentrations en azote assimilable ont été mesurées comme expliqué partie II.4.5.**

Concentration en sucre (g <sub>équivalent saccharose</sub> .L <sup>-1</sup> )	Concentration en azote assimilable (mg.L <sup>-1</sup> )	Chapitres correspondants
606	497 (+/- 24)	III.2.1 à III.2.3
598	501 (+/- 25)	III.2.4 à III.2.7
587	512 (+/- 25)	III.3.1 à III.3.3

Ceci explique que les résultats des fermentations aient été comparés systématiquement à des expériences références (cf partie II.5. Screening des composés bénéfiques pour la production d'éthanol). Pour l'ensemble des expériences :

- l'azote ajouté a été apporté par une solution d'ammoniaque à 35 % (Analytical reagent grade, Fisher Scientific)
- le phosphore a été apporté par ajout d'une solution d'acide orthophosphorique à 85 % (Laboratory reagent grade, Fischer Scientific)
- l'acidité a été fixée à 2 g.L<sup>-1</sup> avec de l'acide sulfurique (Analytical reagent grade, Fisher Scientific)

Pour la partie III.5. Screening des composés bénéfiques pour la production d'éthanol :

- les solutions utilisées pour la réalisation du test MS300 sont présentées Annexe 1 avec les volumes utilisés de chaque solution par litre de milieu final
- tous les ions utilisés l'ont été sous leurs formes de sels de sulfate polyhydratés
- les différentes huiles testées étaient toutes de marque Lessieur
- les extraits de levures (Prolabo) et les compléments A, B et C ont été utilisés sous leur forme de poudre

Pour les expériences III.3. Recherche du type de fermentation le plus performant :

- les extraits de levures (Prolabo) ont été utilisés à 1 g.L<sup>-1</sup>
- le magnésium ([MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O]) à 120 mg.L<sup>-1</sup>
- l'antimousse Ouvrie 922k à 50 µL.L<sup>-1</sup>
- les vinasses utilisées ont été transportées congelées à partir d'un atelier de production et ont été conservées à -20 °C jusqu'à utilisation.

Différents paramètres ayant été étudiés, la composition des milieux a varié selon les expériences. Si la stérilité n'a pas été totale dans les expériences, une attention toute particulière a cependant été portée au maintien de l'asepsie. En effet, le SBP contient naturellement des micro-organismes et celui-ci n'a jamais été stérilisé avant utilisation. En cas de développement bactérien les expériences, contrôlées au microscope, ont été arrêtées et les résultats n'ont pas été retenus.

## II.3. Cultures

### II.3.1. Cultures en erlenmeyer

Les fermentations qui ont été effectuées dans des erlenmeyers de 500 mL contenaient 200 mL de chaque milieu. Les incubations ont eu lieu à 33 °C avec une agitation de 120 rpm (INFORS AG CH-4103, Bottingen).

Le suivi des fermentations en erlenmeyer a été réalisé par des pesées successives, toutes les deux heures, des erlenmeyers contenant les différents milieux. En parallèle, un témoin a servi à évaluer la perte de masse imputable à l'évaporation (en moyenne  $0,04 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ). Cette solution témoin, contenue dans un erlenmeyer de 500 mL, était composée de 190 mL d'eau stérilisée, de 10 mL d'éthanol et de 20 g de glucose. Les prélèvements pour analyses, ont été effectués lorsque deux pesées successives étaient identiques à 0,1 g près, car à ce moment la perte de masse causée par la production de  $\text{CO}_2$  accompagnant celle d'éthanol, a été considérée comme nulle et donc l'activité fermentaire aussi. Une heure après ce premier prélèvement, un second prélèvement a été effectué afin de s'assurer de la fin de la fermentation.

Ces prélèvements ont permis de réaliser, des comptages et des mesures de viabilité ainsi que les dosages de l'éthanol et des sucres. Ces dosages ont été réalisés par HPLC sur les surnageants obtenus après centrifugation des prélèvements.

### II.3.2. Cultures en réacteur

Le suivi des réacteurs a été réalisé en prélevant des échantillons toutes les deux heures et ce jusqu'à stabilisation des concentrations en sucre et en éthanol. Comme pour les fermentations en erlenmeyer ces prélèvements ont permis de réaliser, d'une part des comptages et des mesures de viabilité et d'autre part les dosages de l'éthanol et des sucres. Ces dosages ont été réalisés par HPLC sur les surnageants obtenus après centrifugation des prélèvements.

Les réacteurs utilisés étaient tous équipés d'un agitateur mécanique à pale droite, d'un régulateur de température et d'un condenseur au niveau de la sortie des gaz. L'aération a pu être contrôlée par des manodétendeurs associés à des rotamètres. Deux types de réacteurs ont été utilisés pour réaliser les fermentations selon les expériences :

- pour les batch et les continus, des réacteurs Sétric de type Set 2 d'un volume utile de 1,6 L
- pour les fed-batch, un réacteur LH Inceltech Series 210 d'un volume utile de 4 L

### II.3.3. Mesure du $K_L a$

L'aération du milieu de culture permet d'oxygéner le milieu mais aussi de diminuer la quantité de dioxyde de carbone dissous. L'oxygène est consommé et le dioxyde de carbone est produit tout au long de la fermentation. Les échanges se font à travers trois obstacles, le film gazeux, l'interface et le film liquide. La vitesse de transfert s'écrit :

$$\text{OTR} = d\text{CL}/dt = K_L a (C^* - \text{CL}) \quad (\text{eq4})$$

Avec:

- OTR, la quantité d'oxygène échangée par unité de temps et par unité de volume ( $\text{moles.m}^{-3}.\text{s}^{-1}$ ) ou taux de transfert en oxygène
- t le temps en secondes
- $K_L$ , coefficient de transfert de masse ( $\text{m.s}^{-1}$ )
- a, l'aire totale d'échange par unité de volume ( $\text{m}^2.\text{m}^{-3}$ )
- $C^*$ , la concentration en oxygène à saturation de la phase liquide en équilibre avec la phase gazeuse ( $\text{mol.m}^{-3}$ )
- CL, la concentration en oxygène de la phase liquide ( $\text{mol.m}^{-3}$ )

Le produit  $K_L a$  est une mesure de la capacité d'aération du bioréacteur sous les conditions d'étude. Plus le  $K_L a$  est important, plus la capacité d'aération est grande. Les facteurs qui influent sur cette capacité sont, pour une géométrie de réacteur et une vitesse d'injection données, la vitesse d'agitation, la composition du milieu, la rhéologie, la température, le pH et la présence d'agent antimousse.

Pour la détermination du  $K_L a$ , un bullage à l'azote a d'abord été réalisé dans le réacteur afin d'éliminer l'oxygène dissous contenu dans le milieu. Puis, l'azote a été remplacé par de l'air. La

concentration en oxygène de la phase liquide augmente alors. La détermination du  $K_{L,a}$  s'obtient par la pente de la courbe  $\log(C^*/(C^*-C_L))$  en fonction du temps dans la phase ascendante (phase d'aération). Les valeurs en apport d'oxygène présenté dans la partie III. correspondent à des estimations. En effet, le transfert d'oxygène dépendant de la composition du milieu qui varie en fonction du temps durant la fermentation (production d'éthanol, consommation de sucre...) les vitesses de transfert ont été évaluées sur des milieux exempts de levure. Les mesures de  $K_{L,a}$ , présentées tableau 11 ont été faite sous une agitation de 120 rpm en considérant  $C_L$  nul et en utilisant le  $C^*$  de l'eau à 33°C avec des aérations de 1 et 10 vvh dans les réacteurs Setric Set 2.

**Tableau 11: Mesure des  $K_{L,a}$  et des transferts d'oxygène pour les réacteurs Setric Set 2 utilisés à 33°C sous 120 rpm d'agitation.**

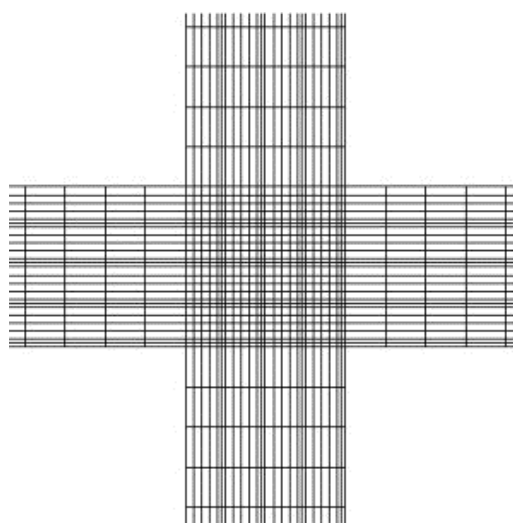
Aération	Concentration en sucre (g.L <sup>-1</sup> )	$K_{L,a}$ (h <sup>-1</sup> )	Transfert d'oxygène (ppm.h <sup>-1</sup> )
1 vvh	140	0,800	2,1
	160	0,216	1,5
	190	0,180	1,3
	240	0,108	0,8
10 vvh	160	0,972	6,9
	240	0,792	5,6

## II.4. Méthodes de suivi des fermentations

### II.4.1. Numération cellulaire

La numération cellulaire permet d'estimer la biomasse totale. Cette numération a été effectuée par comptage des levures sur une cellule de Thoma. Cette cellule est une lame de microscope comportant une cavité de 0,1 mm bordée par deux sillons de chaque côté, eux-mêmes bordés par deux épaulements. Le fond de la cavité comporte un quadrillage de 1 mm<sup>2</sup> formé de 16 grands carreaux, chacun subdivisé en 16 petits carreaux, comme illustré figure 13. Les comptages ont été réalisés sur 5 grands carreaux non adjacents, avec un grossissement de 400 fois sous lumière blanche.

Pour le dénombrement, il est nécessaire de diluer l'échantillon pour obtenir entre 30 et 60 cellules par grand carreau. Afin de minimiser les erreurs, il faut compter entre 150 et 300 cellules sur l'ensemble des grands carreaux comptés (Lang et col., 1993).



**Figure 13: Schéma du quadrillage présent dans la cavité de la cellule de Thoma.**

La concentration cellulaire  $C$  exprimée en cellules par millilitre est donnée par la relation suivante :

$$C = (\text{nombre de cellules comptées} / \text{nombre de grands carreaux}) \times \text{dilution} \times 0,25 \times 10^6 \quad (\text{eq5})$$



### II.4.2. Estimation des cellules viables

Le bleu de méthylène, ou bis-diméthylamino-3,7 phénazathionium chlorure, est un indicateur coloré d'oxydo-réduction. Sa forme oxydée est bleue tandis que sa forme réduite est incolore. Le bleu de méthylène est un colorant vital, c'est-à-dire qu'il permet de différencier les cellules actives vivantes des cellules inactives. Pour réaliser la coloration, 500  $\mu\text{L}$  d'une solution de bleu de méthylène (1  $\text{g.L}^{-1}$  de bleu de méthylène et 20  $\text{g.L}^{-1}$  de citrate de sodium) sont mélangés à 500  $\mu\text{L}$  d'une suspension de levures suffisamment diluée, puis une goutte de ce mélange est déposée entre lame et lamelle.

Dans le cas de la coloration au bleu de méthylène des levures, les cellules actives sont incolores, les cellules inactives, quant à elles sont colorées en bleu foncé. La différence de couleur s'explique par le potentiel rédox régnant dans les cellules actives qui permet de réduire le bleu de méthylène en sa forme incolore. Cette technique permet d'apprécier de façon assez précise le pourcentage de cellules actives contenues dans une suspension de levures.

### II.4.3. Le pH

Le pH a été mesuré à l'aide du pH-mètre CG 822 de Schott Geräte. Une microsonde pH, de 5 mm de diamètre, a été utilisée afin de minimiser les besoins en échantillon pour la mesure du pH. Le pH a donc pu être mesuré directement dans un tube Eppendorf de 2 mL. Cette mesure étant rapide mais variable en fonction de la concentration en matière sèche, la mesure d'acidité a également été effectuée. Dans l'ensemble des fermentations réalisées le pH était compris entre 4,7 et 5,2 en fonction des expériences.

### II.4.4. Mesure de l'acidité

Afin de limiter le développement des bactéries dans le milieu de fermentation apportées par le SBP, de l'acide sulfurique a été ajouté. L'acidité recherchée était de 2  $\text{g.L}^{-1}$ . Cette valeur est issue de la moyenne de l'acidité recherchée dans les distilleries. Les milieux utilisés, à base de SBP, étant basiques, ils ne possèdent pas d'acidité à proprement dit. L'acidité provient donc uniquement de l'acide ajouté.

Le dosage de l'acidité consiste en la neutralisation des acides contenus dans les milieux par de la soude à 0,1  $\text{mol.L}^{-1}$ . Pour chaque composition de milieu, 100 mL ont été préparés. Ces milieux ont ensuite été additionnés de soude jusqu'à atteindre le pH de 7. L'acidité totale s'exprime en gramme d'acide sulfurique par litre. Le calcul est donc :

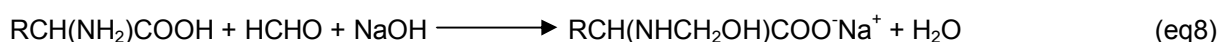
$$A = (98 \times C_b \times V_b) / (2 \times V_e) \quad (\text{eq6})$$

Avec A l'acidité,  $C_b$  la concentration en base en  $\text{mol.L}^{-1}$ ,  $V_b$  le volume de soude ajouté en mL et  $V_e$  le volume d'échantillon en mL. Le facteur 98 correspond à la masse molaire de l'acide sulfurique.

Le dosage nous a permis, en début de fermentation de vérifier l'acidité du milieu. L'acidité étant un indicateur de contamination, ce dosage a aussi permis en fin de fermentation d'estimer la contamination des milieux par des bactéries.

### II.4.5. Dosage de l'azote assimilable

L'azote assimilable (azote aminé et ammoniacal) est nécessaire pour le développement levurien. La détermination de l'azote assimilable a été réalisée par formol titration (Levy, 1932). Les cations ammonium ainsi que les amines primaires, à des pH proches de 7, réagissent avec le formaldéhyde, libérant une quantité équivalente de protons qui peut être dosée par la soude. Les réactions sont illustrées, pour le dosage de l'ammonium (équation 7) et pour le dosage des amines primaires (équation 8).



Ce dosage ne permet de doser que les amines primaires, il est donc impossible de doser des acides aminés telle la proline. L'azote assimilable est exprimé en milligramme d'azote assimilable par litre.

Pour réaliser ce dosage le pH des solutions a été ajusté à 7,5 par l'ajout d'acide sulfurique, puis les solutions ont été filtrées sur papier Wattman. Une fois les solutions filtrées, 25 mL de formaldéhyde 37% ont été ajoutés. Après 5 minutes de réaction, le milieu a été titré à la soude jusqu'à atteindre le pH initialement fixé.

Le dosage de l'azote assimilable a été réalisé deux fois sur deux solutions de 100 mL composées de 100 g de SBP ajusté à 100 mL avec de l'eau distillée. Afin de vérifier la véracité des résultats, il fut aussi dosé simultanément deux autres solutions de 100 mL :

- une composée de 100g de SBP additionnés de 0,5 g de phosphate diammonique qsp 100 mL avec de l'eau distillée. Nommée SBP +  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

- une composée de 0,5 g de phosphate diammonique dissous dans de l'eau distillée, soit 1060 mg d'azote par litre. Nommée  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  + ED

**Tableau 12: Résultats des dosages d'azote assimilable réalisés à pH 7,5.**

	SBP	SBP + $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ + ED
Azote assimilable ( $\text{mg}_\text{N}.\text{kg}^{-1}$ )	497(+/- 24)	1526 (+/- 81)	1067 (+/- 31)

Les valeurs obtenues, illustrées tableau 12, pour le SBP additionné de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  sont identiques à la valeur obtenue pour le cumul des valeurs SBP et  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  + ED. Des dosages similaires ont été réalisés à chaque changement de lot de SBP. Tous ont révélé des concentrations comprises entre 497 et 514  $\text{mg}_\text{N}.\text{kg}^{-1}$ . L'erreur observée sur ce dosage sur le SBP est de +/- 4,8%.

Le SBP contient donc de l'azote dit assimilable, à hauteur de 497  $\text{mg}.\text{L}^{-1}$ . Cependant, le dosage permet de doser l'azote ammoniacal qui est assimilable par *Saccharomyces cerevisiae*, mais aussi l'azote  $\alpha$ -aminé, qui peut être porté par d'autres molécules que des acides aminés, qui ne seront pas assimilables par cette levure. Il est donc possible d'affirmer que dans un milieu contenant 300  $\text{g}.\text{L}^{-1}$  de sucre (équivalent saccharose) il y a un maximum de 220 mg d'azote assimilable par litre de milieu.

#### II.4.6. Dosage de l'azote total

Les dosages de l'azote total ont été réalisés à l'aide du kit Nitrogen Total (Test'N tube). Les composés azotés organiques et inorganiques y sont transformés en nitrates à l'aide d'une solution alcaline de persulfate. Par la suite, le métabisulfite de sodium est ajouté afin d'éliminer d'éventuelle trace d'oxyde d'halogénure pouvant interférer avec la réaction de coloration. Les nitrates réagissent enfin avec un acide chomatropique en milieu acide pour former un complexe jaune mesuré à une absorbance maximale de 420 nm par rapport à une gamme d'étalonnage.

#### II.4.7. Dosage de l'éthanol et des sucres

La mise au point d'une méthode permettant l'analyse de l'éthanol, du glucose, du fructose et du saccharose dans le SBP a nécessité de nombreux essais. Différentes températures, phases mobiles et débits ont été testés. L'objectif était de trouver une méthode unique permettant de qualifier et de quantifier tous les composés souhaités dans les milieux de fermentation, l'éthanol produit, le saccharose apporté ainsi que le glucose et le fructose issus de l'hydrolyse du saccharose par la levure. Une bonne séparation des pics a donc été le paramètre primordial. Une fois l'optimisation de la méthode pour la séparation de pics réalisée, il a été possible d'établir une gamme d'étalonnage en injectant des échantillons à des concentrations précises, en mesurant la réponse de chaque composé et en traçant une droite d'étalonnage spécifique à chaque composé. Afin de confirmer l'absence d'interaction lors du dosage de plusieurs composés, il est nécessaire de faire des solutions mélanges aux concentrations de gammes individuelles, et de vérifier les taux de réponse de chacun des composés. Une fois ceci fait, différents composés peuvent être dosés dans un même milieu. L'approche a donc été dans un premier temps qualitative, puis quantitative.

L'HPLC utilisée (modèle ACCELA, Thermo electron corporation) est composée de trois blocs distincts : un bloc contenant les pompes ainsi qu'un dégazeur (ACCELA Pumps), un bloc contenant l'échantillonneur (ACCELA autosampler) et un bloc contenant un détecteur UV et visible (PDA detector). Ce dernier ne servant pas à la détection des composés mais son utilisation est obligatoire pour le fonctionnement de l'appareil. Le détecteur est un appareil externe (Surveyor RI Plus detector, Finnigan) mesurant la différence d'indice de réfraction du liquide circulant dans le système par rapport à la phase mobile seule. Ce détecteur a été placé à 40°C. Les résultats sont exprimés en unité RI signifiant « refraction indice ». Dans nos conditions, la réponse du détecteur est spécifique à la fois, à la molécule, à sa concentration mais aussi à la phase mobile. Le four est un four externe (HPLC Column controller, Thermo Sphere TS-130), utilisé pour maintenir à 30°C la colonne Rezex ROA-H+ de 300 mm sur 7,8 mm (Phenomenex) et la précolonne Security Guard Carbo H+ de 4,0 mm sur 3,0 mm (Phenomenex).

La phase mobile utilisée était composée d'eau ultra-pure additionnée d'acide sulfurique à hauteur de 1,9 mmol.L<sup>-1</sup> à un débit de 170 µL.min<sup>-1</sup>. La phase mobile a été filtrée à 0,2 µm sur membrane de nylon. Les différents étalons ont été préparés à partir de composés purs dans des gammes allant de 0,5 à 4 g.L<sup>-1</sup> pour le glucose et le fructose, de 1 à 8 g.L<sup>-1</sup> pour le saccharose et de 1 à 8 mL.L<sup>-1</sup> pour l'éthanol. Les solutions réalisées à partir de composés solides (glucose, fructose et saccharose) ont été effectuées par pesées de ces composés puis par solubilisation de ceux-ci dans une solution non filtrée mais identique à la phase mobile utilisée pour chaque expérience. Pour l'éthanol, les solutions ont été préparées par mesure du volume. Les différentes gammes ont été réalisées à partir de solution mère diluée en fiole jaugée (pas de dilution en cascade). Les solutions ainsi préparées, ont toutes été filtrées à 0,2 µm par des filtres en nylon adaptables aux seringues avant d'être déposées dans les vials avant injection de 25 µL de l'échantillon (tubes utilisés pour l'injection dans l'HPLC).

Les figures 14 à 17 illustrent des exemples de courbes d'étalonnages obtenues respectivement pour le saccharose, le glucose, le fructose et l'éthanol. Ces courbes d'étalonnages ont été répétées chaque semaine afin de limiter la dérive des résultats causées par l'évolution du matériel. De plus, chaque jour un échantillon de concentration connue a aussi été réalisé afin de confirmer les dosages journaliers. Ceci a permis d'obtenir des résultats pour les dosages avec des erreurs relatives pour l'éthanol de +/- 0,7%, pour le fructose de +/- 0,6%, pour le glucose de +/- 0,3% et pour le saccharose de +/- 0,7%.

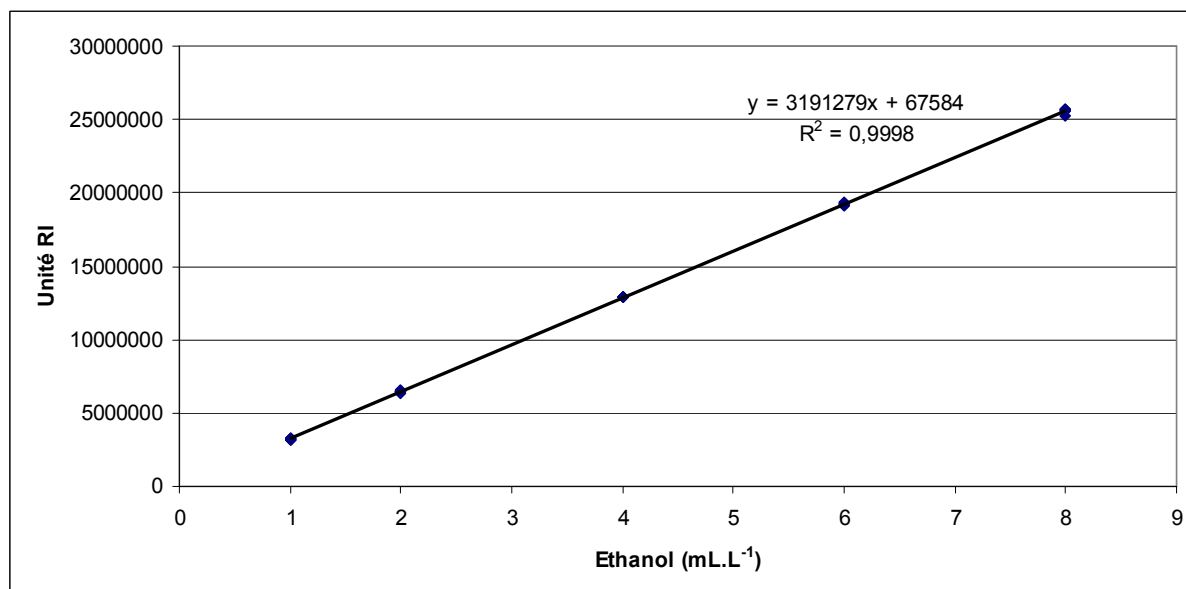


Figure 14: Droite d'étalonnage de l'éthanol dosé par HPLC.

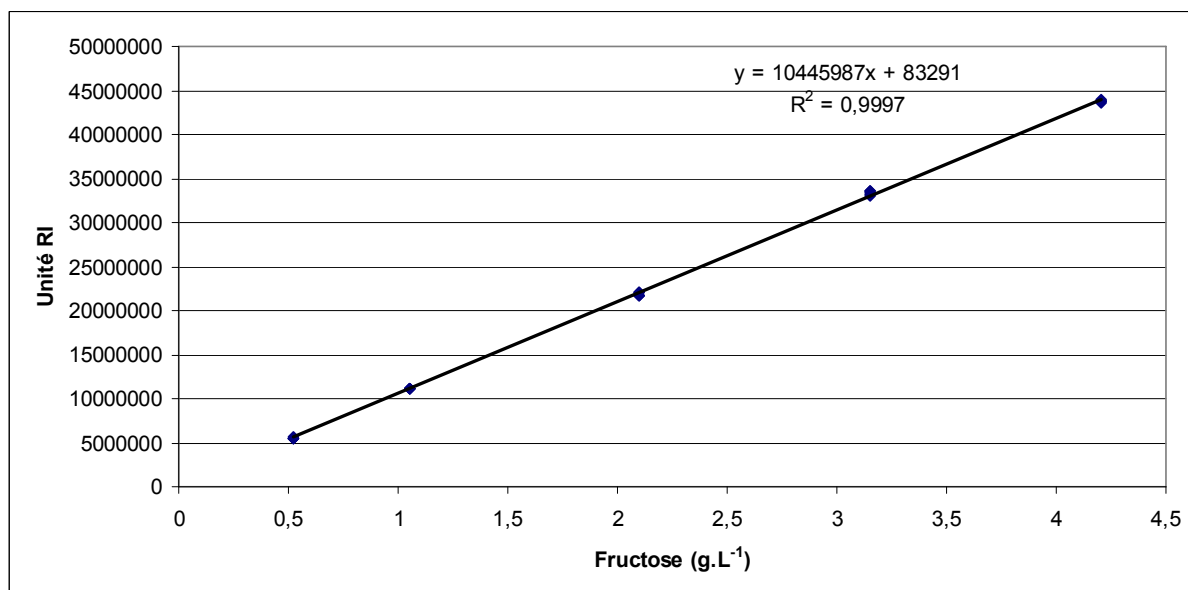


Figure 15: Droite d'étalonnage du fructose dosé par HPLC.

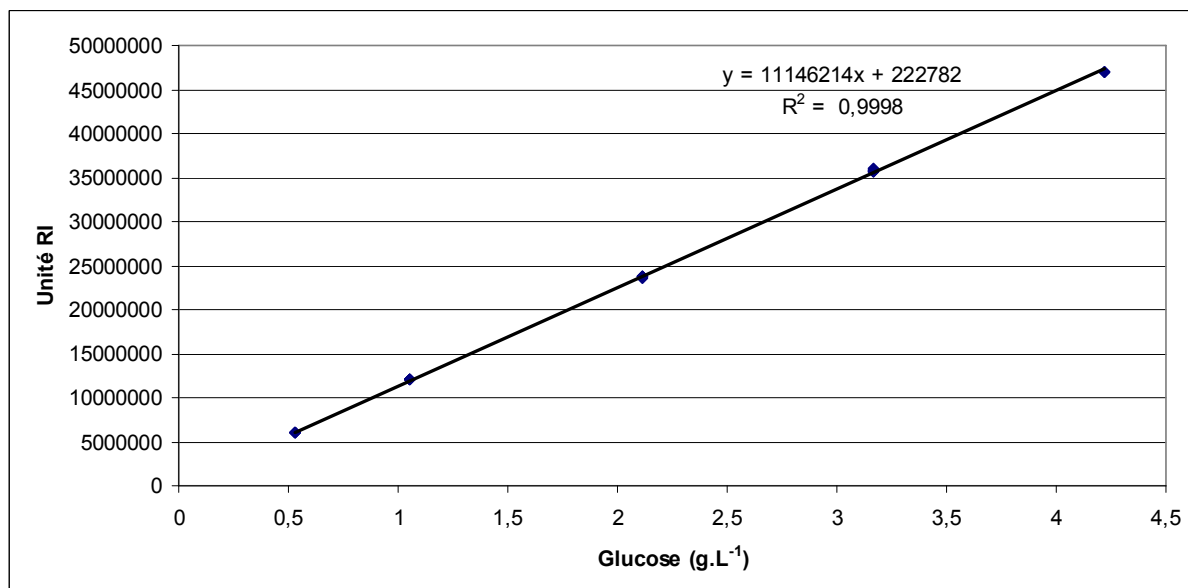
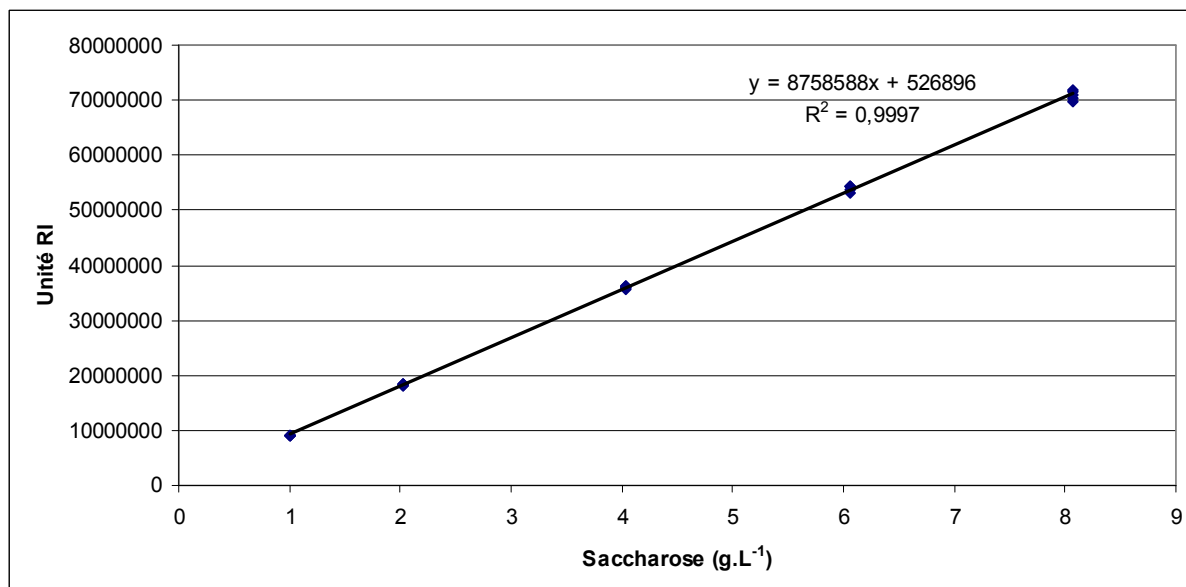


Figure 16: Droite d'étalonnage du glucose dosé par HPLC.



**Figure 17: Droite d'étalonnage du saccharose dosé par HPLC.**

Les concentrations en saccharose, glucose et fructose sont exprimées dans la suite des travaux sous une même et unique concentration appelée concentration équivalent saccharose calculée comme suit :

$$C_{\text{équivalent saccharose}} = C_{\text{saccharose}} + 0,95 \times (C_{\text{glucose}} + C_{\text{fructose}}) \quad (\text{eq9})$$

## II.5. Screening des composés bénéfiques pour la production d'éthanol

Afin de mesurer l'effet d'un composé sur l'ensemble de la fermentation, les erlenmeyers de 500 mL contenaient 200 mL du même milieu à une concentration de sucre de 300 g.L<sup>-1</sup>, d'azote ajouté de 31 mg.L<sup>-1</sup> et de phosphore de 151 mg.L<sup>-1</sup>. Dans chaque erlenmeyer un composé testé a été ajouté. Cependant afin d'éviter toute dérive de série, pour chacune de ces séries d'expériences les fermentations ont été comparées par rapport à milieu sans ajout utilisé comme référence. Toutes ses séries d'expériences ont été réalisées deux fois. Le suivi a été réalisé comme décrit partie II.4.

## II.6. Technique des pulses en culture continue

Les fermentations continues, pour la réalisation des pulses, ont été effectuées dans des fermenteurs Sétric de type « Set 2 » d'une capacité de 1,6 L, thermostatés à 33°C sous une agitation de 120 rpm. Une première phase de batch a eu lieu pendant 24h dans ce réacteur contenant 1 L de milieu, 220 g.L<sup>-1</sup> de sucre équivalent saccharose, 31 mg.L<sup>-1</sup> d'azote, de 151 mg.L<sup>-1</sup> de phosphore et une acidité de 2 g d'acide sulfurique par litre. Ce milieu a étéensemencé avec la souche C10 à une concentration de 10<sup>7</sup> levures.mL<sup>-1</sup>.

Le réacteur a ensuite fonctionné en mode continu en alimentant par du milieu optimum frais et en soutirant au même débit jusqu'à stabilisation des paramètres suivis sur au moins 24 h. Le milieu d'alimentation a été conservé dans une bonbonne en polypropylène sous agitation constante et thermostatée à 6 °C. Le temps de séjour (correspond au débit divisé par le volume de milieu contenu dans le réacteur) était de 52 h afin de stabiliser le réacteur à des valeurs d'environ 110 g.L<sup>-1</sup> de sucre et de 7 % d'éthanol ce qui correspond au milieu de la fermentation. Ceci a permis de mesurer à la fois l'effet du composé injecté sur la consommation de sucre et la production d'éthanol.

Le schéma du montage utilisé est illustré figure 18. Une même pompe péristaltique Gilson (Minipuls 3) a été utilisée pour contrôler les débits d'entrée et de sortie du réacteur. Le milieu frais est introduit au fond du réacteur et le milieu est repris en surface pour éloigner le plus possible l'alimentation de la vidange.

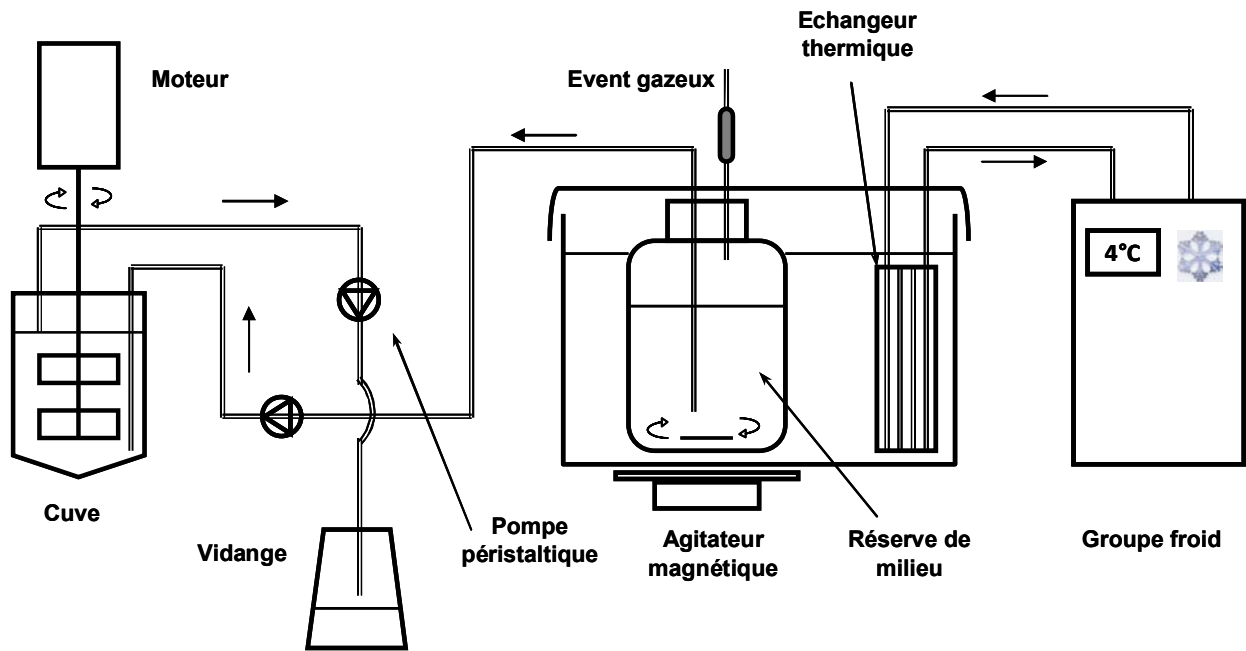


Figure 18: Schéma du montage utilisé pour la réalisation des pulses.

La technique des pulses permet de mesurer l'effet de l'ajout d'un composé au milieu de culture lors d'une fermentation continue. Une fois l'état stationnaire atteint, un composé est injecté directement dans le réacteur. Lorsque ce composé n'est ni limitant ni inhibiteur dans le milieu, aucune perturbation de l'état stationnaire n'est observée. Dans le cas contraire, des variations des paramètres (TAV, concentrations en sucres et en levures) sont observées jusqu'à ce que la concentration de ce composé devienne insuffisante (lavage) ou que celui-ci soit épuisé (Khun et col., 1979). La figure 19 illustre ces propos dans le cas d'un composé limitant.

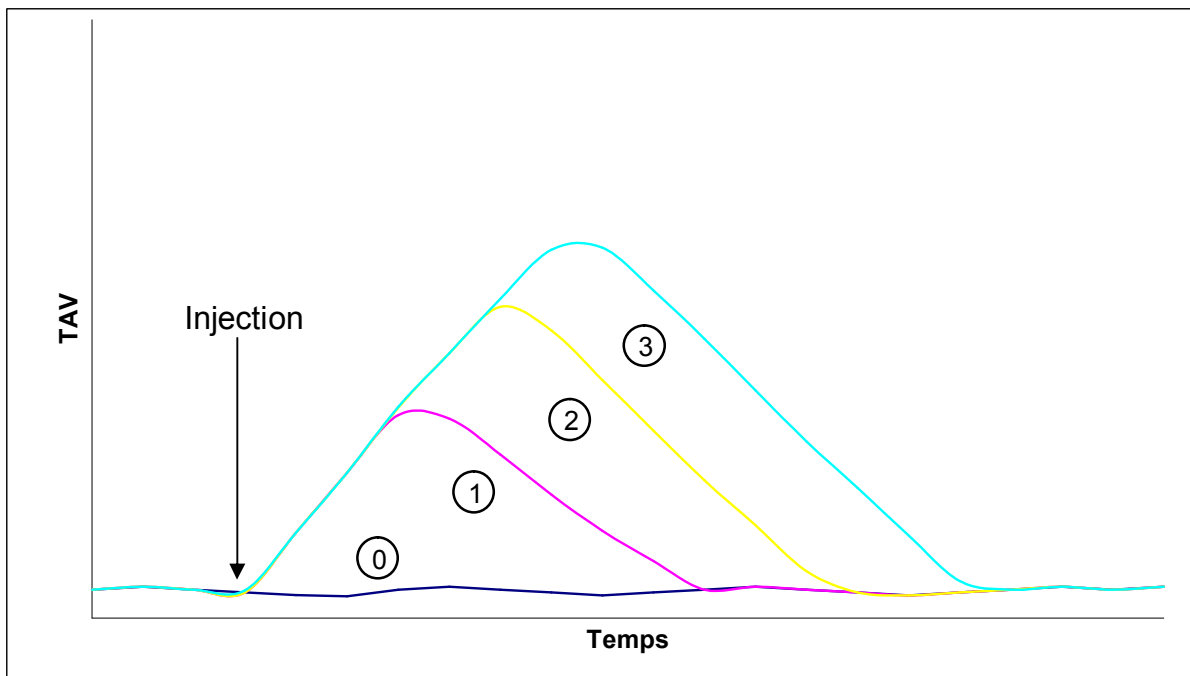


Figure 19: Technique des pulses: réponses attendues pour un composé limitant dans le cadre de la production d'éthanol. Les valeurs 0, 1, 2 et 3 correspondent à concentrations croissantes d'un composé limitant.

Afin d'effectuer le suivi lors de la mise en œuvre de cette technique, quatre prélèvements ont été réalisés par jour pour mesurer la viabilité et les concentrations en levure par comptage et les concentrations en sucre et en éthanol sur les surnageants par HPLC, et ce jusqu'à retour à l'état initial. Le jour de l'injection, le nombre de prélèvements a été porté à 12.

## II.7. Réalisation des fermentations batch multi-étagées

Les fermentations batch étagées ont été effectuées dans des fermenteurs Sétric de type « Set 2 » d'une capacité de 1,6 L, thermostatés à 33°C ou 30 °C sous une agitation de 120 rpm. Comme illustré figure 20 pour le batch bi-étagé, une première phase de batch a eu lieu pendant 12h dans ce réacteur contenant 1 L de milieu composé de 160 g.L<sup>-1</sup> de sucre équivalent saccharose, 31 mg.L<sup>-1</sup> d'azote ajouté, de 151 mg.L<sup>-1</sup> de phosphore ajouté et une acidité de 2 g d'acide sulfurique par litre, 50 µL.L<sup>-1</sup> d'antimousse Ouvrie 922 k, qui a été ensemencé avec la souche C10 à une concentration d'environ 10<sup>7</sup> levures.mL<sup>-1</sup>. Cette phase a été appelée phase de propagation.

Après ces 12h de fermentation, un tiers du milieu de propagation (333 mL) a été transféré dans un autre réacteur Sétric Set 2 et mélangé avec deux tiers de milieu frais (667 mL) composé de 360 g.L<sup>-1</sup> de sucre équivalent saccharose, 31 mg.L<sup>-1</sup> d'azote ajouté, de 151 mg.L<sup>-1</sup> de phosphore ajouté, une acidité de 2 g d'acide sulfurique par litre et 50 µL.L<sup>-1</sup> d'antimousse Ouvrie 922 k. Le milieu ainsi obtenu contenait donc après homogénéisation, 240 g.L<sup>-1</sup> de sucre équivalent saccharose apporté par le milieu frais ainsi que des sucres résiduels provenant de la phase de propagation. Ce qui fait que sur l'ensemble de la fermentation un total de 300 g.L<sup>-1</sup> de sucre a été apporté. Cette phase a été nommée phase de production et s'est poursuivie jusqu'à stabilisation de la concentration en éthanol.

Pour la fermentation batch tri-étagée illustrée figure 21 les conditions étaient identiques à l'exception que les concentrations en sucre des trois étages étaient en début de fermentation respectivement ; 160, 190 et 140 g.L<sup>-1</sup> plus des sucres résiduels provenant des transferts. Pour cette fermentation, 12 h après l'inoculation, un tiers du volume de la phase 1 a été transféré dans la phase 2, puis 24 h après le premier transfert, deux tiers de la phase 2 ont été transférés dans la phase 3. La phase 3 s'est poursuivie jusqu'à stabilisation de la concentration en éthanol.

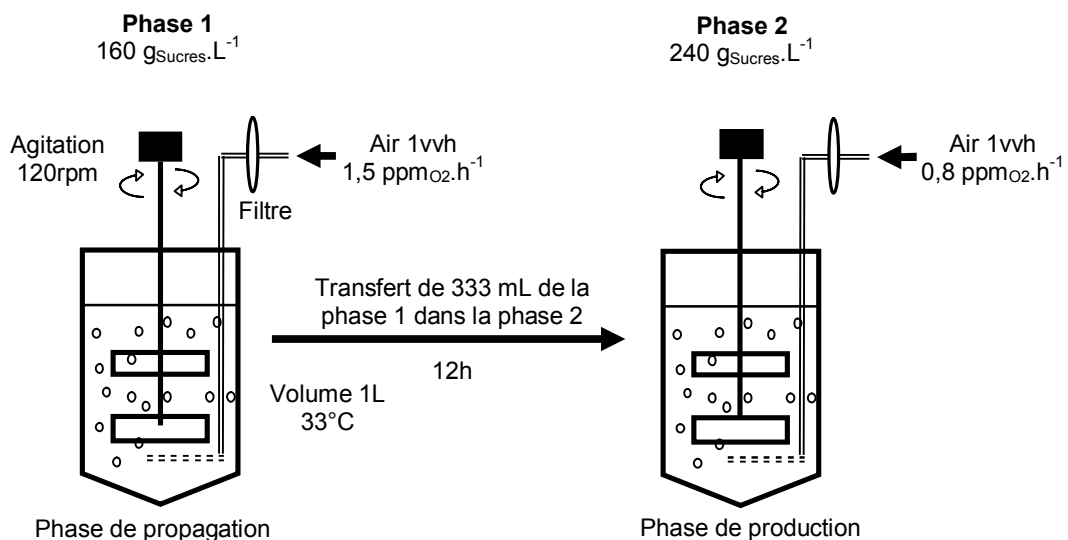


Figure 20: Schéma de la fermentation bi-étagée

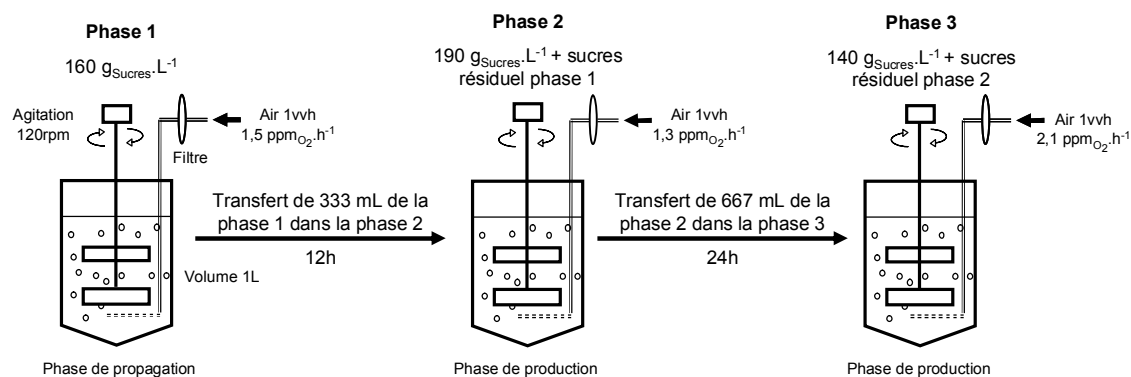


Figure 21: Schéma de la fermentation tri-étagée

## II.8. Réalisation des fermentations en fed-batch

Les fermentations en fed-batch, présentées figure 22, correspondent à une fermentation avec une infinité d'étages. Ces fermentations ont été réalisées en réacteur 4 L (LH Inceltech Series 210) à 30 °C ou 33 °C avec une aération de 1 vvh et une agitation de 150 rpm. L'alimentation des réacteurs a été effectuée à l'aide d'une pompe péristaltique (Gilson). Comme en industrie, ces fermentations étaient divisées en trois phases ; la première en milieu léger (faible concentration en sucre) servant à la propagation de la biomasse associée à une production d'éthanol, la seconde correspondant à l'alimentation du réacteur en milieu frais, conservé au frais sous agitation, et servant à la production d'éthanol et la dernière, sans ajout ni soutirage de milieu, servant à épuiser autant que possible le sucre contenu dans le milieu avec une lente production d'éthanol. Cette dernière phase a duré jusqu'à stabilisation de la concentration en éthanol dans le milieu.

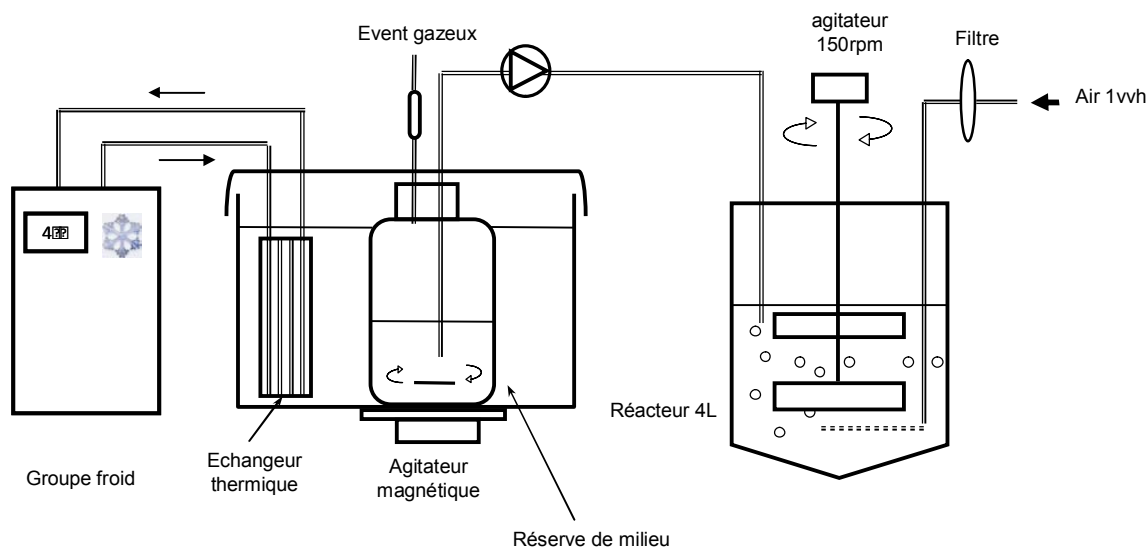


Figure 22: Schéma de la fermentation en fed-batch

Deux stratégies différentes ont été testées, la première avec des conditions opératoires adaptées de ce qui est actuellement fait en industrie (Méthode 1) avec une phase de propagation courte de 6 heures dans un tiers de la cuve et une longue phase d'alimentation. La seconde stratégie consistait en une phase de propagation plus longue de trois heures afin d'obtenir en fin de phase de propagation la concentration cellulaire maximale et un milieu de propagation représentant les deux tiers de la cuve (Méthode 2). Le milieu d'alimentation contenait toujours de l'azote et du phosphore ajoutés à hauteurs respectives de 31 mg.L<sup>-1</sup> et 151 mg.L<sup>-1</sup> ainsi que 120 ppm de magnésium et 1 g.L<sup>-1</sup> d'extraits de levure. La concentration en sucre de cette alimentation était toujours de 580 g.L<sup>-1</sup> ce qui correspond à une concentration moyenne en sucre pour le SBP, afin de limiter le nombre d'opérations



de dilution à réaliser en industrie et de pouvoir apporter l'eau uniquement durant une phase de la fermentation.

Le tableau 13 présente les différentes conditions opératoires testées. Seul le fed-batch 3 a eu une alimentation à débit variable calculé en fonction de l'évolution de la vitesse de consommation en sucre observée pour le fed-batch 1, présenté partie III.3.3.2.. Pour les autres fed-batch le débit d'alimentation était de 55,5 mL.h<sup>-1</sup>.

**Tableau 13 : Récapitulatif des conditions opératoires testées en fed-batch**

Fed-batch	Méthode	Propagation			Alimentation			Sucre total (g.L <sup>-1</sup> )	Durée totale (h)	Débit
		Sucre (g.L <sup>-1</sup> )	Volume (% cuve)	Durée (h)	Sucre (g.L <sup>-1</sup> )	Volume (% cuve)	Durée (h)			
1	30 °C Méthode 1	130	33	6	580	67	24	300	77	constant
2	33 °C Méthode 1	130	33	6	580	67	24	300	77	constant
3	30 °C Méthode 1 alimentation variable	130	33	6	580	67	48	300	75	variable
4	30 °C Méthode 2	160	67	9	580	33	24	300	54	constant
5	30 °C Méthode 2 épuisement	160	77	9	580	23	16,3	255	53	constant

Comme présenté partie III.3.3.5., le fed-batch 5 a été réalisé dans des conditions similaires au fed-batch 4 avec cependant un apport de sucre total inférieur, afin d'obtenir en fin de fermentation moins de 2 grammes de sucre résiduel par litre, ce qui est imposé par les producteurs.

## II.9. Plan d'expériences

L'objectif de ce plan d'expériences a été d'optimiser les concentrations en azote et en phosphore ajoutés et en sucre initial afin d'obtenir en fin de fermentation la concentration la plus élevée possible en éthanol dans le milieu en fin de fermentation.

Un plan d'expériences se définit par la mise en œuvre de façon organisée d'un ensemble d'unités expérimentales de manière à révéler les effets de différents paramètres sur une ou plusieurs réponses mesurées. Ainsi, il est nécessaire de faire varier tous les facteurs simultanément afin de mesurer l'impact d'un paramètre mais aussi les interactions entre plusieurs paramètres sur les réponses étudiées. Ceci permet de diminuer à la fois le nombre d'expériences à réaliser, mais aussi l'incertitude sur les résultats des calculs, pour une incertitude donnée des mesures de base (dosages, pesées...).

Le choix de la réalisation d'un plan d'expériences pour optimiser les milieux de cultures est en accord avec les recherches actuelles sur la production d'éthanol. En effet, l'utilisation de plans d'expériences est fréquente dans de nombreuses publications récentes portant sur l'optimisation des milieux de fermentation (Wang et col., 2007 (a) ; Wang et col., 2007 (b) ; Tosun et Ergun, 2007 ; Silva et col., 2008 (b) ; Pereira et col. 2010). Cette littérature a permis de choisir le plan le plus adapté à la problématique étudiée ici. Un plan composite a donc été choisi. Ce plan était composé, d'un plan factoriel complet, d'un plan en étoile et de points au centre. Toutes les expériences réalisées pour ce plan d'expériences ont été effectuées en erlenmeyer.

### II.9.1. Définition des réponses étudiées

Trois réponses ont été retenues pour cette étude :

- Le rendement  $Y_{P/S}$ , afin d'estimer le taux de conversion du sucre (exprimé en équivalent saccharose) en éthanol. Le rendement est exprimé en gramme d'éthanol produit par gramme de saccharose consommé, calculé comme suit :

$$Y_{P/S} = TAV_{\text{finale}} \times 10 \times \text{densité de l'éthanol} / (C_{\text{sucre initial}} - C_{\text{sucre finale}}) \quad (\text{eq10})$$

- Le titre final en éthanol en % (v/v), appelé TAV, dans le but de déterminer les meilleures conditions de production d'éthanol parmi celles testées.

- La productivité en gramme d'éthanol par litre de milieu et par heure, dans le but d'évaluer la vitesse globale de production d'éthanol au cours des fermentations, calculée comme suit:

$$\text{Productivité (g}_{\text{éthanol}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) = TAV_{\text{final}} \times 10 \times \text{densité de l'éthanol} / \text{Durée de fermentation (h)} \quad (\text{eq11})$$

La concentration en sucre résiduel, bien que mesurée pour le calcul du rendement, n'a pas été retenue comme réponse. En effet, celle-ci n'est pas indépendante des paramètres testés car elle dépend fortement de la concentration en sucre initiale lorsque la fermentation est incomplète.

### II.9.2. Construction du plan d'expériences

Un plan d'expériences composite (Box et Wilson, 1951) a été réalisé afin d'étudier l'influence de la concentration en azote ajouté (X1), la concentration en phosphore ajouté (X2) et la concentration initiale en sucre (X3) sur les réponses choisies. Ce plan d'expériences consiste en un plan factoriel complet (Nf = 2<sup>3</sup> expériences) avec un plan étoilé ( $\alpha = \sqrt[4]{Nf} = 1,6818$ ) ainsi que quatre répétitions au centre du domaine étudié servant à mesurer la variabilité de l'ensemble des mesures. Les valeurs réelles Xi ont été calculées pour les différentes variables i d'après l'équation 12 :

$$X_i = (x_i \cdot \Delta x_i) + \bar{X}_i \quad (\text{eq12})$$

Dans laquelle xi est la valeur codée pour la i<sup>ème</sup> variable, Δxi est le pas (variation de la grandeur réelle correspondant à une unité de la variable codée) et Xi est la valeur réelle pour la i<sup>ème</sup> variable correspondant à la valeur codée 0 (valeur centrale de la gamme). Les codes -1 et 1 correspondent respectivement au niveau bas et haut du facteur étudié (Goupy, 2006).

Le tableau 14 présente les valeurs expérimentales réelles correspondantes aux valeurs codées servant à la création de la matrice d'expériences. X1 est la valeur codée pour la concentration en azote, X2 est la valeur codée pour la concentration en phosphore et X3 est la valeur codée pour la concentration en sucre initial.

**Tableau 14: Table de correspondance entre les valeurs réelles et les valeurs codées.**

	Valeurs codées				
	-α	-1	0	1	α
	Valeurs réelles				
X1 (mg <sub>N</sub> ajouté.L <sup>-1</sup> )	32	100	200	300	368
X2 (mg <sub>P</sub> ajouté.L <sup>-1</sup> )	8	35	75	114	142
X3 (g <sub>sucre</sub> .L <sup>-1</sup> )	220	230	245	260	270

Cependant l'utilisation du matériel disponible au laboratoire ne permettant pas d'obtenir exactement les valeurs ciblées pour l'azote et le phosphore (pipette automatique Eppendorf), elles ont été légèrement modifiées, comme illustré tableau 15.

**Tableau 15: Table de correspondance expérimentale entre les valeurs réelles et les valeurs codées pour les concentrations en azote et phosphore.**

valeurs codées	-1,57	-1	-0,14	1	1,57
X1 (mg <sub>N</sub> ajouté.L <sup>-1</sup> )	31	92	185	308	370
valeurs codées	-1,75	-1	0,0013	1	1,99

X2 (mg <sub>P</sub> ajouté.L <sup>-1</sup> )	9	38	76	114	151
--	---	----	----	-----	-----

L'ensemble des valeurs du plan d'expériences est présenté dans le tableau 16. La partie « valeurs codées » correspond à la matrice du plan composite mis en œuvre. Elle est composée de trois sous-parties :

- La première avec les expériences de 1 à 8 correspond au plan factoriel complet
- La seconde avec les expériences de 9 à 14 correspond au plan en étoile
- La troisième avec les expériences de 15 à 18 correspond aux points au centre

**Tableau 16: Composition des différents milieux réalisés pour le plan d'expériences. Chaque ligne représente pour une expérience les valeurs codées et les valeurs réelles du milieu pour X1 la concentration en azote, X2 la concentration en phosphore et X3 la concentration en sucre initial.**

Expériences	Valeurs codées			Valeurs réelles		
	X1	X2	X3	X1 (mg <sub>N</sub> ajouté.L <sup>-1</sup> )	X2 (mg <sub>P</sub> ajouté.L <sup>-1</sup> )	X3 (g <sub>sucre</sub> .L <sup>-1</sup> )
1	1	1	1	308	114	260
2	1	1	-1	308	114	230
3	1	-1	1	308	38	260
4	1	-1	-1	308	38	230
5	-1	1	1	92	114	260
6	-1	1	-1	92	114	230
7	-1	-1	1	92	38	260
8	-1	-1	-1	92	38	230
9	1,57	0,0013	0	31	76	245
10	-1,57	0,0013	0	370	76	245
11	-0,14	1,99	0	185	151	245
12	-0,14	-1,75	0	185	9	245
13	-0,14	0,0013	1,68	185	76	270
14	-0,14	0,0013	-1,68	185	76	220
15	-0,14	0,0013	0	185	76	245
16	-0,14	0,0013	0	185	76	245
17	-0,14	0,0013	0	185	76	245
18	-0,14	0,0013	0	185	76	245

Un total de 18 expériences a été réalisé pour l'optimisation des conditions de culture. Chaque réponse a été modélisée par une équation du second degré, présentée équation 13, dans laquelle Y<sub>i</sub> est la réponse prédite, β<sub>0</sub> est la constante, β<sub>1</sub>, β<sub>2</sub>, β<sub>3</sub> sont les coefficients d'effets linéaires, β<sub>11</sub>, β<sub>22</sub>, β<sub>33</sub> sont les coefficients d'effet quadratique, β<sub>12</sub>, β<sub>13</sub>, β<sub>23</sub> sont les coefficients d'interactions et X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> sont les variables indépendantes.

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1.X_1 + \beta_2.X_2 + \beta_3.X_3 + \beta_{11}.X_1^2 + \beta_{22}.X_2^2 + \beta_{33}.X_3^2 + \beta_{12}.X_1.X_2 + \beta_{13}.X_1.X_3 + \beta_{23}.X_2.X_3 \quad (\text{eq13})$$

Cependant, pour chaque réponse, le modèle peut être influencé par des observations atypiques ou erronées, ce qui peut entraîner des interprétations et des conclusions fausses. Une possibilité pour prévenir ce type de problèmes est de réaliser une analyse des résidus. Un résidu correspond à l'écart entre l'observation faite (X<sub>i</sub>) et son estimation prédite par le modèle. Cependant, les valeurs de ces résidus dépendent de l'échelle des valeurs prises par la variable considérée. C'est pour cela qu'il est nécessaire de diviser chaque résidu par l'écart-type des résidus. Ils sont alors dits normalisés et renseignent alors sur leurs impacts au niveau individuel sur la modélisation. Pour chaque réponse, les mesures ayant un résidu standardisé <math>\leq -2</math> ; <math>+2</math> ont été éliminées pour la modélisation. Une autre

possibilité pour prévenir ce type de problèmes est de mesurer la distance de Cook. En effet, celle-ci mesure l'influence d'une observation sur l'ensemble des prévisions en prenant en compte l'effet levier et l'importance des résidus. La détection des valeurs atypiques consiste à comparer les distances de Cook avec la valeur 1. Les observations avec une distance de Cook supérieure à 1 ont donc été éliminées pour la modélisation car elles sont susceptibles de trop fortement l'influencer.



# **Chapitre III :**

# **Résultats et discussion**

### III. Résultats et discussion

Cette partie présente dans un premier temps les données obtenues lors des visites en distillerie qui ont servi de base pour la réalisation et l'orientation du travail expérimental. La suite de cette partie présente les résultats expérimentaux obtenus. Ceux-ci sont divisés en trois phases majeures consistant, dans un premier temps, en la détermination des compléments permettant d'améliorer les performances fermentaires, puis en une étude sur le procédé et enfin en le couplage des résultats obtenus au cours de ces deux phases pour aboutir à une fermentation très performante à haute densité pour la production d'éthanol à partir de SBP.

#### III.1. Visites réalisées en distillerie

Afin d'obtenir des informations provenant des différentes distilleries, un questionnaire (annexe 2) a été envoyé à chaque responsable technique des groupes partenaires de l'UNGDA. Ce questionnaire, a été réalisé de décembre 2009 à Janvier 2010 à l'aide de l'étude bibliographique préalablement réalisée et sur les conseils et recommandations de Jean-Paul Vidal et Franck Jolibert (UNGDA). Les réponses obtenues ont permis une meilleure compréhension du fonctionnement des installations. Ce questionnaire a aussi permis un premier contact avec les différents sites, ce qui a, par la suite, facilité les visites effectuées afin d'obtenir des renseignements plus précis sur le fonctionnement des distilleries.

Les rapports sur les visites de distillerie reflètent l'ensemble des informations collectées sur site. Ils ne représentent en aucun cas l'ensemble du fonctionnement des ateliers de production de manière exhaustive sur une année de production ni leurs évolutions au cours du temps.

##### III.1.1. Rapport sur le site N°1 – Avril 2010

Le site n°1 dispose de 3 cuves de 450 m<sup>3</sup> nommées cuve 0, cuve 1 et cuve 2 servant pour les premières étapes de fermentation, de 12 cuves de 100 m<sup>3</sup> réparties sur deux lignes de production servant à finaliser les fermentations, d'une cuve de 140 m<sup>3</sup> servant à préparer l'inoculum et d'une cuve de 10 m<sup>3</sup> servant à réhydrater la levure. Le volume de cuverie totale pour la fermentation est donc de 2690 m<sup>3</sup> (cf figure 23), car la cuve de 10 m<sup>3</sup> n'est pas utilisée en production.

Les cuves fonctionnent de façon continue en campagne avec du jus vert et en continu multi-étagé en inter-campagne, lorsque les moûts fermentés sont composés d'un mélange de sirop/SBP et de mélasse.

La cuve mère de 140 m<sup>3</sup> est inoculée une à deux fois par an, à partir de la cuve de 10 m<sup>3</sup>, pour lancer la préculture. Ceci se fait, lors de la réouverture de la distillerie en début de campagne betteravière et parfois lors du passage à des moûts lourds en inter-campagne. 50 kg de levure sont réhydratés dans 10 m<sup>3</sup> d'eau, puis introduits dans la cuve de 140 m<sup>3</sup> complétée avec un moût léger à 8 degrés Brix. Une fois que le milieu de préculture a atteint une densité de 1,02 et contient environ 4 % (v/v) d'éthanol (après environ 20h), il est transféré par vidange (non totale) dans la cuve 0. L'inoculation des autres cuves se fait par débordement en cascade de cuve en cuve à partir de la cuve 0. Par la suite, la cuve mère sert de cuve de propagation.

En inter-campagne, la cuve 0 reçoit à peu près autant de mélasse que d'un mélange sirop/SBP. Les apports, en sirop/SBP et en mélasse, dans la cuve 0 représentent environ 50 % des volumes totaux apportés à l'ensemble de la cuverie. Le tout est dilué avec de l'eau acidifiée avec de l'acide sulfurique, pour obtenir, dans la cuve 0, 3,5 g d'acidité par litre avec un pH limite à 3,8. La cuve mère et la cuve 0 sont les seules à recevoir de l'eau. Cette eau provient de forage, de condensats ou des vinasses. Les proportions de chacune de ces eaux dépendent de leurs disponibilités. Les cuves 1 et 2 reçoivent respectivement 1/3 et 2/3 des volumes restants de sirop/SBP et mélasse.

Les volumes introduits dépendent des objectifs de production fixés. Par exemple, en inter-campagne, pour une production d'éthanol de 2000 hL.j<sup>-1</sup>, illustrée figure 23, il est introduit sur l'ensemble de la cuverie, 12,3 m<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup> de mélange sirop/SBP, 2,7 m<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup> de mélasse et un volume d'eau total de 48 m<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup>. Il est introduit, dans la cuve mère 1,8 m<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup> de mélasse et 13,9 m<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup> d'eau, dans la cuve 0 un apport de 6,1 m<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup> de sirop/SBP, 0,4 m<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup> de mélasse et 34,2 m<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup> d'eau, dans la cuve 1 2,1 m<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup> de mélange sirop/SBP et 0,2 m<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup> de mélasse et dans la cuve 2 4,1 m<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup> de sirop/SBP et 0,3 m<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup> de mélasse.

La concentration en sucres de la mélasse est d'environ  $470 \text{ g.L}^{-1}$  pour un Brix de 75,7 et la concentration en sucre du mélange sirop/SBP est d'environ  $600 \text{ g.L}^{-1}$  pour un Brix de 70.

Les TAV (Titre alcoométrique volumique) moyens en fin de fermentation sont de 9 à 10 % en campagne et de 11 % en inter-campagne, pour des teneurs respectives en sucres allant de 140 à  $160 \text{ g.L}^{-1}$  en campagne et d'environ  $170 \text{ g.L}^{-1}$  en inter-campagne. Les sucres sont dosés à la liqueur de Fehling. Le sucre résiduel accepté est de  $2 \text{ g.L}^{-1}$ . Cependant, puisque les produits betteraviers interfèrent avec les dosages colorimétriques, une valeur inférieure à  $4 \text{ g.L}^{-1}$  est acceptée en estimant que cela correspond à  $2 \text{ g.L}^{-1}$  de sucres réels.

Il n'y a pas de système d'agitation sur le site, à cause, à la fois du coût de fonctionnement de ceux-ci et des coûts de réparation nécessaires à leur remise en état. Il y a néanmoins une agitation faite par le système de refroidissement qui consiste, pour toutes les cuves, en une recirculation du milieu passant à travers un échangeur de chaleur. De plus, dans la cuve mère et les cuves 0, 1 et 2, l'aération par des tuyaux percés, à respectivement  $450 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ ,  $300 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$  et  $200 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ , permet d'agiter la cuve. Enfin, l'important dégagement de gaz dans les réacteurs permet d'agiter en partie les fermenteurs.

La température de consigne est  $33\text{-}34^\circ\text{C}$  sur toutes les cuves. Le refroidissement dans les échangeurs s'effectue avec les eaux des bassins, ce qui pose parfois problème durant les mois les plus chauds de l'inter-campagne.

L'antimousse utilisé sur le site est l'ACF 922K (Ouvrie). Il en est utilisé entre 50 et 100 litres par jour. Le maximum de la consommation se fait lors de la fermentation des jus verts.

Le recyclage cellulaire n'a lieu qu'en campagne. Il se fait par centrifugation, et ne concerne que 50 % des vins en fin de fermentation ( $\sim 50 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ ). Aucun traitement n'est effectué sur les levures centrifugées.

Les milieux sont supplémentés avec  $15,63 \text{ kg.h}^{-1}$  de phosphate diammonique,  $1,04 \text{ kg.h}^{-1}$  de sulfate de magnésium et  $0,50 \text{ kg.h}^{-1}$  de sulfate de fer. Ces ajouts sont réalisés uniquement au niveau de la cuve mère, qui contient donc des concentrations quatre fois plus importantes que la cuve 0, et se propagent de cuve en cuve au fil de la fermentation. Le Kamoran<sup>®</sup> (sel de sodium de monensine à effet antibactérien) est employé sur le site à des concentrations variables selon le degré de contamination. Ce produit est ajouté uniquement dans la cuve 0.

La concentration en levure est uniquement mesurée par centrifugation d'une aliquote de chaque cuve. La concentration observée sur l'ensemble des cuves (à l'exception de la cuve mère) est de 1 % volumique.

Les principaux problèmes rencontrés sur le site sont, lors du redémarrage, des temps de latence causés par des problèmes de régulation de température lors du transfert de la cuve mère dans la cuve 0 de l'usine et, durant les fermentations, des baisses de rendement supposées être dues à un manque de nutriments. Lors de la visite, ce site produisait par an  $300000 \text{ m}^3$  d'éthanol carburant et  $300000 \text{ m}^3$  d'autres alcools (alcools neutres et surfins).



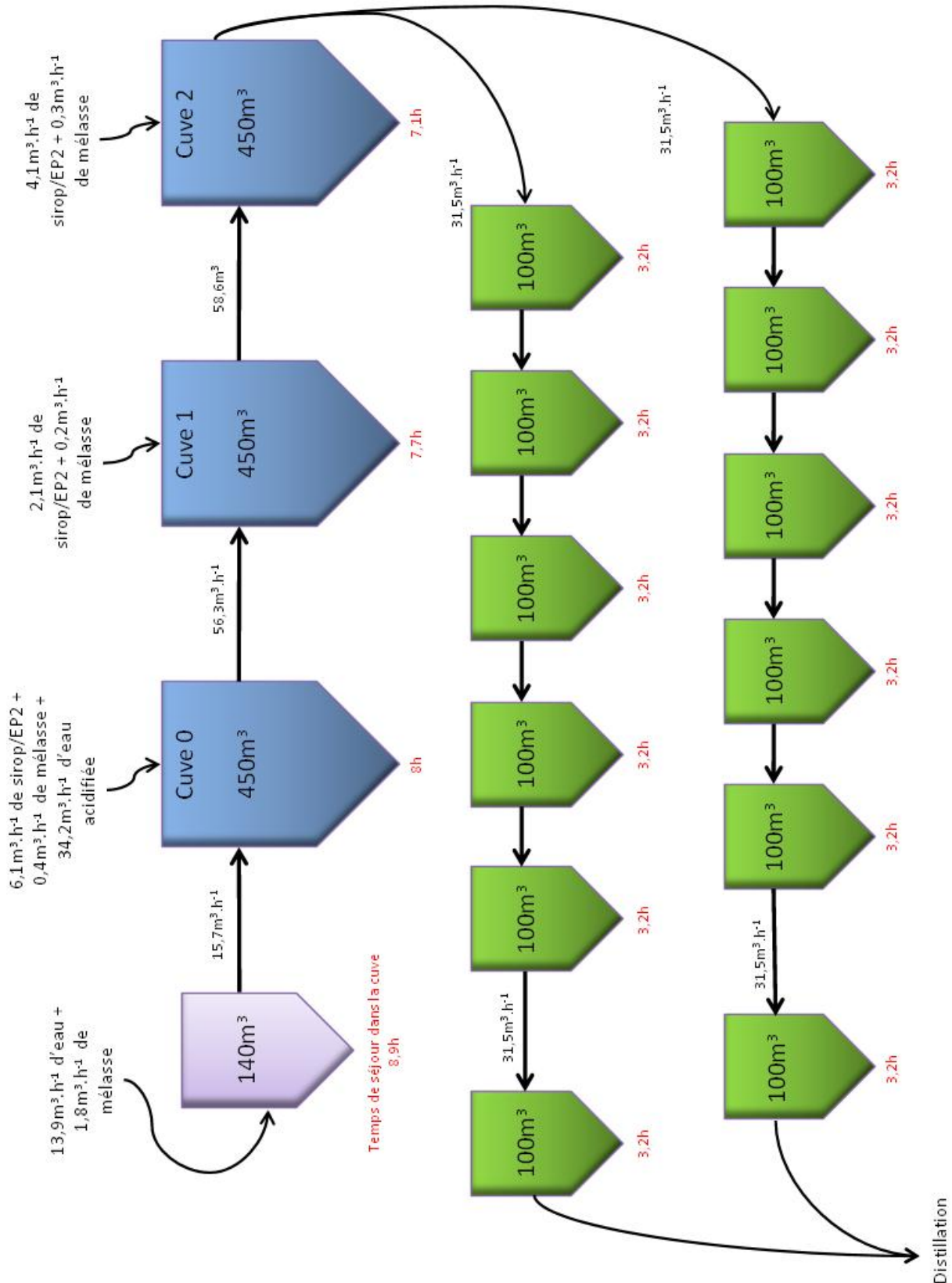


Figure 23: Schéma de la cuverie du site n°1. Les débits indiqués sont donnés pour une production journalière d'environ 2000 hL d'éthanol par jour durant l'inter-campagne (calcul prévisionnel pour un vin à 12 % v/v d'éthanol). Les durées indiquées sous les cuves correspondent aux temps de séjour dans chaque cuve.

### III.1.2. Rapport sur le site N°2 – Mai 2010

Le site n°2 dispose de deux chaînes de production. La première, utilisée uniquement en campagne sur jus vert, est composée de deux cuves mères de 140 m<sup>3</sup> alimentant en continu le système, d'une cuve de 500 m<sup>3</sup> et de trois cuves de 900 m<sup>3</sup>. Ces cuves fonctionnent en continu 3 mois par an.

La seconde chaîne de production est composée de 14 cuves de 140 m<sup>3</sup>, fonctionnant toutes environ 50 semaines par an en fed-batch et en parallèle, à l'exception de deux de ces cuves servant de cuves mères en campagne. La production en inter-campagne se fait à partir d'un mélange sirop/SBP. Une autre cuve de 900 m<sup>3</sup> est présente sur le site et sert à stocker les vinasses. Cependant elle peut occasionnellement servir à la fermentation durant la campagne. Les produits fermentés peuvent provenir d'autres sucreries du groupe, ce qui pose parfois des problèmes de fermentation et de distillation dus à la qualité des produits reçus.

La température de consigne pour toutes les cuves du site est de 32°C, cependant des températures de 38°C ont été observées pendant les périodes les plus chaudes. Depuis la campagne 2008-2009, les échangeurs de chaleurs ont été modifiés, les températures maximales observées sont maintenant de 34°C.

La levure utilisée sur le site est une levure de boulanger (Hirondelle bleue), utilisée sous sa forme fraîche. Un échantillon de cette levure a été ramené au laboratoire afin de réaliser des tests comparatifs entre cette souche et la souche C10 (collection UNGDA).

En campagne, sur jus vert, les fermentations se font sur des milieux contenant 150 à 160 g.L<sup>-1</sup> de sucre en début de campagne puis 170 g.L<sup>-1</sup> au bout de quelques jours. A ce jus vert, sont ajoutées 3 tonnes de phosphate diammonique par jour. Le TAV moyen obtenu est de 11 %. Les cuves mères, la cuve de 500 m<sup>3</sup> et les premières cuves de 900 m<sup>3</sup> sont aérées. Les cuves de 500 et 900 m<sup>3</sup> sont toutes agitées par des systèmes d'agitation mécanique placés à mi-hauteur et, par des systèmes de recirculation prélevant au point le plus bas de la cuve et réinjectant aux 4/5 de la hauteur de la cuve. La production d'alcool en campagne est en moyenne, sur cette chaîne, de 3200 hL par jour. En fin de campagne les cuves sont nettoyées à la soude chauffée à 90°C. L'étude ne portant pas sur cette partie, réservée au jus vert, les renseignements collectés sont restés limités afin de privilégier la partie fermentation sur sirop/SBP.

Pour ce qui est de la fermentation des SBP, les cuves sont inoculées une fois par an avec 250 kg de levure fraîche, ce qui représente environ 1,2x10<sup>7</sup> levures.mL<sup>-1</sup> (comptage réalisé au laboratoire en respectant les proportions d'inoculum et à partir des levures obtenues sur le site). Par la suite, l'inoculation est réalisée grâce au recyclage des levures. Les premières fermentations se font avec du moût léger à 160 g.L<sup>-1</sup> de sucre afin de permettre l'augmentation de la population levurienne. Puis, de fed-batch en fed-batch la concentration en sucre est augmentée, jusqu'à atteindre 210 g.L<sup>-1</sup> de sucre et un Brix de 29. Le jour de la visite une des cuves venait d'être réparée, le redémarrage de cette cuve s'est fait avec 500 kg de levure. La quantité d'inoculum a été doublée afin d'effectuer un démarrage rapide de cette cuve. Les cuves utilisées en batch ne sont agitées que par la recirculation de régulation thermique.

Sur le site, seules les vinasses sont utilisées pour diluer le mélange sirop/SBP. Ceci permet de limiter les besoins en eau et aussi « d'anticiper le Grenelle 2 et sa réglementation sur l'eau » dicit le directeur technique du site n°2. Les condensats quand à eux sont envoyés en lagune.

Les cuves sont toutes supplémentées en phosphate diammonique, à hauteur de 20 kg par cuve soit 143 g.m<sup>-3</sup>. Cet apport se fait, pour chaque cuve, une seule fois par an, pour leur démarrage. Les cuves sont systématiquement supplémentées avec 10 L d'anti-mousse Ouvrie 922k, soit 71 µL.L<sup>-1</sup>. L'acide dans les cuves est apporté par les vinasses d'une part et par le recyclage des levures d'autre part. En temps normal, aucun acide n'est ajouté dans les cuves. Cependant, il arrive occasionnellement que le pH dépasse 5,5, de l'acide sulfurique peut alors être ajouté. Le pH est généralement compris entre 3,9 et 4,7. Les variations du pH dépendent de la qualité des vinasses utilisées et donc de la qualité des fermentations précédentes.

Le remplissage des cuves, aussi appelé coulage, se fait en 19 h. Le taux de remplissage est de 3,75 % par heure, soit pour une cuve de 140 m<sup>3</sup>, 5,25 m<sup>3</sup> par heure. Ce taux de remplissage est constant au cours du temps. Le mélange sirop, SBP et vinasse se fait directement dans la cuve. La densité est suivie toutes les deux heures afin de vérifier la qualité du coulage. La densité est d'environ 1,1 au début du coulage, à 1,29 à 1,30 en fin de coulage. Ce coulage est prévu pour permettre l'augmentation de la densité d'un dixième d'unité de densité par heure. Il s'ensuit alors un temps de chute, servant à épuiser les sucres résiduels, qui est généralement de 7h, la fin de fermentation est

estimée lorsque deux mesures de densité consécutives sont identiques. Le sucre résiduel doit être de  $0 \text{ g.L}^{-1}$  de fructose et de glucose. La densité finale est comprise entre 1,08 et 1,02. La durée de fermentation est donc d'environ 26 h. Il s'agit ici d'une fermentation en fed-batch avec une phase de batch pour arriver à l'épuisement des sucres. Les cuves et les échangeurs de température sont nettoyés uniquement avec de l'eau de forage.

Le TAV obtenu est généralement de 12 à 12,5 %. Les levures, une fois la fermentation terminée, sont récupérées par deux centrifugations successives lors de la vidange de la totalité du volume de la cuve. A l'issue de la deuxième centrifugation, les levures sont traitées avec l'acide sulfurique (pH 2,6 pour  $3 \text{ g.L}^{-1}$  d'acidité) dans de l'eau de forage, le tout étant aéré durant deux heures. Le lavage terminé, les levures sont réinjectées dans une cuve qui peut être différente de la cuve d'origine, puis un autre cycle commence. Il est estimé qu'environ 80 % des levures sont récupérées par centrifugation, ce qui représente un volume d'environ  $16 \text{ m}^3$  par cuve soit 11,5 % du volume de la cuve. Par centrifugation en laboratoire (laboratoire de la distillerie), il a été montré que ces  $16 \text{ m}^3$  contiennent 60 % de levure, soit  $9,6 \text{ m}^3$  de levure par cuve.

Malgré le recyclage total des levures, l'utilisation massive de vinasses et la non-utilisation de Kamoran® ou autre produit bactériostatique, ce site possède une productivité très élevée et une quasi-absence de problème de contamination. L'explication donnée sur site a été l'utilisation d'une forte population levurienne dès le début de la fermentation.

Exceptionnellement, l'atelier n'a pas été arrêté durant l'été 2010. En effet, les contrôles réglementaires doivent se faire au moins une fois tous les 18 mois, il a donc été expérimenté cette année de faire fonctionner les cuves pendant le maximum de temps légalement possible.

Actuellement la cuverie n'est pas exploitée à son maximum, en effet les cuves de  $500$  et  $900 \text{ m}^3$  ne sont utilisées que pendant la campagne. Ceci est dû à la saturation de l'appareil de distillation et aux limites de stockage des vinasses. La seule amélioration possible sur le site semble donc être l'augmentation du TAV. Ceci permettrait en effet de limiter la quantité de vinasses produites.

### III.1.3. Rapport sur le site N°3 – Novembre 2010

Le site n°3 dispose d'une cuverie de  $2280 \text{ m}^3$  composée d'une cuve mère de  $180 \text{ m}^3$  et de trois cuves de  $700 \text{ m}^3$  appelées CF1, CF2 et CF3 (cf figure 24). Ces quatre cuves fonctionnent en série et en continu pour des périodes allant, selon les objectifs de production et la quantité de sucre disponible, de 5 à 11 mois par an.

Au 3 Novembre 2010, les objectifs de production pour la campagne 2010-2011 ont d'ores et déjà été revus à la baisse,  $33000 \text{ hL}$  d'éthanol sont à produire au lieu des  $45000 \text{ hL}$  prévus avant le début de la campagne. Ceci est dû aux mauvaises conditions climatiques de 2010 qui ont entraîné une diminution de la richesse (pourcentage massique de sucre) des betteraves à 15%, soit 2 points de moins par rapport à l'année 2009.

La production d'éthanol sur le site n°3 est basée sur la fermentation d'un mélange de mélasse et de sirop, dont les proportions peuvent varier selon les objectifs de production de la sucrerie. A cause de la faible richesse des betteraves et du prix élevé du sucre, il est prévu pour la campagne 2010-2011, d'utiliser quasiment exclusivement la mélasse pour produire de l'éthanol.

Le site n°3 produit uniquement de l'alcool brut (92 %) qui est ensuite envoyé dans d'autres sites du groupe afin de produire de l'alcool surfin, pour 20 % du volume produit et du carburant pour les 80 % restant. Ce site possède la particularité de produire de l'alcool cachère. Pour cela, le lancement de la cuverie s'effectue avec une levure cachère importée d'Israël, et un rabbin vient officier le jour du démarrage de la cuverie afin de certifier que tout y est cachère. Des contrôles, toujours effectués par un rabbin, peuvent avoir lieu au cours de l'année et peuvent entraîner différentes sanctions. En 2009 un arrêt de toute l'usine a été demandé pour un nettoyage complet des cuves. De l'ammonium phosphate aux produits nettoyants utilisés dans les cuves, tous les produits utilisés, qui sont potentiellement en contact avec l'alcool, se doivent de respecter les normes cachère.

Le démarrage de la cuve mère a été effectué en août 2010 en introduisant  $1,2 \text{ t}$  de levure de boulanger cachère dans la cuve mère. Puis la propagation s'effectue de cuve en cuve. La cuve mère reçoit 90 % du moût alimenté en continu, les 10 % restant étant introduits dans la cuve CF1. Le démarrage de la cuve mère s'effectue avec un moût à 21 de Brix, soit, pour une pureté moyenne observée sur site de 77 %, un moût à  $162 \text{ g}_{\text{sucre}}.\text{L}^{-1}$ . Par la suite le Brix du moût introduit est augmenté progressivement jusqu'à atteindre 28 soit  $216 \text{ g}_{\text{sucre}}.\text{L}^{-1}$ . La dilution de la mélasse s'effectue avec de

l'eau de condensat et parfois de l'eau de station d'épuration. Le mélange des différents produits servant à la réalisation du moût est réalisé au niveau du dilueur, situé en amont de la chaîne de production.

En moyenne, le temps de séjour total sur l'ensemble de la cuverie est de 23 h. Le moût est additionné, avant le dilueur, de 0,03 gramme d'antimousse siliconé et de 0,045 gramme de phosphate diammonique par litre. L'acidité dans le moût est quant à elle régulée à  $2,5 \text{ g}_{\text{H}_2\text{SO}_4} \cdot \text{L}^{-1}$  par l'ajout d'acide sulfurique. Cette acidité est uniquement contrôlée à l'aide du pH.

La cuve mère et les cuves CF1 et CF2 sont aérées à hauteur respective de 2,5 vvh, 0,5 vvh et 0,36 vvh. L'alimentation en air se fait à l'aide de tuyaux percés. Toutes les cuves sont équipées de système de recirculation externe, permettant la régulation de la température à  $33^\circ\text{C}$ . Cependant il a été constaté sur site que la régulation de la température n'était pas toujours bien réalisée. En effet, durant cette visite, il a été observé des pics de températures supérieurs à  $37^\circ\text{C}$  sur la cuve mère. Toutes les cuves à l'exception de la cuve mère sont agitées par deux systèmes d'agitations mécaniques latéraux à pales.

A la sortie de la cuve CF3, la totalité du vin est centrifugée. Le vin, généralement à 11 % (v/v) et  $1,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de sucre résiduel, est envoyé en distillation (figure 24). Les levures ainsi séparées sont mélangées à l'eau de lavage des gaz. L'acidité est alors ajustée à  $5 \text{ g}_{\text{H}_2\text{SO}_4} \cdot \text{L}^{-1}$ . La durée du traitement est d'environ une heure. Par la suite, les levures sont filtrées à l'aide d'un tamis rotatif. Enfin, une seconde centrifugation est effectuée. Les levures obtenues après ces deux centrifugations sont ensuite réintroduites dans la cuve mère, à l'exception de  $1,5 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$  qui serviront, après extraction de l'eau, à l'alimentation animale. Les levures recyclées contiennent encore 4 % (v/v) d'éthanol après la seconde centrifugation. Le débit de levure est en moyenne de  $33 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$  et représente donc un tiers du volume introduit en cuverie, illustré figure 24. Pour une alimentation avec moût à  $162 \text{ g}_{\text{sucre}} \cdot \text{L}^{-1} \text{ moût}$ , il est donc introduit dans l'ensemble de la cuverie  $107 \text{ g}_{\text{sucre}} \cdot \text{L}^{-1} \text{ milieu introduit}$  et pour une alimentation avec un moût à  $216 \text{ g}_{\text{sucre}} \cdot \text{L}^{-1} \text{ moût}$ ,  $142 \text{ g}_{\text{sucre}} \cdot \text{L}^{-1} \text{ milieu introduit}$ .

Les cuves sont nettoyées en fin et en début de campagne. A l'arrêt des fermenteurs, ceux-ci sont nettoyés avec de l'acide sulfonique et un racloir mécanique, afin d'éliminer le tartre qui se forme sur les parois du fermenteur au cours de la campagne. Puis les cuves sont aspergées d'eau sodée à  $80^\circ\text{C}$ . Les cuves sont alors maintenues closes pendant l'arrêt de la production. Avant le démarrage, les cuves sont nettoyées par aspersion d'hypochlorite de soude.

Outre les problèmes de régulation de température, les problèmes évoqués sur site ont essentiellement concerné les contaminations ayant probablement deux origines majeures : la qualité de l'eau utilisée pour la dilution du moût et les contaminations récurrentes des échangeurs externes à plaques. Les contaminations sont détectées par l'augmentation de la concentration en sucre résiduel et la diminution du TAV. Aucun traitement antimicrobien n'étant autorisé sur le site, le traitement des contaminations est réalisé par une augmentation de la pureté du moût pour atteindre 85 % et une augmentation de l'acidité à  $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Ce traitement est appliqué pour des durées allant de 3 à 4 jours. Ce dernier point explique à la fois, l'importance donnée aux nettoyages effectués en fin et en début de campagne, mais aussi la récurrence des contaminations au niveau des échangeurs.

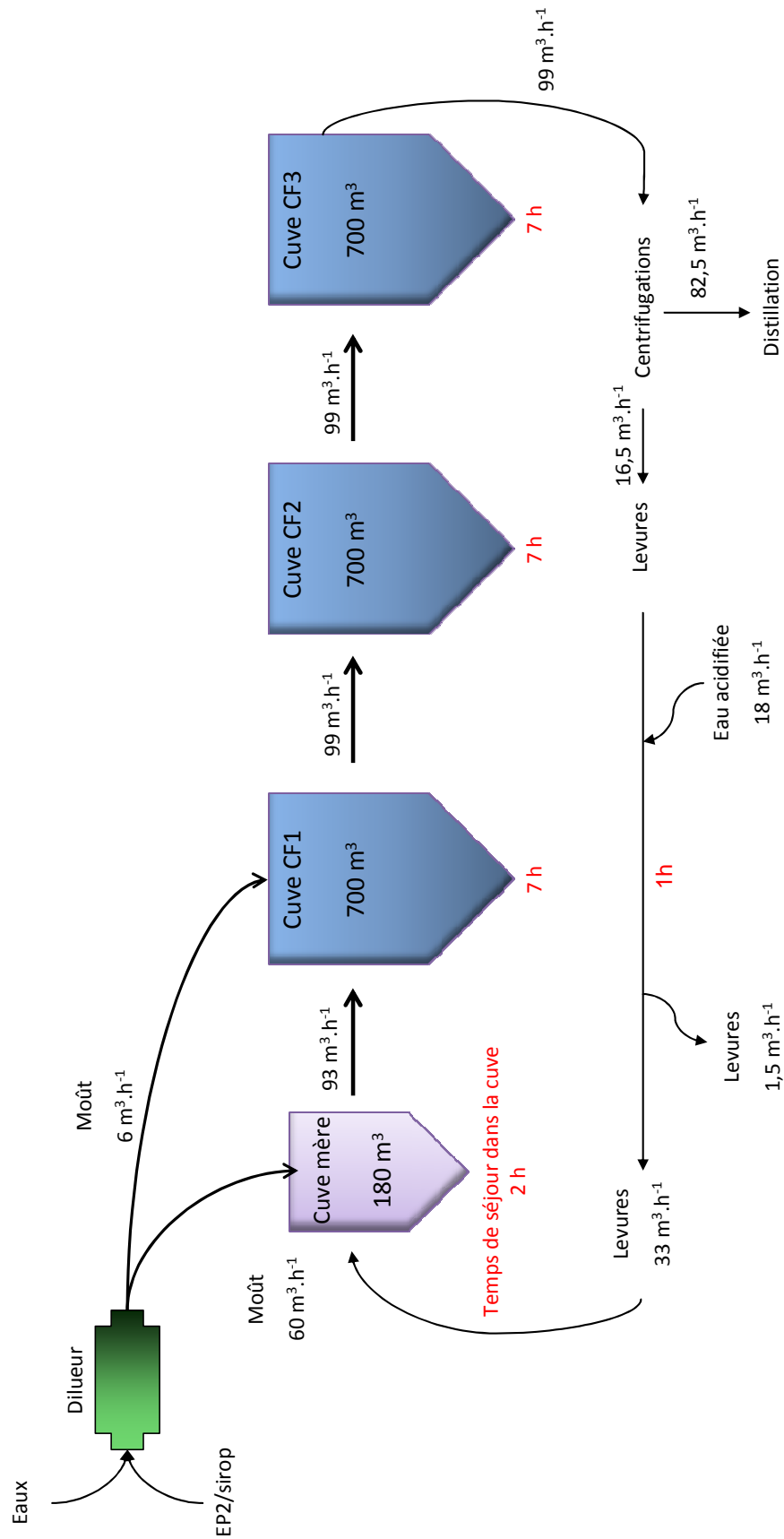


Figure 24: Schéma de la cuverie du site n°3. Les débits indiqués sont en rouge sous les cuves correspondent aux temps de rétention dans chaque cuve.

#### III.1.4. Rapport sur le site N°4 – Février 2011

Le site n°4 dispose de 14 cuves de fermentation de 600 hL et 3 cuves de 250 hL appelées « cuves de pied » et utilisées pour inoculer les cuves de fermentations. La cuverrie fonctionne en fed-batch pendant environ 300 jours par an selon la disponibilité des produits.

La levure utilisée sur le site est une levure de boulanger, utilisée sous sa forme fraîche. En début de campagne, deux cuves de fermentation sont utilisées pour propager les levures. Dans chacune de ces deux cuves, 125 kg de levures sont introduits. En 24 heures, toutes les cuves sont remplies par transfert de ces deux cuves. Durant les trois premiers jours, les quantités de sucre introduites sont augmentées. Les concentrations cellulaires, dans les pieds de cuves et les cuves de fermentation, sont respectivement comprises entre 7 et  $8 \times 10^8$  et 2 et  $2,5 \times 10^8$  levures.mL<sup>-1</sup>. Cet ensemencement est réalisé une fois par an, puis les inoculations sont réalisées par recyclage des levures.

La production, sur ce site, est basée sur la fermentation d'un mélange de SBP (sirop basse pureté) et de sirop. Les proportions de ces deux produits dépendent des objectifs de production de la sucrerie. Ainsi, les moûts ont une pureté comprise entre 80 et 88%. La dilution du mélange sirop/SBP est réalisée avec, à parts égales, de l'eau de forage ou de rivière, des vinasses et des eaux de laveur lagunées.

Ce site n'étant pas équipé de tamis moléculaire, les 400000 hL d'alcool brut à 93% produits par an sont expédiés dans un autre site du groupe pour y être transformés en alcool surfin ou carburant.

Sur ce site l'agitation est réalisée par l'aération continue des cuves. Les débits d'air sont modifiés à l'appréciation des opérateurs en cours de fermentation. Aucune mesure de débit n'est réalisée. Seules les cuves de fermentation sont équipées de systèmes de refroidissements constitués de baffles dans lesquelles circule de l'eau.

La totalité des levures est recyclée. Une première centrifugation permet de séparer les levures des vins, puis les levures sont traitées à l'acide chlorhydrique, pH 1,7 pendant 20 minutes. Les levures sont ensuite centrifugées une seconde fois, et renvoyées dans les pieds de cuves. Ces deux cuves sont remplies avec 45 hL de levure, 25 hL d'alcali et 25 hL d'acide phosphorique dilués, puis sont additionnées de 25 hL de moût à 220 g.L<sup>-1</sup>. Si la température augmente de 0,3°C, il est considéré que la fermentation a démarré (~15 minutes). La cuve est alors alimentée avec 130 hL de même moût. Après 5 heures de fermentation, les pieds de cuves contiennent environ 100 g.L<sup>-1</sup> de sucre et 7 % (v/v) d'éthanol. Ces deux cuves n'étant pas équipées de système de refroidissement, la régulation de la température se fait par l'apport de moût. Le moût, obtenu par mélange du sirop, du SBP, de l'acide, de l'eau et de vinasses, est maintenu à environ 25°C.

Les 250 hL de milieu ainsi obtenus dans les pieds de cuves sont transférés dans une des cuves de fermentation. Durant les 4,7 premières heures, 315 hL de moût à 220 g.L<sup>-1</sup> sont ajoutés, puis durant les 0,8 heures suivantes, 45 hL sont ajoutés. La fermentation met ensuite un minimum de 12,5 heures pour se terminer et obtenir un TAV d'environ 12,5%. Du pied de cuve à la cuve de fermentation, un maximum de 185 grammes de sucre par litre de moût ont été consommés. Le rendement observé sur ce site est de 0,53 g éthanol.g saccharose<sup>-1</sup> et la durée d'une fermentation est au minimum de 23 heures sans compter les temps de vidange. En fin de fermentation, seule la concentration en glucose est mesurée et la fermentation est considérée comme complète si celle-ci est inférieure à 1 g.L<sup>-1</sup>.

Les milieux de fermentation sont supplémentés en azote par de l'ammoniaque et en phosphore par de l'acide phosphorique, à hauteur respective de 100 mg<sub>N</sub>.L<sup>-1</sup> et 22 mg<sub>P</sub>.L<sup>-1</sup>. Ces ajouts se font au niveau des « cuves de pieds », dans lesquelles les concentrations sont donc 2,4 fois plus importantes. L'acidité recherchée est de 2 g d'acide sulfurique.L<sup>-1</sup> et se fait par ajout d'acide chlorhydrique, le pH induit est compris entre 4,0 et 4,5. De l'antimousse Ouvrie 922k est ajouté, selon les besoins, aux cuves pour réguler le niveau de mousse.

En fin de campagne, seul un lavage à l'eau est effectué, aucun produit nettoyant n'est utilisé.

Les problèmes régulièrement observés sur ce site lors des fermentations sont des problèmes de contaminations par des bactéries lactiques, de régulation de température par manque de régulation et des problèmes de qualité des produits entrants. De plus, lors de la visite, les fermentations étaient très fortement ralenties par une importante floculation dans les cuves. Il s'agissait de la seconde fois de l'année (au moment de la visite) que ce phénomène apparaît sur ce site. Celui-ci, très certainement causé par une contamination levurienne, n'est pas habituel sur ce site.

Pour ce qui est de la qualité des produits entrants, il s'agit essentiellement de contamination des SBP par du formol. En effet, une pratique très répandue dans l'industrie sucrière est de conserver les SBP

dans des cuves où du formol est aspergé en surface toutes les semaines. Sur le site de n°4, 50 L de formol sont aspergés toutes les semaines, pour un volume de 14000 m<sup>3</sup> de SBP, sur une surface d'environ 700 m<sup>2</sup>. L'aspersion de formol se fait aussi sur les parois lorsque la cuve de stockage du SBP est vide avant remplissage. Ce traitement, sensé limiter le développement microbien et ainsi prolonger la conservation, cause lors de l'utilisation des fonds de bac, des problèmes de fermentation.

### III.1.5. Tableau comparatif des sites

Le tableau 17 synthétise les informations collectées lors des visites des ateliers de production. Ce tableau montre que les trois premiers sites sont de tailles comparables alors que le site n°4 est deux fois plus petit. Les quatre sites présentent de nombreuses différences. Ceci s'explique en grande partie par la tradition de chaque site et par l'expérience des personnes qui y travaillent mais aussi par les choix financiers, comme sur le site n°1 où il a été choisi de ne pas remettre en état les agitations mécaniques des cuves.

La dilution des milieux de fermentation est réalisée dans les différents ateliers avec l'eau disponible. Sur le site n°3 la dilution n'est pas réalisée avec des vinasses, car ce site dispose d'un débouché pour ce déchet issu de la distillation.

Le traitement des levures est entièrement dépendant des moyens mises en œuvre pour l'inoculation. Il est indispensable de laver les levures recyclées afin de limiter les risques de contamination.

Le choix de la souche de levure, quant à lui dépend de la stratégie du site. En effet le site n°1 utilise une souche à hautes performances fermentaires dans une cuve mère, servant à inoculer le reste de la cuverie, contrairement au site n°2 qui lui a choisi une levure de boulanger qui est inoculée massivement dans les cuves en début de campagne et recyclée tout au long de l'année. La stratégie du site n°3 est similaire au site n°2, à l'exception fait que le site n°3 vise un marché de niche en produisant de l'alcool cachère.

Le tableau 17 montre que les TAV moyens obtenus en fin de fermentation sont relativement similaires. Les rendements de conversion du sucre en éthanol pour tous les sites sont proches du rendement théorique sur saccharose ( $0,538 \text{ g}_{\text{éthanol}} \cdot \text{g}_{\text{saccharose}}^{-1}$ ). Cependant, le calcul des rendements a été effectué sans prendre en compte l'éthanol apporté par le recyclage cellulaire. En effet, les levures ne représentent pas la totalité du volume recyclé ainsi une certaine proportion de milieu est recyclée en même temps que les levures. La proportion de milieu recyclé dépendant du matériel utilisé ainsi que du mode opératoire mis en œuvre, l'éthanol recyclé n'a pas pu être évalué sur les sites. Le rendement est donc surestimé.

Les performances légèrement supérieures pour le site n°4 peuvent s'expliquer par une aération intense tout au long de la fermentation. Cette aération est, sur ce site, régulée manuellement d'après l'expérience du personnel technique et l'avancement de la production. Si tout l'atelier de fermentation pratique une aération, il est possible de voir que celle-ci est très variable selon les sites. Ceci montre le souci porté sur l'apport d'oxygène, cependant cet élément n'est mesuré dans aucun atelier de production. Les apports d'oxygène se font donc systématiquement de manière empirique.

Les problèmes récurrents sur les sites concernent essentiellement des baisses occasionnelles de la productivité. Ces baisses pourraient être, en partie, expliquées par des carences en nutriment. En effet, les SBP étant issus d'un produit agricole, ils n'ont pas une qualité constante tout au long de l'année. Ils vont donc nécessiter d'être plus ou moins supplémentés, or les ajouts, quand il y en a, sont constants. Néanmoins, les concentrations en azote et en phosphore recueillis sur site ont permis de choisir les gammes de concentration utilisées pour ces deux éléments au cours du plan d'expériences.

Les problèmes de régulation de température sont présents essentiellement dans les sites n°1 et n°3, car ces deux derniers disposent de cuves de grande taille, 450 à 700 m<sup>3</sup>, qui sont difficiles à thermostatier. Enfin, seul le site n°1, semble exempt de problème de contamination. Ceci peut s'expliquer par l'utilisation de Kamoran<sup>®</sup>, mais aussi par l'utilisation d'une cuve mère pour l'inoculation. En effet, le recyclage des levures entraîne aussi le recyclage des contaminants ce qui est observé sur les sites 2, 3 et 4.

**Tableau 17: Comparatif des données recueillies lors des visites réalisées sur les sites de production d'éthanol. Ce tableau compare les données concernant uniquement la production d'éthanol lors de l'utilisation de sirop basse pureté.**

	Site n°1	Site n°2	Site n°3	Site n°4
Procédés	Semi-continu	Fed-batch puis batch en chute	Continu multi-étagé	Fed-batch puis batch en chute
Volume de cuverie (m <sup>3</sup> )	2690	1960	2280	915
Concentration cellulaire cuve mère/propagation (levures.mL <sup>-1</sup> )	10 <sup>8</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>8</sup>
Température consigne (°C)	33-34	32	33	33
Dilution des SBP	Vinasses, condensats, eau de forage	Vinasses	eau de condensat, eau de station d'épuration	Eau de forage, eau de laveur lagunées, vinasses
Agitation	Recirculation	Recirculation	Recirculation, agitation mécanique	Par l'aération
Inoculation	Cuve mère	100% recyclage	100% recyclage, représente un tiers du volume introduit en cuverie et contient 4% d'éthanol	100% recyclage
Traitement des levures	Aucun	Double centrifugation et traitement à l'acide	Double centrifugation et traitement à l'acide	Double centrifugation et traitement à l'acide
Acidité recherchée (g d'acidité.L <sup>-1</sup> )	3,5	Contrôle seulement si pH>5,5	3	2
Aération	Dans les trois premières cuves (~40% du volume de la cuverie)	Seulement lors du recyclage	Dans les trois premières cuves (~70% du volume de la cuverie)	Continue
Souche de levure	46EDV	Levure de boulanger	Levure de boulanger	Levure de boulanger
Concentration en sucre totale (g.L <sup>-1</sup> )	170	180	142	185
Ajout d'azote (mg <sub>N</sub> .L <sup>-1</sup> )	53	Une fois pour le premier fed-batch	10	100
Ajout de phosphore (mg <sub>P</sub> .L <sup>-1</sup> )	58	Une fois pour le premier fed-batch	11	22
Autres	Antimousse, Fe à 1,6 ppm, Mg à 3,3ppm	Antimousse	Antimousse	Antimousse
Durée de fermentation (h)	51	26	23	23
TAV final moyen (% v/v)	11	12	11	12,5
Rendement Y <sub>P/S</sub>	0,52	0,53*	0,53*	0,53*
TAV potentiel (% v/v) sur rendement théorique saccharose	11,6	12,3	11,1	12,7
Problèmes récurrents	Temps de latence, baisse de productivité	Baisse de productivité, arrêt de fermentation	Baisse de productivité	Régulation de la température, baisse de productivité, arrêt de fermentation
Causes énoncées sur place	Régulation de la température, carences	Qualité des SBP	Régulation de la température, contaminations	Régulation de la température, contamination, qualité des SBP
Causes probables	Température, carences, agitation	Qualité des SBP, qualité des vinasses, carences, contaminations	Température, contaminations, carences	Température, contaminations, qualité des SBP, qualité des vinasses

\* Les rendements présentés ne tiennent pas compte de l'éthanol apporté par le recyclage cellulaire.



## III.2. Amélioration des conditions de culture

### III.2.1. Expériences préliminaires

Les expériences préliminaires avaient essentiellement pour but de prendre en main le matériel et d'adapter les techniques expérimentales au milieu de fermentation à base de SBP. Les concentrations en sucre, en azote et en phosphore ont été choisies de manière arbitraire. Pour ces fermentations, l'activité fermentaire a été suivie par mesure de la perte de masse au cours du temps.

#### III.2.1.1. Première fermentation

Les premières expériences ont consisté en des fermentations à haute densité avec des milieux contenant 325 g.L<sup>-1</sup> et 245 g.L<sup>-1</sup>. Ces expériences étaient destinées à voir l'effet de l'ajout d'azote et de phosphore sur la fermentation. Suite à des erreurs de calculs, les concentrations souhaitées en azote ajouté et en phosphore ajouté, respectivement 250 et 75mg.L<sup>-1</sup>, n'ont pas été respectées. Les concentrations réelles ont été de 2382 mg.L<sup>-1</sup> pour l'azote et 863 mg.L<sup>-1</sup> pour le phosphore pour les milieux notés N+P. Le SBP contenant de l'azote assimilable, les milieux à 325 g.L<sup>-1</sup> et 245 g.L<sup>-1</sup> de sucre contenaient respectivement 240 et 180 mg.L<sup>-1</sup> d'azote en plus de celui ajouté. Ces milieux ont été incubés à 30 °C et agités à 120 rpm pendant 76h.

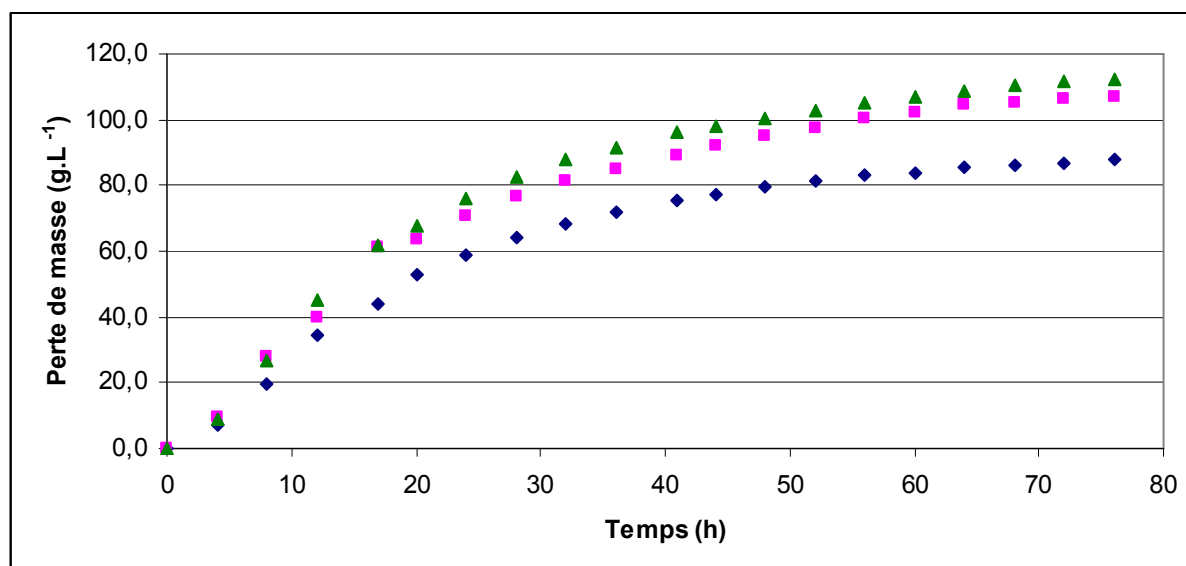


Figure 25: Evolution de la perte de masse durant la fermentation de milieux à 325 et 245 g.L<sup>-1</sup> de sucre additionnés ou non d'azote et de phosphore. Les ■ représentent le milieu 245, les ▲ le milieu 245 N+P et les ◆ le milieu 325 N+P. Les valeurs indiquées prennent en compte l'évaporation mesurée par un témoin.

La figure 25 montre que de 0 à 8h il est possible d'observer une phase d'accélération, suivie immédiatement d'une phase de décélération. Un plateau est atteint après 72h de fermentation. Ainsi, la fermentation a commencé dès l'inoculation du milieu. Cependant les profils diffèrent après 4h de fermentation. Par la suite, la perte de masse pour le milieu 325 N+P devient inférieure à celles des milieux moins concentrés. Les concentrations en éthanol au niveau du plateau, calculées à partir des pertes de masse observées sur la figure 25 et du rendement théorique, étaient de 11,8% pour le milieu 325 N+P, 14,4% pour le milieu 245 et 15,1% pour le milieu 245 N+P.

L'éthanol théoriquement productible à partir de ces milieux est de 22,2% pour le milieu à 325 g.L<sup>-1</sup> de sucre et de 16,8% pour les milieux à 245 g.L<sup>-1</sup>. Les fermentations n'ont donc pas été complètes. Comme attendu, il est observé que les fortes concentrations en sucres posent des problèmes de fermentation.

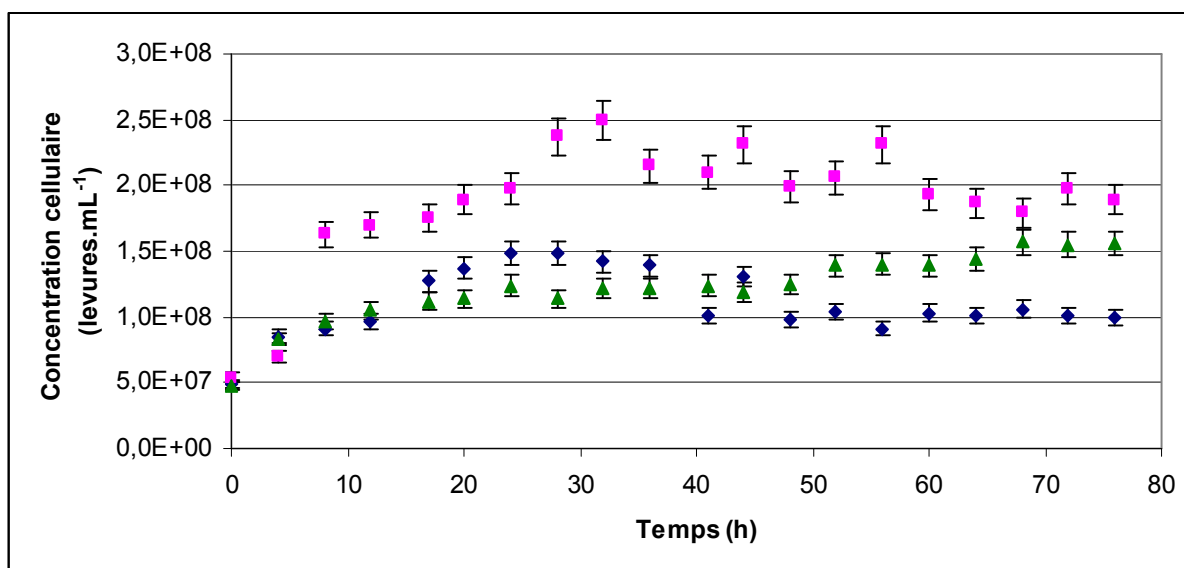


Figure 26: Evolution de la concentration cellulaire totale durant la fermentation de milieu à 325 et 245 g.L<sup>-1</sup> de sucre additionnés ou non d'azote et de phosphore. Comptages réalisés sur cellule de Thoma. Les barres d'erreurs présentées ici sont issues du calcul de l'écart type réalisé sur cinq comptages du même milieu. Les ■ représentent le milieu 245, les ▲ le milieu 245 N+P et ◆ les le milieu 325 N+P.

Les résultats des figures 25 et 26 montrent qu'il n'y a pas de relation évidente entre concentration cellulaire et activité fermentaire. En effet, malgré une concentration plus élevée en cellules dans le milieu 245, la fermentation est plus performante pour le milieu 245 N+P. Il semblerait donc que, la population contenue dans le milieu 245 N+P ait eu une activité plus intense. Ceci peut être expliqué par une meilleure viabilité des cellules grâce à la présence, dans le milieu 245 N+P, d'azote et de phosphore. L'important développement de cellule dans le milieu 245 par rapport au milieu 245 N+P, pourrait quant à lui être expliqué par l'inhibition de la croissance par une trop forte présence d'azote et de phosphore dans le milieu 245 N+P. L'excès de ces deux derniers éléments pourraient donc avoir pour effet d'inhiber la croissance mais permettre une meilleure activité fermentaire des cellules.

### III.2.1.2. Seconde fermentation

Pour cette fermentation de nouvelles conditions issues de discussion avec les industriels ont été définies. Les conditions pour cette fermentation ont donc été de : 33°C, 230 g équivalent saccharose.L<sup>-1</sup>, 2 g.L<sup>-1</sup> d'acidité, 120 rpm, 250 mg d'azote ajouté.L<sup>-1</sup> et 75 mg de phosphore ajouté.L<sup>-1</sup>.

Ce milieu a étéensemencé à différents taux d'inoculation pour le suivi de masse, afin d'avoir une première approche de l'influence du taux d'inoculation sur la fermentation. Les milieux notés X6, X7 et X8 ont respectivement étéensemencés à des concentrations initiales de 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup> et 10<sup>8</sup> levures par millilitre de milieu. La figure 27 illustre les pertes de masse observées au cours de ces fermentations.

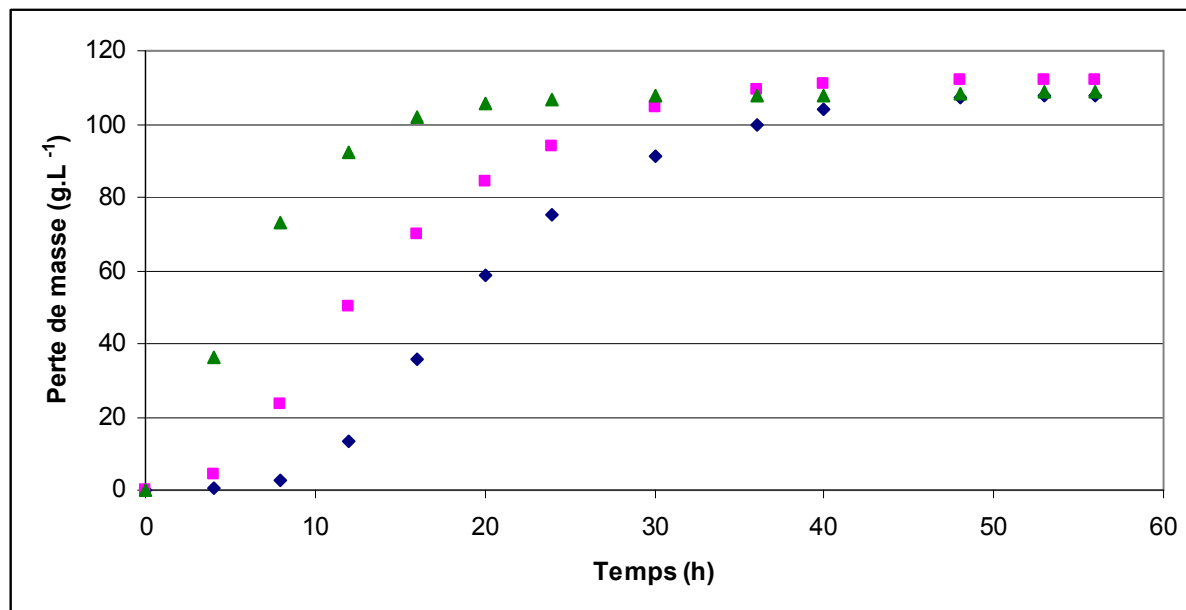


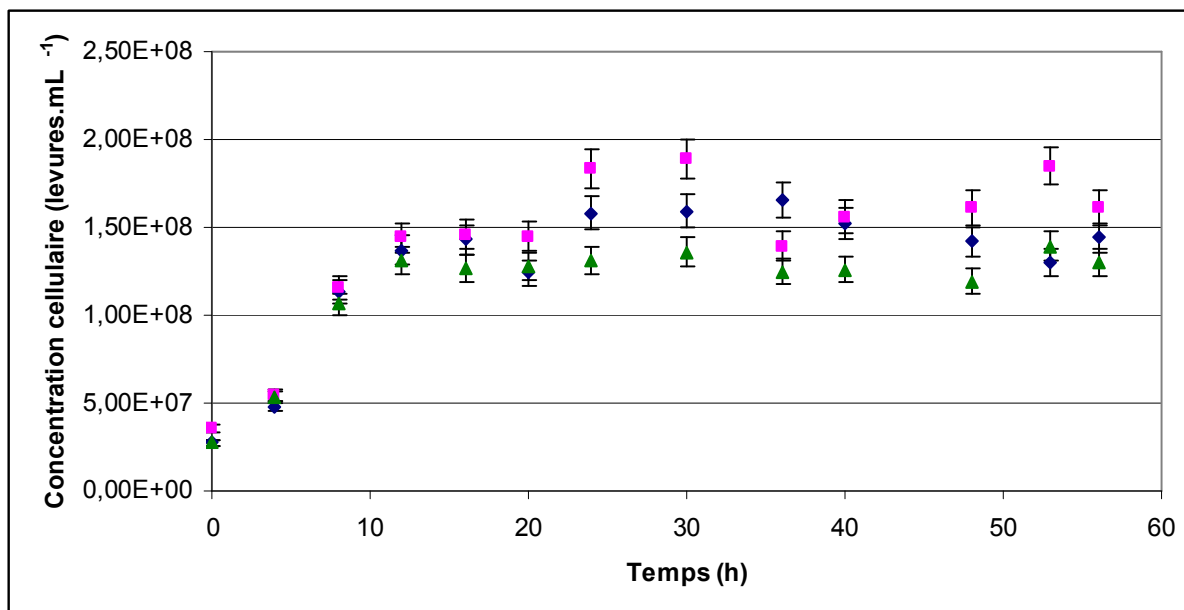
Figure 27: Evolution de la perte de masse durant la fermentation de milieux à  $230 \text{ g.L}^{-1}$  de sucres additionnés d'azote et de phosphore. Les  $\blacktriangle$  correspondent aux milieux X8, les  $\blacksquare$  à X7 et les  $\blacklozenge$  à X6. La perte de masse représentée tient compte de l'évaporation du milieu.

La figure 27 montre l'influence de la quantité d'inoculum sur la fermentation. Plus la quantité d'inoculum est importante, moins la courbe a une allure sigmoïde car le temps de latence diminue. La légère différence en fin de fermentation entre le milieu X7 et les deux autres milieux peut correspondre à une erreur de pesée de l'erlenmeyer X7 à T0 (masse à T0 surestimée). D'après le graphique 26 et l'équation 2, les levures semblent avoir consommé tout le sucre présent dans les milieux et avoir atteint un TAV de 14,8%, soit 96 % du rendement théorique.

Les durées des fermentations ont été très variables en fonction de la quantité d'inoculum introduit. En effet, pour le milieu X8 la durée de la fermentation a été de 39h, pour X7 de 48h et X6 53h. Cependant le même point final est obtenu dans tous les cas.

Des dosages d'azote assimilable ont été réalisés sur tous les milieux en fin de fermentation. Les concentrations observées étaient respectivement de 118, 128, 229  $\text{mg.L}^{-1}$ . La différence entre ces concentrations est due à la quantité d'inoculum. En effet, la population initiale augmentant, les besoins en azote permettant de faire de la biomasse diminuent. Donc la quantité d'azote assimilable résiduel est supérieure. Ceci reste à nuancer avec la grande différence de temps entre la prise d'échantillon pour ce dosage, car tous les échantillons ont été prélevés à 56h soit 8h après la fin de fermentation pour X7 et 20h après celle de X8. Sachant que la concentration en azote assimilable à T0 était de  $457 \text{mg}_N.\text{L}^{-1}$ , dont  $250 \text{mg}_N.\text{L}^{-1}$  provenait de la supplémentation, il est possible d'en conclure que le milieu a besoin d'être supplémenté en azote lorsque le taux d'inoculation est inférieur à  $10^9 \text{levures.mL}^{-1}$ .

Au cours de cette série d'expériences, trois erlenmeyers supplémentaires contenant le même milieu ont été inoculés à  $10^7 \text{levures.mL}^{-1}$  afin de réaliser le suivi biologique des fermentations à  $33^\circ\text{C}$



**Figure 28: Evolution de la concentration cellulaire durant la fermentation de milieux à 230 g.L<sup>-1</sup> de sucres additionnés d'azote et de phosphore inoculé à 10<sup>7</sup> levures.mL<sup>-1</sup> et incubé à 33°C. Comptages réalisés sur cellule de Thoma. Les barres d'erreurs présentées ici sont issues du calcul de l'écart type réalisé sur les trois mesures au même temps. Les ▲, ■ et les ◆ représentent les trois répétitions.**

Le suivi de la concentration en cellules dans le milieu, illustré figure 28, montre que chaque fermentation est unique ; même si l'inoculum, le milieu et les conditions de cultures sont les mêmes des fluctuations existent. Les levures se sont développées durant les 12 premières heures puis la population s'est stabilisée autour de 1,5x10<sup>8</sup>. Cette stabilisation semblerait indiquer que le milieu ne permet pas le développement et le maintien de population plus élevée. Le comptage en cellule de Thoma prend en compte toutes les cellules même les inactives. Il a donc été décidé de réaliser pour la suite des expériences des comptages avec une coloration au bleu de méthylène afin de ne prendre en compte que la population viable.

Les effets inhibiteurs de l'azote et du phosphore ont été mis en évidence pour des concentrations respectives de 2382 mg.L<sup>-1</sup> pour l'azote et 863 mg.L<sup>-1</sup> pour le phosphore. Ces concentrations ne doivent donc pas être trop élevées. L'azote et le phosphore ont cependant, d'après les résultats présentés et la bibliographie, un effet bénéfique sur la production d'éthanol.

Il a été remarqué, au cours de ces expériences, que le taux d'inoculation avait un rôle primordial sur la durée des fermentations. En effet, plus celui-ci augmente plus la fermentation est rapide. Cependant, le milieu utilisé semble pouvoir permettre uniquement le maintien d'une certaine concentration en levure, la quantité d'inoculum n'est donc pas augmentable à l'infini. De plus au niveau industriel les procédés utilisés ne permettent pas d'inoculer à des concentrations en cellules viables de 10<sup>8</sup> levures.mL<sup>-1</sup> à cause du recyclage cellulaire. Il a donc été décidé d'inoculer à des concentrations de 10<sup>7</sup> levures.mL<sup>-1</sup>.

Les résultats de la seconde fermentation semblent indiquer que les paramètres utilisés constituent une bonne base d'étude pour envisager l'amélioration des conditions de culture et serviraient de référence car, 230 g.L<sup>-1</sup> de saccharose permet théoriquement la production de 15,7 % d'éthanol et les conditions utilisées ont été très proches des conditions actuellement appliquées en industrie : 33°C, 2 g.L<sup>-1</sup> d'acide sulfurique. Cependant, les concentrations en azote et en phosphore sont potentiellement optimisables.

### III.2.2. Optimisation des concentrations en azote et en phosphore ajoutés

Afin de déterminer les effets indépendants de l'azote, du phosphore et du sucre initial, mais aussi des interactions entre plusieurs de ces paramètres sur la fermentation, on peut utiliser la méthodologie du plan d'expériences qui permet de modéliser les effets sous la forme de l'équation 13. Afin de caractériser les performances de la fermentation on peut prendre différents critères, appelés réponses (ici nommées  $Y_i$ ) et qui, compte-tenu des attentes industrielles étaient la productivité et le TAV final. Le rendement n'a pas été retenu comme réponse car les calculs de rendement s'effectuent en fonction de trois dosages, en début de fermentation le sucre et en fin de fermentation le sucre et la concentration en éthanol, ce qui implique la multiplication des erreurs lors des calculs.

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 \quad (\text{eq13})$$

avec  $X_1$ ,  $X_2$  et  $X_3$  correspondant respectivement aux concentrations en azote ajouté, en phosphore ajouté et en sucre initial. Le logiciel Minitab® a été utilisé afin de réaliser la régression de l'équation (13) et de déterminer les coefficients  $\beta_x$ . Ceci a permis, toujours avec le même logiciel, de déterminer les optima pour chaque paramètre.

Les gammes à étudier ont été choisies différemment, selon qu'il s'agisse de la concentration en azote ajouté et en phosphore ajouté ou de la concentration en sucre initial (tableau 14).

Pour ce qui est de cette dernière, la gamme a été déterminée par la concentration la plus basse permettant au moins la production de 15 % (v/v) d'éthanol sur saccharose soit, pour un rendement théorique de  $0,54 \text{ g d'éthanol} \cdot \text{g}_{\text{saccharose}}^{-1}$ ,  $220 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Cette gamme a aussi été déterminée par son point central qui a été fixé à  $245 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  et son point au niveau -1 à  $230 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  car des expériences avaient déjà été réalisées à ces concentrations (III.2. Expériences préliminaires). Ces deux dernières concentrations permettent potentiellement la production respective de 16,8 et de 15,7 % d'éthanol dans les milieux. Le point central à  $245 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  correspond à l'objectif à atteindre pour intensifier significativement le procédé.

Les gammes de phosphore et d'azote ajoutés, ont quant à elles été fixées à l'aide des concentrations utilisées sur sites et de la bibliographie (Ergun et Mutlu, 2000 ; Jacques et col., 2003 ; Dragone et col., 2004 ; Silva et col., 2008 (b) ; Laopaiboon et col., 2009). Les points centraux ont donc été fixés pour l'azote à  $200 \text{ mg}_{\text{N ajouté}} \cdot \text{L}^{-1}$  de milieu et pour le phosphore à  $75 \text{ mg}_{\text{P ajouté}} \cdot \text{L}^{-1}$ . Les valeurs basses des gammes ( $-\alpha$ ) ont été choisies les plus proches de 0 mg d'azote ou de phosphore ajouté, respectivement 31 et 9 ppm.

La significativité des valeurs des coefficients  $\beta_x$  a été mesurée à l'aide du test de Student effectué avec  $n-1$  degrés de liberté pour un intervalle de confiance de 0,95. La significativité des réponses a quant à elle été évaluée à l'aide du coefficient de corrélation  $R^2$ . Ce coefficient permet de mesurer l'intensité de la liaison qui peut exister entre les différentes variables mises en jeu dans le plan d'expérience.

Le test du manque d'adéquation permet de déterminer si le modèle traduit bien les données expérimentales. Le résultat de ce test doit donner une probabilité  $>0,05$  pour que la modélisation soit valide avec un intervalle de confiance de 95%.

Le tableau 18 présente l'ensemble des résultats obtenus, pour les dosages des sucres et de l'éthanol, utilisés pour réaliser les calculs des optima pour les réponses choisies.

**Tableau 18: Récapitulatif des résultats obtenus par dosages des milieux du plan d'expériences, réalisés en fin de fermentation.**

Expériences	Productivité (g <sub>éthanol</sub> .h <sup>-1</sup> .L <sup>-1</sup> )	TAV (% v/v)	Sucre résiduel (g.L <sup>-1</sup> )
1	1,91	14,48	43,40
2	2,07	14,50	14,98
3	1,91	14,52	42,56
4	1,96	14,16	10,66
5	1,52	12,13	64,80
6	1,91	14,07	11,88
7	1,52	12,11	65,78
8	1,87	14,45	10,30
9	1,94	14,01	11,74
10	1,94	14,01	13,45
11	1,88	14,52	11,98
12	1,81	14,42	37,31
13	1,57	12,50	80,54
14	1,85	14,18	8,90
15	1,77	13,94	27,98
16	1,74	13,88	35,77
17	1,71	13,69	38,50
18	1,73	13,80	37,26

Cependant, afin d'éliminer les observations atypiques ou suspectes pouvant entraîner des interprétations et des conclusions erronées, les mesures ayant un résidu standardisé aberrant ( $\leq -2$  ;  $+2$ ) et/ou une distance de Cook supérieure à 1 ont été écartées des valeurs prises en compte pour la modélisation. Ainsi les régressions suivantes n'ont pas été réalisées sur l'ensemble de mesures effectuées pour chaque réponse.

Enfin, il est à préciser que les résultats présentés ci-après sont représentatifs uniquement des fermentations réalisés à partir du SBP dans les conditions appliquées (température, acidité...) et pour les gammes étudiées. Les écarts types, calculées d'après les points centraux expériences 15 à 18, sont de 4,7 g.L<sup>-1</sup> pour le sucre résiduel et de 0,11 % (v/v) pour l'éthanol. Les résultats sont donc exprimés avec une erreur relative de +/- 13,6 % pour la concentration en sucre résiduel et de +/- 0,8 % pour la concentration en éthanol.

### III.2.2.1. Régression sur la productivité en éthanol

L'analyse des résidus pour la productivité a montré que les mesures des expériences 9 et 10 présentaient des résidus standardisés aberrants. Ces mesures ont donc été ignorées pour la modélisation. Le tableau 19 illustre les résultats obtenus pour les différents coefficients significatifs lors de la résolution de l'équation 13 pour la productivité. D'après le tableau 19, X<sub>1</sub> le facteur portant sur la concentration en azote ajouté, X<sub>3</sub> le facteur portant sur la concentration en sucre initial, X<sub>1</sub><sup>2</sup> le facteur quadratique portant sur la concentration en azote ajouté, X<sub>2</sub><sup>2</sup> le facteur quadratique portant sur la concentration en phosphore ajouté et l'interaction entre X<sub>1</sub> et X<sub>3</sub> semblent avoir un impact significatif sur la productivité. L'équation 13 devient donc :

$$\text{Productivité (g}_{\text{éthanol}}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}) = 1,7448 + 0,1288X_1 - 0,1003X_3 + 0,0549X_1^2 + 0,0341X_2^2 + 0,0636X_1X_3 \text{ (eq15)}$$

**Tableau 19: Coefficients significatifs de la régression de l'équation 13 pour la productivité.**

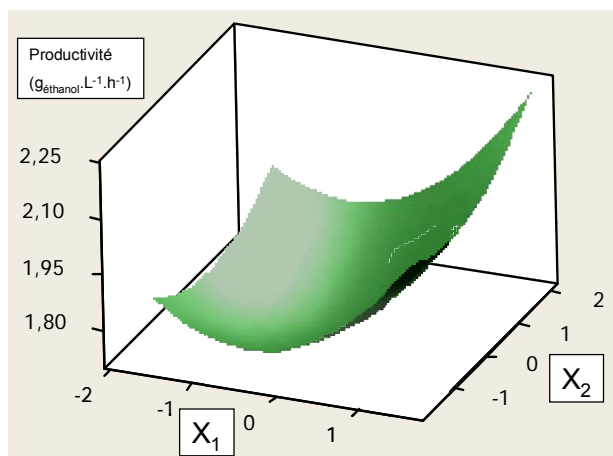
Termes	Coefficients	Probabilités
Constante	1,7448	0,000
X <sub>1</sub>	0,1288	0,000
X <sub>3</sub>	-0,1003	0,000
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	0,0549	0,027
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0,0341	0,005
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	0,0636	0,001

Le coefficient de corrélation de la régression étant de 0,954, l'équation 15 permet de modéliser correctement l'impact des paramètres étudiés sur la productivité. Cette équation montre que la concentration en phosphore ajouté, en azote ajouté et l'interaction entre le sucre initial et l'azote ajouté ont un effet bénéfique sur l'augmentation de la productivité, contrairement à la concentration en sucre initial. Le test du manque d'adéquation donnant un résultat de 0,145, le modèle traduit bien les données expérimentales. La réponse productivité a donc été conservée pour la suite du processus d'optimisation.

Les figures 29 à 31 représentent les graphiques des surfaces de réponse. Il est possible de voir sur ces figures les interactions entre les différents paramètres :

- la figure 29 montre que l'interaction entre X<sub>1</sub> et X<sub>2</sub> permet d'atteindre la productivité la plus élevée pour une valeur de X<sub>1</sub> et X<sub>2</sub> élevées
- la figure 30 montre que l'interaction entre X<sub>1</sub> et X<sub>3</sub> permet d'atteindre la productivité la plus élevée pour une valeur de X<sub>1</sub> et X<sub>3</sub> faibles
- la figure 31 montre que l'interaction entre X<sub>2</sub> et X<sub>3</sub> permet d'atteindre la productivité la plus élevée pour une valeur de X<sub>2</sub> élevée et X<sub>3</sub> faible

L'optimisation de la productivité semblerait donc être obtenue pour des concentrations élevée en phosphore ajouté (~151mg.L<sup>-1</sup>) et faibles en sucre initial (~220g.L<sup>-1</sup>) et il n'est pas possible de conclure au sujet de la concentration en azote ajouté à partir de ces graphiques.



**Figure 29: Représentation graphique de la surface de réponse pour la productivité avec les facteurs X<sub>1</sub> et X<sub>2</sub>. X<sub>3</sub> a été fixé au niveau 0 pour cette représentation.**

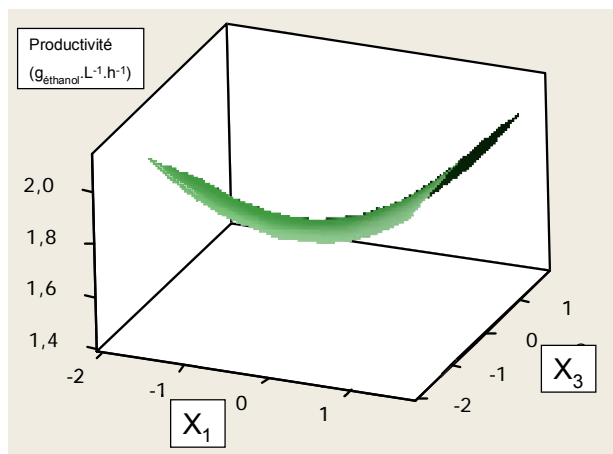


Figure 30: Représentation graphique de la surface de réponse pour la productivité avec les facteurs  $X_1$  et  $X_3$ .  $X_2$  a été fixé au niveau 0 pour cette représentation.

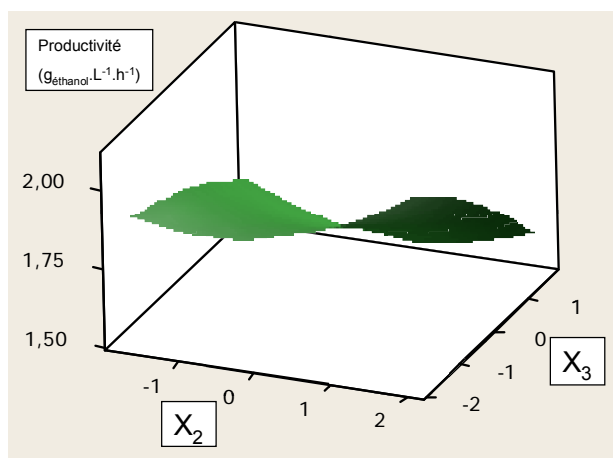


Figure 31: Représentation graphique de la surface de réponse pour la productivité avec les facteurs  $X_2$  et  $X_3$ .  $X_1$  a été fixé au niveau 0 pour cette représentation.

### III.2.2.2. Régression sur la concentration finale en éthanol

L'analyse des résidus pour la concentration finale en éthanol a montré que les mesures des expériences 2 et 10 présentaient des résidus standardisés aberrants. Ces mesures ont donc été ignorées pour la modélisation. Le tableau 20 illustre les résultats obtenus pour les différents coefficients significatifs lors de la résolution de l'équation 13 pour la concentration finale en éthanol. D'après le tableau 19,  $X_1$  le facteur portant sur la concentration en azote ajouté,  $X_3$  le facteur portant sur la concentration en sucre,  $X_1^2$  le facteur quadratique portant sur la concentration en azote ajouté,  $X_2^2$  le facteur quadratique portant sur la concentration en phosphore ajouté,  $X_3^2$  le facteur quadratique portant sur la concentration en sucre initial et l'interaction entre  $X_1$  et  $X_3$  semblent avoir un impact significatif sur la concentration finale en éthanol. L'équation 13 deviendrait donc :

$$\text{TAV (\% v/v)} = 13,9079 + 0,5313X_1 - 0,4227X_3 - 0,2458X_1^2 + 0,1938X_2^2 - 0,1525X_3^2 + 0,6359X_1X_3 \quad (\text{eq16})$$



**Tableau 20: Coefficients significatifs de la régression de l'équation 13 pour le TAV final.**

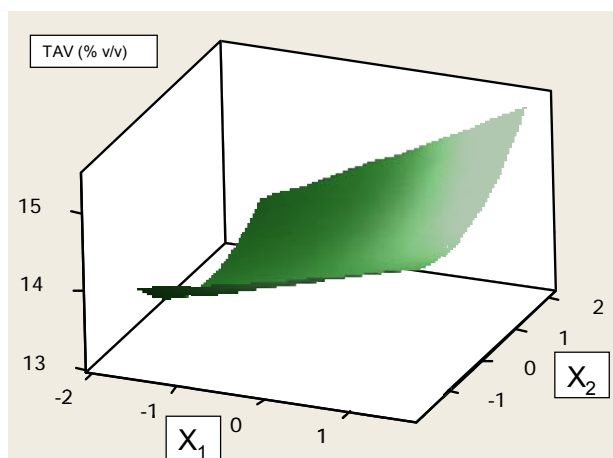
Termes	Coefficients	Probabilités
Constante	13,9079	0,000
$X_1$	0,5313	0,000
$X_3$	-0,4227	0,000
$X_1^2$	-0,2458	0,001
$X_2^2$	0,1938	0,000
$X_3^2$	-0,1525	0,004
$X_1 X_3$	0,6359	0,000

Le coefficient de corrélation de la régression étant de 0,984, l'équation 16 permet de modéliser correctement l'impact des paramètres étudiés sur la concentration finale en éthanol. Cette équation montre que l'azote ajouté a un effet ambigu sur la concentration finale en éthanol puisqu'il peut soit l'augmenter soit la diminuer selon les facteurs pris en compte. Le phosphore ajouté, quant à lui, semblerait permettre d'augmenter la concentration finale en éthanol. La concentration en sucre initial à l'inverse semble avoir un effet négatif sur la production d'éthanol, mais son interaction avec la concentration d'azote ajouté semble bénéfique. Le test du manque d'adéquation donnant un résultat de 0,476, le modèle traduit bien les données expérimentales. La réponse TAV final a donc été conservée pour la suite du processus d'optimisation.

Les figures 32 à 34 représentent les graphiques des surfaces de réponse. Il est possible de voir sur ces figures les interactions entre les différents paramètres :

- la figure 32 montre que l'interaction entre  $X_1$  et  $X_2$  permet d'atteindre le TAV le plus élevé pour des valeurs de  $X_1$  et  $X_2$  élevées
- la figure 33 montre que l'interaction entre  $X_1$  et  $X_3$  permet d'atteindre la concentration en éthanol la plus élevée pour une valeur de  $X_1$  faible et  $X_3$  faible. Cette figure montre que la production d'éthanol reste presque constante lorsque les facteurs  $X_1$  et  $X_3$  augmentent simultanément.
- la figure 34 montre que l'interaction entre  $X_2$  et  $X_3$  permet d'atteindre la concentration en éthanol la plus élevée pour une valeur de  $X_2$  élevée et  $X_3$  faible. Cependant  $X_2$  ne semble pas beaucoup affecter la production d'éthanol.

L'optimisation de la concentration en éthanol semblerait donc être obtenue pour des concentrations élevée en phosphore ajouté ( $\sim 151\text{mg.L}^{-1}$ ) et faibles en sucre initial ( $\sim 220\text{g.L}^{-1}$ ) et il n'est pas possible de conclure au sujet de la concentration en azote ajouté à partir de ces graphiques.



**Figure 32: Représentation graphique de la surface de réponse pour le TAV final avec les facteurs  $X_1$  et  $X_2$ .  $X_3$  a été fixé au niveau 0 pour cette représentation.**

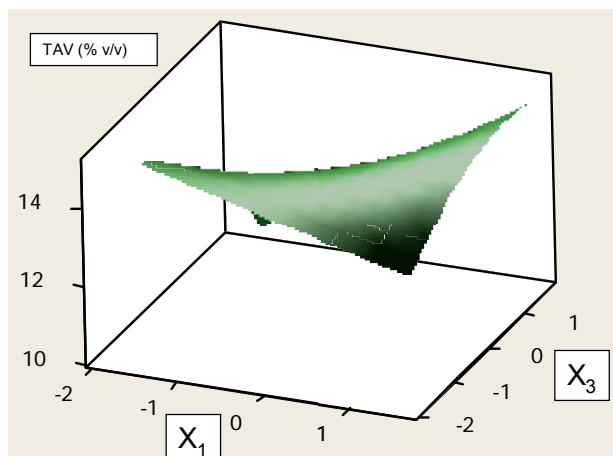


Figure 33: Représentation graphique de la surface de réponse pour le TAV final avec les facteurs X<sub>1</sub> et X<sub>3</sub>. X<sub>2</sub> a été fixé au niveau 0 pour cette représentation.

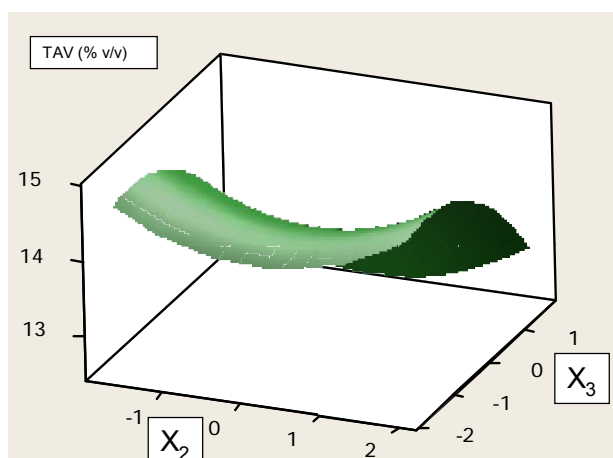


Figure 34: Représentation graphique de la surface de réponse pour le TAV final avec les facteurs X<sub>2</sub> et X<sub>3</sub>. X<sub>1</sub> a été fixé au niveau 0 pour cette représentation.

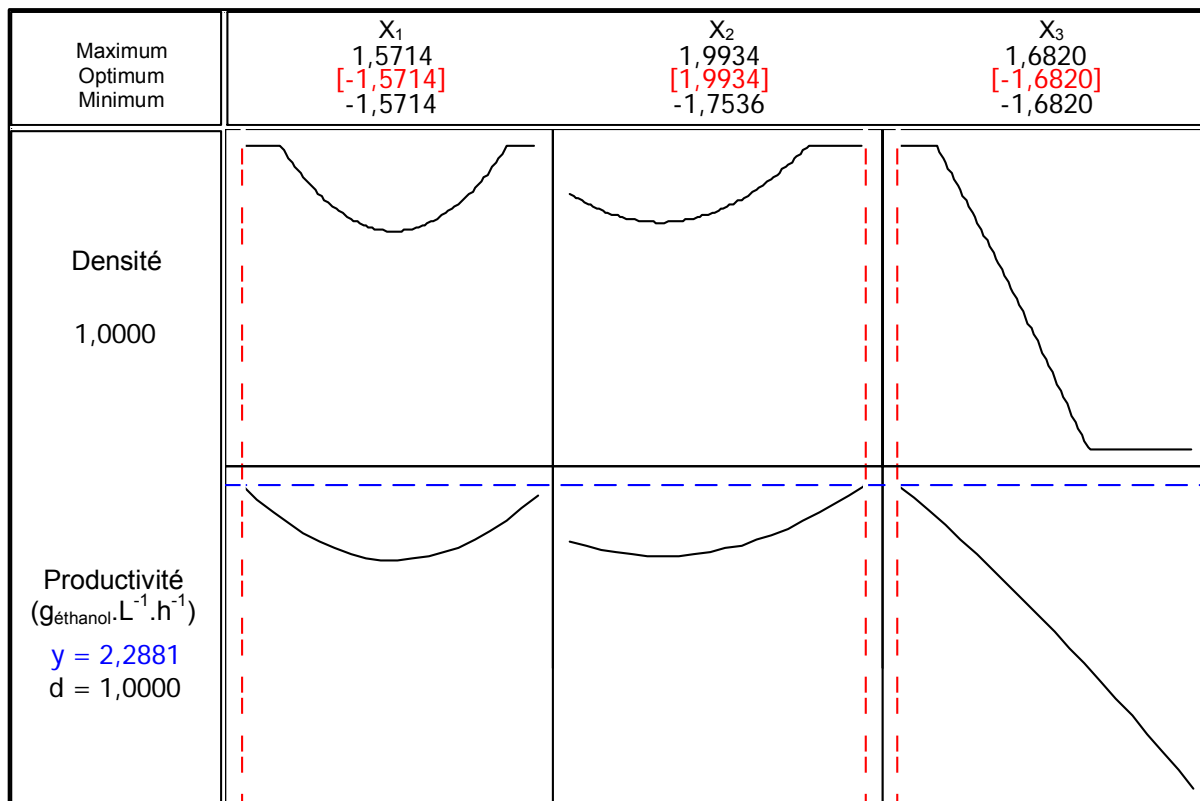
### III.2.2.3. Recherche d'optimum

Comme le montre les figures 29 à 34, il est difficile de déterminer graphiquement les conditions de culture optimales. En effet les représentations graphiques ne permettent l'observation des réponses en fonctions de seulement deux variables, la troisième variable étant fixe. Afin d'optimiser les milieux de culture et de déterminer exactement quelles sont les meilleures concentrations en azote ajouté, phosphore ajouté et en sucre initial, une recherche d'optima a été réalisée à l'aide du logiciel Minitab®.

Cette recherche a dans un premier temps porté indépendamment sur la productivité puis sur le TAV final. Dans un second temps, cette recherche a eu lieu simultanément sur ces deux réponses. L'objectif fixé lors de la recherche d'optimum a été de maximiser la productivité et la concentration en éthanol. La densité de probabilité mesure ici la probabilité de trouver l'optimum, en l'occurrence le maximum, pour les réponses aux valeurs de X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> et X<sub>3</sub> considérés; plus sa valeur est proche de 1 plus la probabilité de trouver l'optimum est élevée.

La figure 35 illustre la recherche de l'optimum pour la productivité. Cette figure montre que la productivité est maximale pour des concentrations en azote ajouté de 31 mg.L<sup>-1</sup>, en phosphore ajouté de 151 mg.L<sup>-1</sup> et en sucre initial de 220 g.L<sup>-1</sup>. Ces conditions devraient, d'après le modèle utilisé, permettre l'obtention d'une productivité de 2,29 g<sub>éthanol</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

L'optimum trouvé étant au bord du domaine expérimental, il est possible que l'optimum ne soit pas contenu dans le domaine exploré.



**Figure 35: Recherche d'optima sur la productivité.** Les lignes pointillées verticales localisent l'optimum pour les  $X_i$ .  $y$  correspond à la valeur de la productivité à l'optimum. Les intersections entre les courbes de réponses et la ligne pointillée horizontale représentent graphiquement les valeurs optimales.

La figure 36 présente la recherche de l'optimum pour la concentration en éthanol. Cette figure montre que la concentration en éthanol est maximale pour des concentrations en azote ajouté de 31 mg.L<sup>-1</sup>, en phosphore ajouté de 9 mg.L<sup>-1</sup> et en sucre initial de 220 g.L<sup>-1</sup>. Ces conditions devraient, d'après le modèle utilisé, permettre l'obtention de 15,79% (v/v) d'éthanol. Cependant, 220 g.L<sup>-1</sup> de saccharose ne permettent théoriquement la production que de 15,1 % (v/v) d'éthanol. Les concentrations en azote ajouté et en sucre initial sont identiques à celles trouvées pour la productivité. Seule diffère la concentration en phosphore ajouté, cependant celle-ci n'a que peu d'influence sur le TAV final comme le montre la figure 36.

Ici encore, l'optimum trouvé étant au bord du domaine expérimental, il est possible que l'optimum ne soit pas contenu dans le domaine exploré.

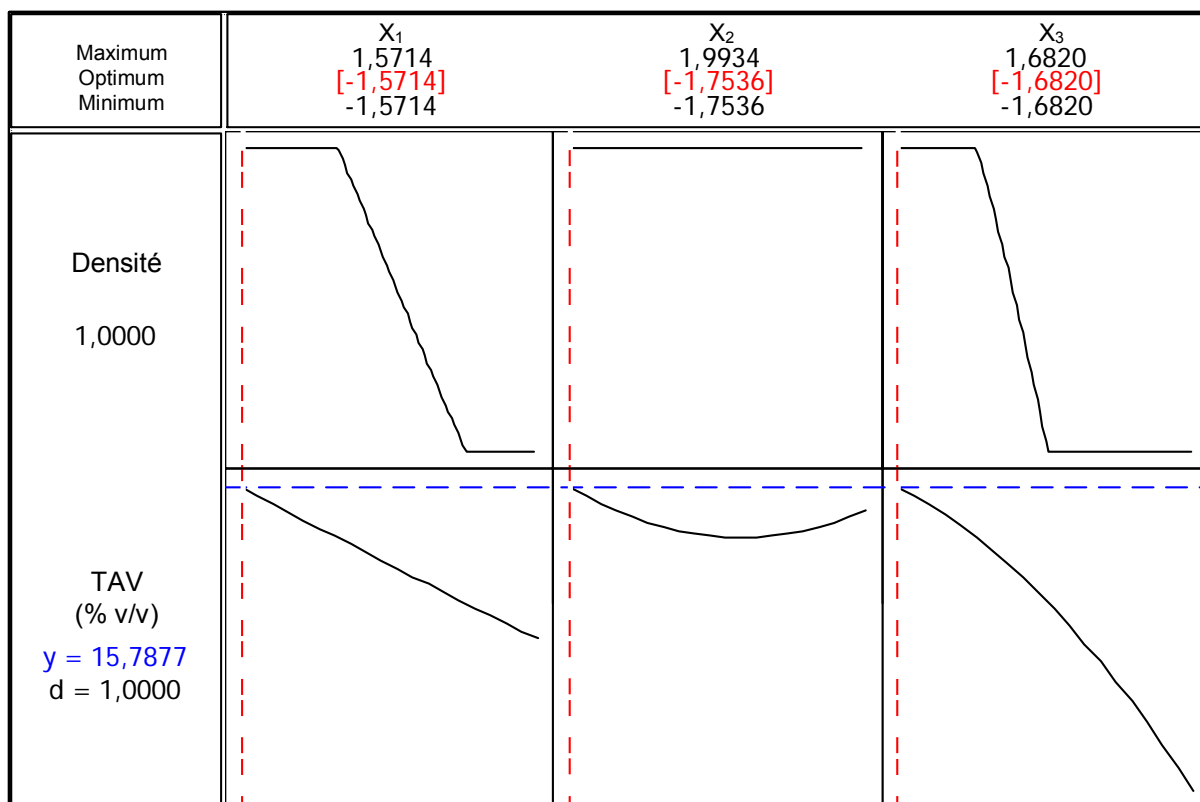


Figure 36: Recherche d'optima sur la concentration en éthanol. Les lignes pointillées verticales localisent l'optimum pour les  $X_i$ .  $y$  correspond à la valeur du TAV final à l'optimum. Les intersections entre les courbes de réponses et la ligne pointillée horizontale représentent graphiquement les valeurs optimales.

La figure 37 présente la recherche d'optimum effectuée simultanément pour la productivité et pour le TAV final. Dans ce cas, ce qui a été défini comme « optimum » était un compromis entre les deux réponses étudiées permettant d'obtenir simultanément des valeurs élevées pour la productivité et le TAV. Pour cette recherche les valeurs minimales entrées comme paramètres étaient de  $2 \text{ g}_{\text{éthanol}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  pour la productivité et de 15 % (v/v) pour le TAV.

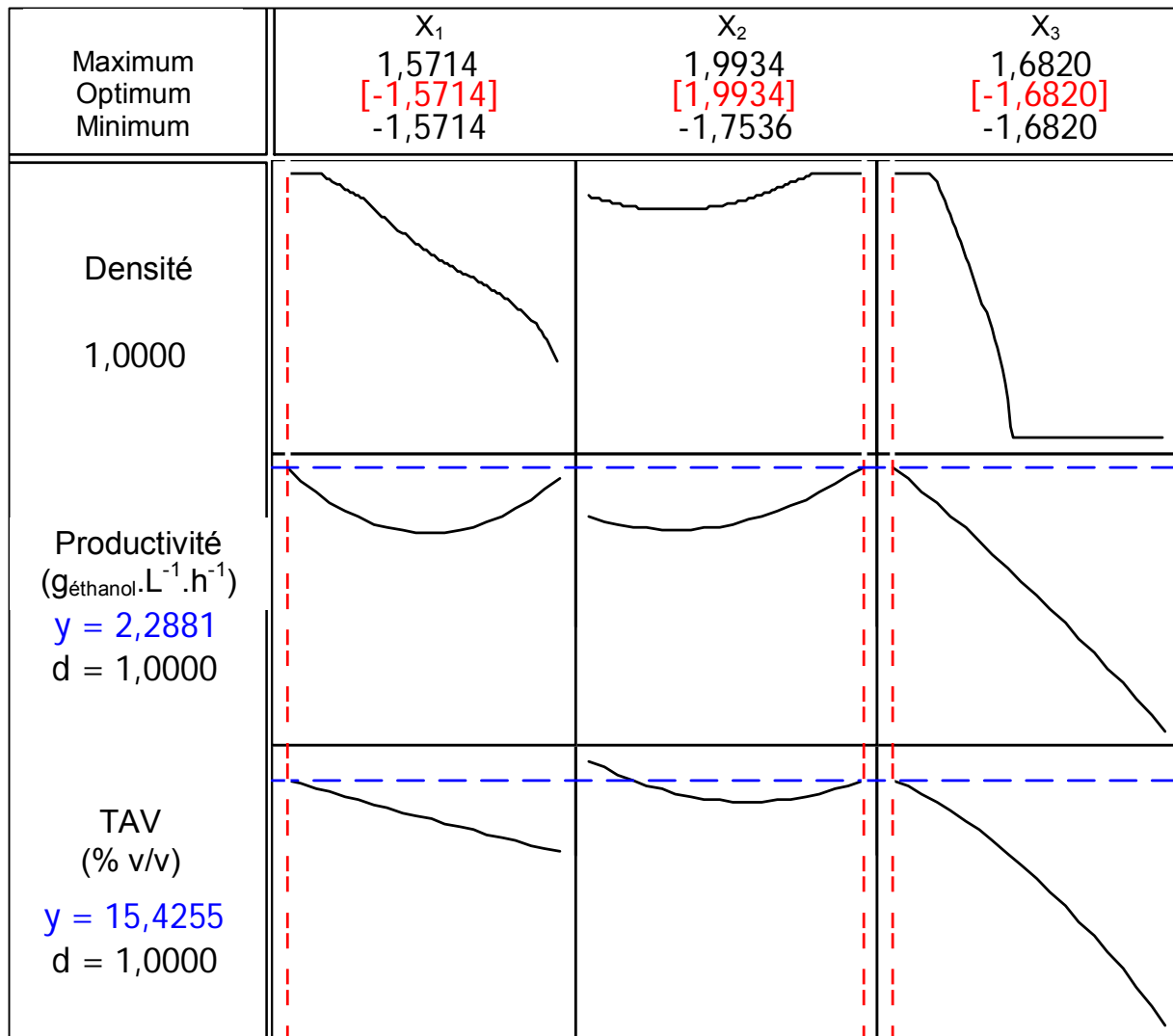


Figure 37: Recherche d'optima sur la productivité et le TAV final. Les lignes pointillées verticales localisent l'optimum simultanément pour les deux réponses pour les  $X_i$ . Les  $y$  correspondent aux valeurs de la productivité et du TAV final à l'optimum. Les intersections entre les courbes de réponses et les lignes pointillées horizontales représentent graphiquement les valeurs optimales.

La figure 37, montre un optimum pour des concentrations en azote ajouté de  $31 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , en phosphore ajouté de  $151 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  et en sucre initial de  $220 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Ces conditions devraient, d'après le modèle utilisé, permettre l'obtention de  $15,4 (+/- 1,34) \% (v/v)$  d'éthanol et d'une productivité de  $2,29 (+/- 0,385) \text{ g}_{\text{éthanol}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . La valeur du TAV est dans la gamme théorique attendue, puisque  $220 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de saccharose permettent théoriquement la production que de  $15,1 \% (v/v)$  d'éthanol.

Trois expériences réalisées avec des concentrations en azote ajouté de  $31 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , en phosphore ajouté de  $151 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  et en sucre initial de  $220 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  ont montré des TAV à  $13,3 (+/- 0,1) \% (v/v)$  en moyenne. L'écart entre la valeur prédite et la valeur trouvée pour le TAV s'explique en partie par l'incertitude élevée associée au TAV prédit par le modèle, car les concentrations en sucre, en azote et phosphore ajoutés sont aux bords du domaine expérimental. De plus, il y a eu un changement de lot de SBP entre le plan d'expériences et la validation réalisée en triplicat. La composition du SBP a donc pu varier.

La productivité moyenne obtenue pour le milieu optimisé réalisé en triplicat était de  $2,19 \text{ g}_{\text{éthanol}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  ce qui correspond à ce qui avait été prévu. La concentration en sucre résiduel était quant à elle en moyenne de  $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  ce qui signifie que la fermentation n'a pas été tout à fait complète et que la composition du milieu peut encore être améliorée. Cette concentration en sucres résiduels est néanmoins plus faible que toutes celles obtenues lors de la réalisation du plan d'expériences. Des

travaux supplémentaires sur la composition du milieu de culture ont été réalisés par la suite afin de compléter cette étude car d'autres composés que N et P peuvent avoir des effets sur la fermentation.

Il a été précisé dans la bibliographie que, si le manque d'azote assimilable provoque l'inactivation du système de transport du glucose, l'arrêt en phase G1 du cycle cellulaire, augmente la production de glycérol et diminue les capacités fermentaires (Brandberg et col., 2006), les fortes concentrations en azote provoquent quant à elle la diminution de la production d'éthanol et augmentent la quantité de biomasse (Lidén G et col., 1995). Ceci corrobore les observations réalisées sur l'effet de la concentration en azote sur la fermentation.

Le phosphore, comme déjà observé dans la littérature (Silva et col. 2008 (b)), permet d'améliorer la productivité de *Saccharomyces cerevisiae* lors la production d'éthanol. Ceci s'explique par une augmentation de la synthèse de polyphosphates de faible poids moléculaire participant dans les cellules au transport et au piégeage de cations mono et divalents (Lichko et col., 1982) permettant ainsi une augmentation générale du métabolisme.

Le SBP contient déjà de l'azote assimilable par les levures. Pour un milieu à  $220 \text{ g.L}^{-1}$  de sucre, le SBP apporte 198 mg d'azote assimilable par litre de milieu, estimé d'après le dosage de l'azote assimilable au formaldéhyde. La concentration optimale pour la production d'éthanol serait donc de 198 mg provenant du SBP additionné de 31 mg d'azote ajouté, soit  $229 \text{ mg}_N.\text{L}^{-1}$ . Cette concentration optimale en azote assimilable est proche de celle observée dans la littérature, concernant l'optimisation de la concentration en azote assimilable pour la production d'éthanol (Wang et col, 2007 (a)).

D'après les résultats de la partie III.2.1. , la concentration cellulaire produite avec la souche utilisée est d'environ  $1,5 \times 10^8 \text{ cell.mL}^{-1}$ . Ce qui correspond à une biomasse produite de  $4,9 \text{ g.L}^{-1}$ . La biomasse levurienne est donc composée au maximum de 4,6 % ( $\text{m.m}^{-1}$ ) d'azote. Cette valeur est comprise dans la gamme de 3 à 9 % d'azote composant généralement une levure (tableau 8). Cependant, il n'a pas été déterminé si l'utilisation de l'azote assimilable était totale.

Le plan d'expériences mis en œuvre ici a montré que l'optimisation des concentrations en azote ajouté de  $31 \text{ mg.L}^{-1}$  et en phosphore de  $151 \text{ mg.L}^{-1}$  pour la valeur la plus basse en sucre initial de  $220 \text{ g.L}^{-1}$ , permettait d'atteindre des valeurs de productivité d'environ  $2 \text{ g}_{\text{éthanol}}.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  sur l'ensemble de la fermentation. Ceci est très similaire à ce qui se trouve dans la bibliographie sur les milieux composés de produit betteravier et les milieux à haute densité (Popov et col., 2010 ; Breisha, 2010 ; Pereira et col. 2010). Cependant, les TAV obtenues sont relativement faibles au regard des 16 et 16,5 % (v/v) d'éthanol obtenus, respectivement, par Breisha, 2010 et Pereira et col. 2010. Ceci s'explique par le fait que les fermentations réalisées n'ont pas été complètes, c'est-à-dire que tout le sucre mis initialement n'a pas été consommé. Il y a donc eu des arrêts de fermentation.

#### III.2.2.4. Validation de la supplémentation optimale en azote

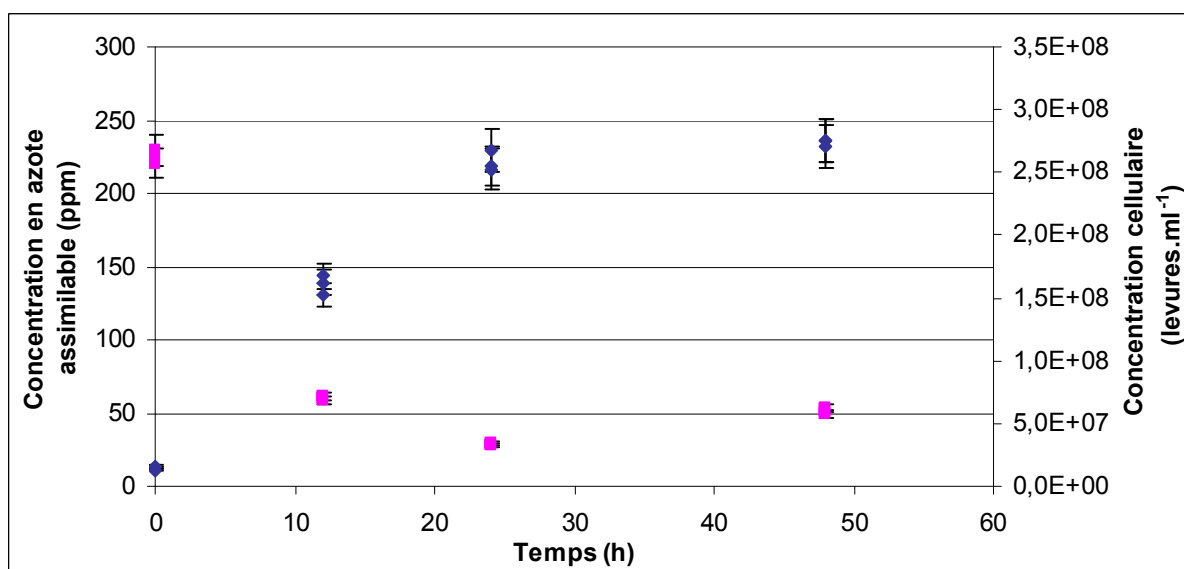
Ce faible apport en azote nécessaire au milieu de fermentation ayant suscité des interrogations, il a été décidé de réaliser le suivi de la concentration en azote assimilable au cours du temps dans le milieu optimisé pour les concentrations d'azote, de phosphore et de sucre initial.

Le tableau 21 présente les résultats obtenus pour les dosages de l'azote assimilable par formol titration au cours du temps. Ce tableau montre, que l'azote est consommé en grande majorité durant la phase de croissance et qu'en fin de fermentation il y a un léger relargage de l'azote dans le milieu. Cependant, il n'y a jamais de carence en azote assimilable au cours de la fermentation.

**Tableau 21: Résultats obtenus pour les dosages de l'azote assimilable dans les conditions optimales prédites par le plan d'expériences**

Temps (h)	N1	N2	N3	Moyenne
0	226	220	229	225 (+/- 4,6)
12	62	60	58	60 (+/- 2,0)
24	28	30	28	28 (+/- 1,5)
48	53	51	49	51 (+/- 2,0)

La figure 38 montre l'évolution de la concentration cellulaire totale et de la concentration en azote assimilable au cours du temps. Ce graphique met en évidence la relation entre croissance et la consommation d'azote mais n'explique pas le relargage d'azote assimilable en fin de fermentation.



**Figure 38: Evolution en milieu optimisé pour les concentrations en azote, phosphore et sucre initial, de la concentration cellulaire totale (◆) et de la concentration en azote assimilable (■).**

La figure 39 présente l'évolution de la concentration cellulaire viable et de la concentration en azote assimilable au cours du temps. Comme précédemment ce graphique montre la relation entre croissance et consommation d'azote. Cependant, il est possible de déduire de cette figure que l'augmentation de la concentration d'azote assimilable en fin de fermentation est liée à la diminution de la viabilité. En effet, d'après ces résultats, l'activité protéolytique intracellulaire perdurerait après la perte de la viabilité cellulaire. Cependant, les formes d'azotes libérées dans le milieu n'ont pas été déterminées.

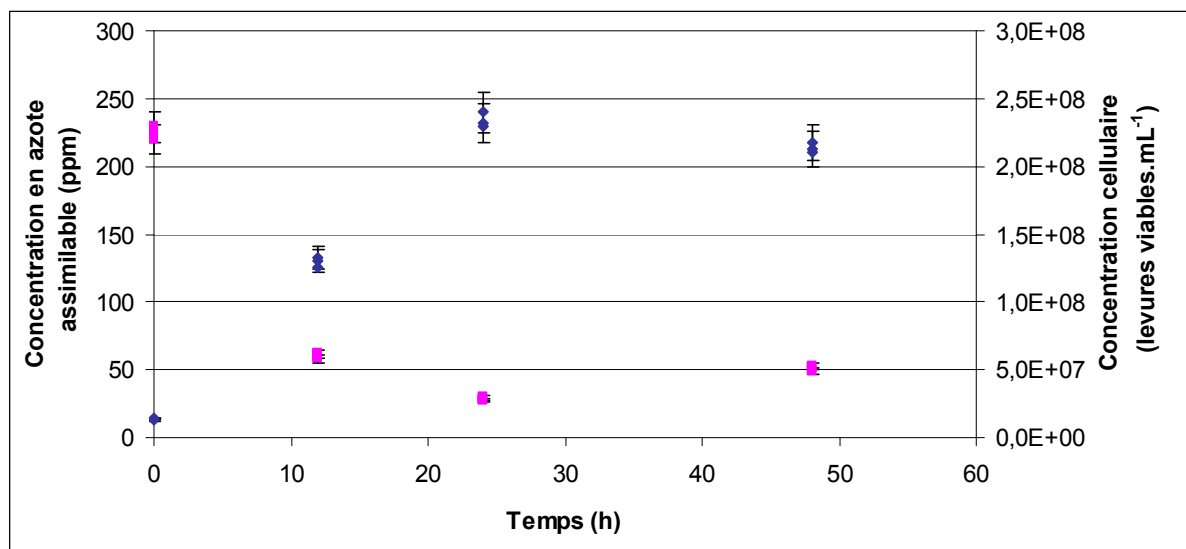


Figure 39: Evolution, en milieu optimisé pour les concentrations en azote, phosphore et sucre initial, de la concentration cellulaire viable (◆) et de la concentration en azote assimilable (■).

Le dosage de l'azote assimilable par formol titration est dépendant du pH et il a été démontré que le résultat peut sous-estimer la concentration en azote assimilable lorsqu'il est comparé à l'azote réellement assimilé par les levures (Casalta et col., 2011). C'est pour cela que des dosages d'azote total ont été réalisés afin de confirmer les résultats présentés ci-avant.

Le tableau 22 présente les résultats obtenus pour les dosages d'azote total. Ce tableau montre que l'azote total consommé dans le surnageant entre T0 et Tfinal correspond à la consommation d'azote assimilable au cours de la même période. Cette même quantité d'azote se retrouve à Tfinal dans le culot de centrifugation et correspond donc bien à la consommation de l'azote par les levures pour la croissance de la biomasse. Comme espéré, la quantité introduite à T0 est retrouvée à Tfinal (différence due aux erreurs de dosage). Ceci indique que les dosages d'azote assimilable présentés précédemment sont fiables.

Tableau 22: Concentration en azote total dans les différentes phases pour T0 et Tfinal.

Culot inoculum (1,5x10 <sup>7</sup> levures.mL <sup>-1</sup> )	Culot T0 avant inoculation	Surnageant T0 avant inoculation	Culot T48 (2,1 x 10 <sup>8</sup> levures.mL <sup>-1</sup> )	Surnageant T48
19 ppm	3 ppm	462 ppm	192 ppm	275 ppm
somme à T0			Somme à Tf	
484 ppm			467 ppm	

Le tableau 23 présente les résultats obtenus pour les concentrations en sucre et en éthanol à la fin de la fermentation.

Tableau 23: Résultats obtenus pour la production d'éthanol

	N1	N2	N3	Moyenne
TAV (% v/v)	13,2	13,3	13,4	13,3 (+/- 0,1)
Rendement (g <sub>éthanol</sub> .g <sub>sucré</sub> <sup>-1</sup> )	0,468	0,470	0,474	0,471 (+/- 0,003)
Productivité (g <sub>éthanol</sub> .L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	2,18	2,18	2,20	2,19(+/- 0,01)

Le tableau 23 montre que les fermentations réalisées ici ont eu des performances fermentaires similaires à celles qui avaient été observées lors de la réalisation de précédentes fermentations identiques.



La proportion moyenne en azote des levures apportées par l'inoculum est de 7,4% (m/m) et des levures en fin de fermentation de 4,5% (m/m). Cette différence s'explique par un milieu de préculture (YEPD) très riche en azote. Ces valeurs restent dans les normes généralement admises de 3 à 9% (m/m) de la biomasse. Il n'y a donc pas de problème sur la nutrition azoté avec ce milieu.

Les milieux à plus forte concentration en sucre contenant plus de SBP, leur concentration en azote assimilable est supérieure au milieu présenté ici. Il n'y a donc eu aucun cas de carence en azote au cours des expériences menées.

Des dosages d'acides aminés dans le SBP ont été sous-traités auprès d'un laboratoire indépendant. Les résultats, présentés annexe 3, montrent que le SBP contenait 10 acides aminés différents avec une concentration cumulée de  $4,9 (+/- 3,0) \text{ g}_{\text{acides aminés}} \cdot \text{kg}^{-1}$  de SBP, soit une concentration d'azote assimilable proche de celle trouvée dans le SBP. De plus, le dosage d'azote ammoniacal réalisé par l'UNGDA, présenté en annexe 4, a montré une absence d'ammoniaque dans le SBP. L'azote assimilable contenu dans le SBP provient donc uniquement des acides aminés.

L'analyse du plan d'expériences a montré que les besoins de suppléments en azote ammoniacal et en phosphore des milieux à base de SBP étaient respectivement de 31 et 151  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . Pour la suite de l'optimisation du milieu de culture, tous les milieux testés ont été supplémentés avec ces concentrations en azote et en phosphore.

### III.2.3. Effets de l'ajout d'ions métalliques

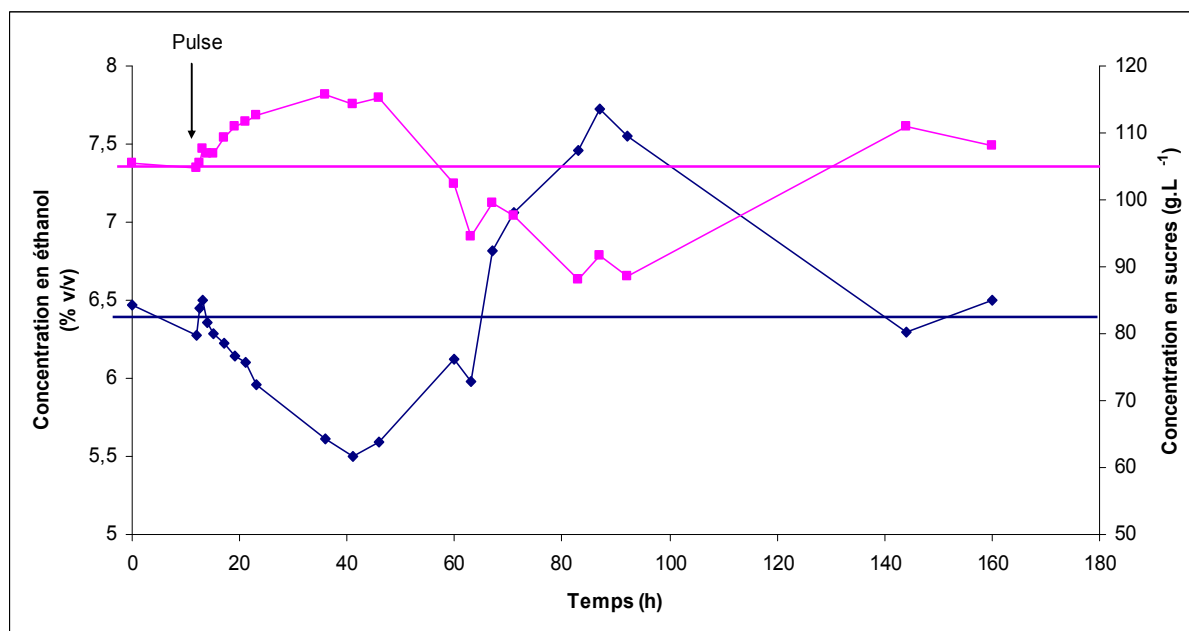
D'après la bibliographie, certains ions métalliques ont des effets positifs sur la fermentation. Il a donc été décidé d'étudier les effets sur la fermentation du magnésium, du fer, du zinc, du cuivre et du manganèse car ceux-ci semblent importants pour la fermentation. Le calcium et le potassium n'ont pas été testés car d'après les dosages de l'UNGDA (annexe 4) le SBP contient ces deux ions en quantité. En effet, pour un milieu contenant  $220 \text{ g}_{\text{sucre équivalent saccharose}} \cdot \text{L}^{-1}$ , le SBP apporte 270 ppm de calcium et 7600 ppm de potassium. Ces concentrations sont comprises dans les gammes de besoins de la levure (cf partie I.3.3.1. La composition du milieu).

Deux méthodes ont été testées afin d'évaluer l'impact des ions métalliques sur la fermentation, la technique des pulses sur un réacteur placé dans un état correspondant au milieu de la fermentation et la même méthode que pour le plan d'expériences consistant en des séries de fermentation en erlenmeyer. Pour ces dernières toutes les séries d'expériences contenaient un témoin composé du même milieu mais sans ajout de composé. Les résultats sont donc exprimés uniquement par comparaison à ce témoin.

#### III.2.3.1. Effets des pulses d'ions métalliques sur la fermentation continue

Le milieu utilisé pour l'alimentation du réacteur était le milieu optimisé précédemment durant le plan d'expériences composé de  $220 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de sucre équivalent saccharose,  $31 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  d'azote ajouté et  $151 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de phosphore ajouté. Le temps de séjour du milieu dans le réacteur a été fixé à 52 h afin de stabiliser celui-ci lorsque le sucre et l'éthanol sont tous deux présents, environ  $110 \text{ g}_{\text{sucre équivalent saccharose}} \cdot \text{L}^{-1}$  et 7% d'éthanol. Ceci a permis de mesurer l'effet de l'ajout d'un ion métallique, à la fois sur la consommation de sucre et sur la production d'éthanol. Quatre injections ont été réalisées avec 600ppm de fer, 120 ppm de magnésium, 300 ppm de magnésium et 2 ppm de zinc.

Un exemple de résultats est présenté figure 40 en terme de variations observées pour les concentrations en sucre et en éthanol pour le pulse réalisé avec 300 ppm de magnésium.



**Figure 40:** Suivi des concentrations en sucre et du TAV lors de l'ajout de magnésium dans un réacteur continu à l'état stationnaire. Les ■ représentent la concentration en sucre et les ◆ le TAV. Les lignes horizontales représentent l'état stationnaire.

Dans un premier temps, un effet inhibiteur a été observé puisque la concentration en éthanol diminue alors que celle en sucre augmente. Après 48h, l'effet inverse apparaît et on observe une amélioration des performances de la fermentation. Pour un temps de séjour de 52 h, cela signifie que l'inhibition a eu lieu jusqu'à des concentrations supérieures à 140 ppm de magnésium contrairement à ce qui était annoncé dans la bibliographie dans laquelle la concentration inhibitrice était de 24 g.L<sup>-1</sup>. Ceci montre bien qu'avec le substrat utilisé il n'est pas possible de prédire des résultats par rapport à la bibliographie. Les résultats pour les 4 séries d'expériences ont été synthétisés dans le tableau 24.

**Tableau 24:** Perturbations maximales observées par rapport à l'état stationnaire après injection des composés testés. La concentration de 300 ppm de magnésium ayant dans un premier temps été inhibitrice puis activatrice de la fermentation, ces valeurs sont présentées sous la forme : minimum de la phase d'inhibition/maximum de la phase d'activation.

Pulse	Concentration cellulaire (10 <sup>7</sup> levures.mL <sup>-1</sup> )	TAV (% v/v)	Concentration en sucre (g.L <sup>-1</sup> )
Fer 600 ppm	+2	+ 2,1	- 25
Magnésium 120 ppm	+1	+ 0,2	- 11
Magnésium 300 ppm	- 0,5/ + 2,7	- 1/ + 1,2	+ 10/ - 17
Zinc 2 ppm	-0,6	- 2,3	+ 28

Ces expériences montrent que le magnésium permet une amélioration des conditions de culture. Cependant, lorsqu'il est présent en trop grande concentration, il devient inhibiteur. Le zinc a provoqué l'inhibition de la production d'éthanol lorsqu'il été présent à une concentration de 2 ppm. Le fer a quant à lui permis une amélioration notable des conditions de culture pour des valeurs de 600 ppm. D'après ces résultats, il a été décidé d'effectuer une série d'expériences en batch afin de confirmer l'effet bénéfique du fer et du magnésium sur l'ensemble de la fermentation.

### III.2.3.2. Effets des ions métalliques sur la fermentation en batch

#### III.2.3.2.a. En milieu optimisé

Afin de compléter l'étude, le manganèse et le cuivre ont aussi été testés associés au fer et au magnésium. Pour ce faire quatre milieux différents ont été inoculés en erlenmeyer pour des fermentations en batch :

- Un milieu contenant 220 g.L<sup>-1</sup> de sucre équivalent saccharose apporté par le SBP addition 31 mg.L<sup>-1</sup> d'azote et 151 mg.L<sup>-1</sup> de phosphore, sans ajout d'ions métalliques. Ce milieu a constitué le milieu de référence pour cette série d'expériences.
- Un milieu contenant le SBP avec 31 mg.L<sup>-1</sup> d'azote, 151 mg.L<sup>-1</sup> de phosphore et 600 ppm de fer. Nommé « Fe ».
- Un milieu contenant le SBP avec 31 mg.L<sup>-1</sup> d'azote, 151 mg.L<sup>-1</sup> de phosphore, 600 ppm de fer et 120 ppm de magnésium. Nommé « FeMg ».
- Un milieu contenant le SBP avec 31 mg.L<sup>-1</sup> d'azote, 151 mg.L<sup>-1</sup> de phosphore, 600 ppm de fer, 120 ppm de magnésium, 0,3 ppm de manganèse et 0,3 ppm de cuivre. Nommé « FeMgCuMn ».

Les résultats des expériences sont présentés tableau 25 sous forme de perte ou de gain par rapport au milieu de référence. Ces tests n'ont pas permis d'établir que l'ajout d'un des ions utilisés est utile. Néanmoins, aucun de ces ions, pour les concentrations utilisées, n'a montré une quelconque toxicité.

**Tableau 25: Résultats obtenus en fin de fermentation pour l'ajout d'ions métalliques dans un milieu à 220 g.L<sup>-1</sup> de sucre. Les résultats sont exprimés par comparaison avec le témoin réalisé en même temps que cette série.**

	Fe	FeMg	FeMgCuMn
Concentration cellulaire finale (levures.mL <sup>-1</sup> )	-0,5.10 <sup>8</sup>	+0,1.10 <sup>8</sup>	-0,5.10 <sup>8</sup>
Viabilité en fin de fermentation (%)	-14	+3	+7
TAV (% v/v)	-0,3	-0,2	-0,4
Rendement (g <sub>éthanol</sub> .g <sub>sucré</sub> <sup>-1</sup> )	-0,013	-0,004	-0,008
Sucré consommé (g.L <sup>-1</sup> )	+1	-1	-3

Les pulses réalisés ayant montré des résultats positifs quant à l'ajout de fer et de magnésium, les résultats illustrés ici semblent incohérents. Cela pourrait s'expliquer par :

- Des milieux ne contenant pas assez de sucre (épuisement des 220 g.L<sup>-1</sup>), une fermentation plus longue aurait peut être permis de mettre en évidence l'effet d'un de ces ions.
- Une contamination du milieu de fermentation continue lors des pulses par une levure sauvage ayant des besoins, supérieurs en fer et en magnésium, à la souche C10 utilisée.
- Une possible complexation Fe avec les phosphates.

Afin de vérifier l'hypothèse de la contamination, des milieux YEPD chloramphénicolés (antibiotique bactérien à spectre large) ont étéensemencés avec le SBP comme inoculum. Aucun développement microbien n'a été observé, il est donc très peu probable qu'il y ait eu contamination par des levures sauvages lors de la réalisation des pulses. L'hypothèse de la complexation du fer et des phosphates est en batch est expliquée par la formation probable de vivianite. La seule hypothèse restante a donc été que les milieux ne contenaient pas assez de sucres.

Afin de mettre facilement en évidence l'effet d'un paramètre sur la fermentation et de répondre à la première hypothèse, il a été décidé de réaliser toutes les fermentations suivantes dans des milieux contenant les mêmes concentrations en azote et en phosphore mais avec des concentrations de sucre de 300 g<sub>sucré équivalent saccharose</sub>.L<sup>-1</sup>. Ce milieu, nommé « S », a été utilisé pour toutes les séries d'expériences suivantes concernant le screening, comme standard pour comparer les résultats

obtenus lors de la modification d'un paramètre. Ce milieu à haute densité a été utilisé afin de permettre l'obtention de conditions stressantes pour les levures, conditions pour lesquelles les modifications des conditions de culture ou du milieu devraient avoir un effet plus net sur la production d'éthanol.

### III.2.3.2.b. En milieu à 300 g.L<sup>-1</sup> de sucre

L'étude sur les ions métalliques a donc été refaite dans ce milieu à haute densité. Pour ces fermentations seules trois différents ajouts ont été testés et comparés au milieu S sans ajout d'ion métallique :

- Le magnésium à 120 ppm noté milieu Mg
- Le fer à 600 ppm noté milieu Fe
- Un mélange de magnésium et de fer à respectivement 120 et 600 ppm

Le tableau 26 présente les résultats obtenus en milieu à 300 g.L<sup>-1</sup> de sucre par comparaison au milieu de référence sans ajout (milieu S). Le fer, qu'il soit en présence ou non de magnésium a perturbé la fermentation en diminuant TAV final. Le magnésium, lorsqu'il a été ajouté seul au milieu a permis une légère amélioration de la fermentation, mais lorsqu'il a été ajouté en même temps que le fer, il a augmenté l'effet inhibiteur du fer.

Ces résultats confirme l'hypothèse selon laquelle le fer se complexe aux phosphates en batch pour former de la vivianite et rend donc indisponible à la fois le fer et le phosphore. Ce problème n'a pas été observé en continu en raison d'une concentration en phosphore plus faible à l'état stationnaire. En conséquence, le magnésium est le seul ion métallique qui a été retenu comme complément pour l'amélioration des milieux de fermentation à base de SBP.

**Tableau 26: Résultats obtenus en fin de fermentation pour l'ajout d'ions métalliques dans un milieu à 300 g.L<sup>-1</sup> de sucre. Les résultats sont exprimés par comparaison avec le témoin réalisé en même temps que cette série.**

	Fe	Mg	FeMg
Concentration cellulaire finale (levures.mL <sup>-1</sup> )	- 0,3.10 <sup>8</sup>	+ 1,1.10 <sup>8</sup>	+ 0,1.10 <sup>8</sup>
Viabilité en fin de fermentation (%)	+7	+5	-2
TAV (% v/v)	-0,9	+0,3	-1,8
Rendement (g <sub>éthanol</sub> .g <sub>sucré</sub> <sup>-1</sup> )	-0,013	+0,037	+0,014
Sucré consommé (g.L-1)	-26	-15	-42

### III.2.4. Tests sur l'inoculum

Une étude a été réalisée sur différentes souches levuriennes commercialisées pour la fermentation alcoolique en milieu betteravier.

#### III.2.4.1. Etude de différentes souches de *Saccharomyces cerevisiae*

La souche C10 a été utilisée depuis le début des travaux de thèse, cependant celle-ci n'est pas la seule souche utilisée pour la production d'éthanol au niveau industriel. De plus, comme le montre la bibliographie (partie I.3.3.5. L'inoculum) la souche a un effet important sur la fermentation. Il a donc été décidé de réaliser un test comparatif entre différentes souches. Pour ce faire le milieu à 300 g.L<sup>-1</sup> nommé milieu S (Standard), décrit précédemment, a étéensemencé avec différentes levures au même taux d'inoculation de 5x10<sup>7</sup> levures.mL<sup>-1</sup> et incubé à 33 °C.

Les souches testées étaient, la souche Angel yeast qui est une souche OGM chinoise capable de résister à 18% d'éthanol (données producteur), la souche Ethanol Red qui a été sélectionnée pour produire de l'éthanol à partir de céréales, la souche Hirondelle Bleue qui est une levure boulangère

utilisée pour la production d'éthanol dans plusieurs ateliers de production et la souche X pour laquelle un accord de confidentialité a été effectué.

**Tableau 27 : Résultats obtenus pour les différentes souches utilisées pour inoculer le milieu S pour la concentration cellulaire, la viabilité, la concentration en éthanol, le rendement et la concentration en sucre consommé en fin de fermentation. Les résultats sont exprimés par comparaison avec le milieu S inoculé avec la souche C10 utilisée comme référence.**

	X	Angel Yeast	Ethanol Red	Hirondelle bleue
Concentration cellulaire finale ( $10^8$ levures.L <sup>-1</sup> )	+0,1	-0,9	+0,2	+0,2
Viabilité (%)	+14	-1	+10	0
TAV (%)	-0,8	-6,5	-3,2	-0,3
Rendement ( $g_{\text{éthanol}} \cdot g_{\text{sucre}}^{-1}$ )	-0,031	-0,067	-0,042	-0,008
Sucre consommé ( $g_{\text{sucre}} \cdot L^{-1}$ )	+4	-87	-35	0

Le tableau 27 montre que dans des conditions de fermentation à haute densité, la souche C10 est la plus performante pour la production d'éthanol, aussi bien pour le critère TAV que pour le rendement. Ce tableau montre aussi que la souche hirondelle bleu, qui est une levure de boulanger, possède des performances fermentaires très proches de la souche C10 dans les conditions appliquées.

La souche Ethanol Red, bien qu'ayant les mêmes performances fermentaires en usine sur moût à environ 200 g.L<sup>-1</sup> (source : ateliers de production), elle ne s'accommode pas à un milieu à haute densité. La souche X, quant à elle, donne des résultats inférieurs à l'hirondelle bleue. Enfin, la souche Angel Yeast sensée (données producteur) résister à des concentrations élevées en éthanol (<18%) se développe très mal dans le milieu.

Dans les conditions appliquées, les performances fermentaires des souches sont donc dans l'ordre :

C10 > Hirondelle bleue > X > Ethanol Red > Angel Yeast

La souche C10 a donc été conservée pour la suite des fermentations. Cependant, ces résultats sont à relativiser par le fait que les concentrations en azote ajouté et en phosphore ajouté ont été optimisées uniquement pour la souche C10.

### III.2.4.2. Etude sur la quantité d'inoculum

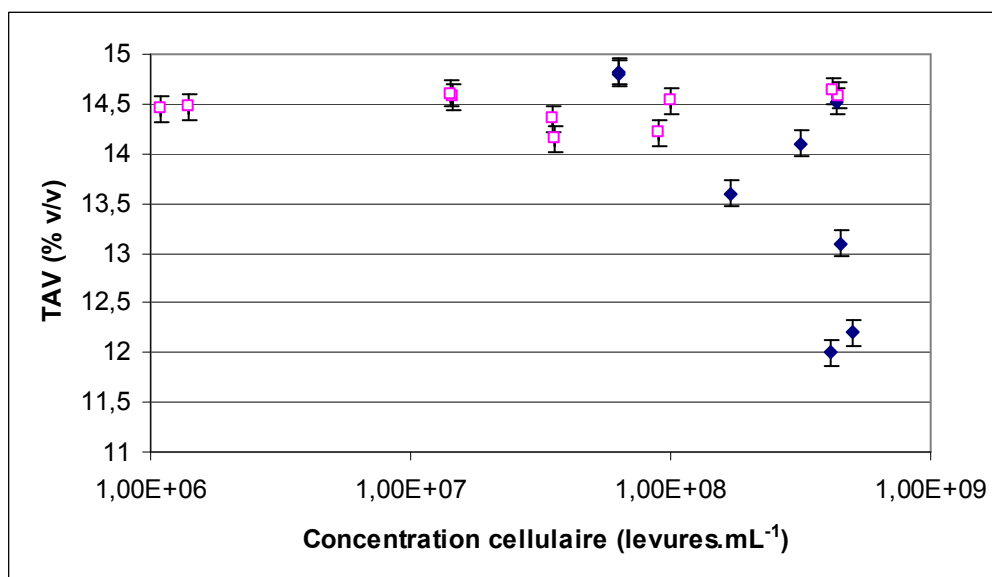
Comme nous l'avons vu partie I.3.3.5., la quantité initiale de levure est un facteur important pour la qualité de la fermentation. Il a été décidé de réaliser une expérience ayant pour but de mettre en évidence l'impact de la concentration cellulaire à l'inoculation sur les performances fermentaires. Toutes ces expériences ont eu lieu dans le milieu S avec pour inoculum la même préculture de la souche C10. La gamme de concentrations testée était comprise entre  $5 \times 10^8$  et  $1 \times 10^6$  levures.mL<sup>-1</sup>.

**Tableau 28: Résultats obtenus pour les différentes concentrations cellulaires utilisées pour inoculer le milieu S pour les concentrations cellulaires en début et en fin de fermentation, la viabilité, la concentration en éthanol, le rendement et la concentration en sucre consommé en fin de fermentation.**

Concentration cellulaire initiale ( $10^7$ levures.mL <sup>-1</sup> )	44,0	42,2	10,0	9,0	3,6	3,5	1,5	1,4	0,1	0,1
Concentration cellulaire finale ( $10^8$ levures.mL <sup>-1</sup> )	4,5	4,1	2,3	2,0	2,3	2,3	2,2	2,1	2,1	2,2
Viabilité (%)	5	4	4	5	4	4	4	8	4	4
TAV (%)	14,6	14,6	14,5	14,2	14,2	14,4	14,6	14,6	14,5	14,4
Rendement ( $\text{g}_{\text{éthanol}} \cdot \text{g}_{\text{sucre}}^{-1}$ )	0,423	0,424	0,440	0,434	0,426	0,434	0,444	0,440	0,439	0,438
Sucre consommé ( $\text{g}_{\text{sucre}} \cdot \text{L}^{-1}$ )	272	272	261	258	262	261	259	262	260	260

Comme le montre le tableau 28, la concentration cellulaire à l'inoculation n'a que peu d'impact sur les performances fermentaires en dehors de la durée totale de la fermentation.

Les résultats de cette série sont représentés sur les graphiques 41 à 43 sous le nom Test X0. Ces graphiques représentent aussi les résultats obtenus pour les différents milieux S inoculés avec la souche C10 présentés dans ce rapport de thèse et utilisés comme références au cours de chaque série d'expériences. Ces milieux S sont représentés par la série portant le nom Milieux S.



**Figure 41: Evolution du TAV final en fonction de la concentration cellulaire à l'inoculation. Les (◆) représentent les Milieux S et les (□) représentent la série Test X0.**

Comme le montre la figure 41, la reproductibilité au sein d'une même série est bonne. Cependant cette figure montre aussi que la variabilité entre plusieurs séries est élevée. Il est donc essentiel de mesurer l'impact des différents paramètres testés par rapport à un milieu de référence réalisé dans chaque série, comme le milieu S, et il est donc clairement impossible de faire des comparaisons inter-séries.

La variabilité existant entre plusieurs séries pourrait s'expliquer par l'utilisation de différentes précultures pour inoculer les milieux ainsi que par une hétérogénéité du SBP dans les bidons de stockage.

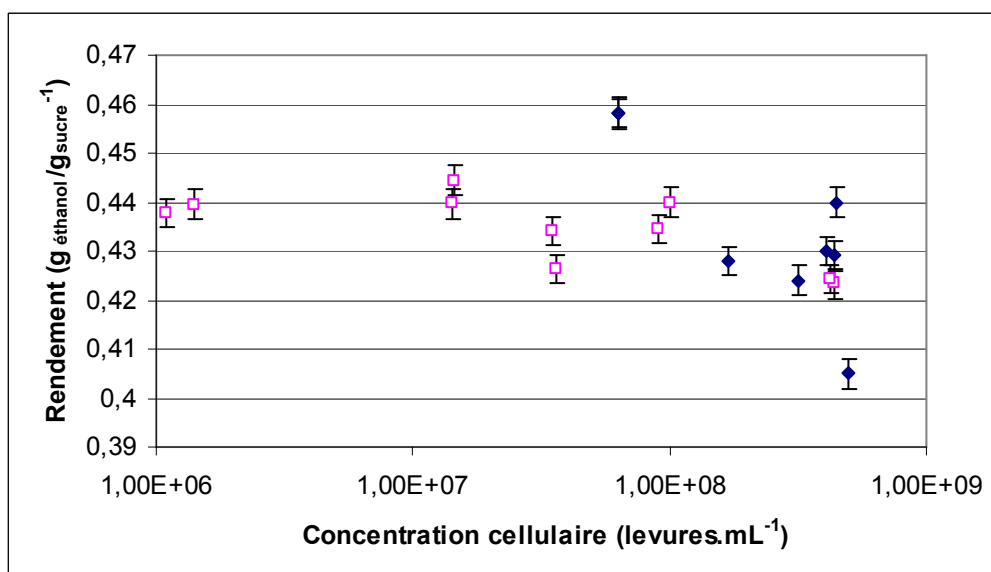


Figure 42: Evolution du rendement en fonction de la concentration cellulaire à l'inoculation. Les (◆) représentent les Milieux S et les (◻) représentent la série Test X0.

La figure 42 montre que l'augmentation de la concentration cellulaire à l'inoculation diminue le rendement de conversion du sucre en éthanol sur l'ensemble de la fermentation, ceci pouvant être expliqué par une augmentation des besoins de maintenance cellulaire. D'après cette figure, il ne faut pas dépasser  $10^8$  levures.mL<sup>-1</sup> et la concentration levurienne optimale semblerait être d'environ  $10^7$  levures.mL<sup>-1</sup>.

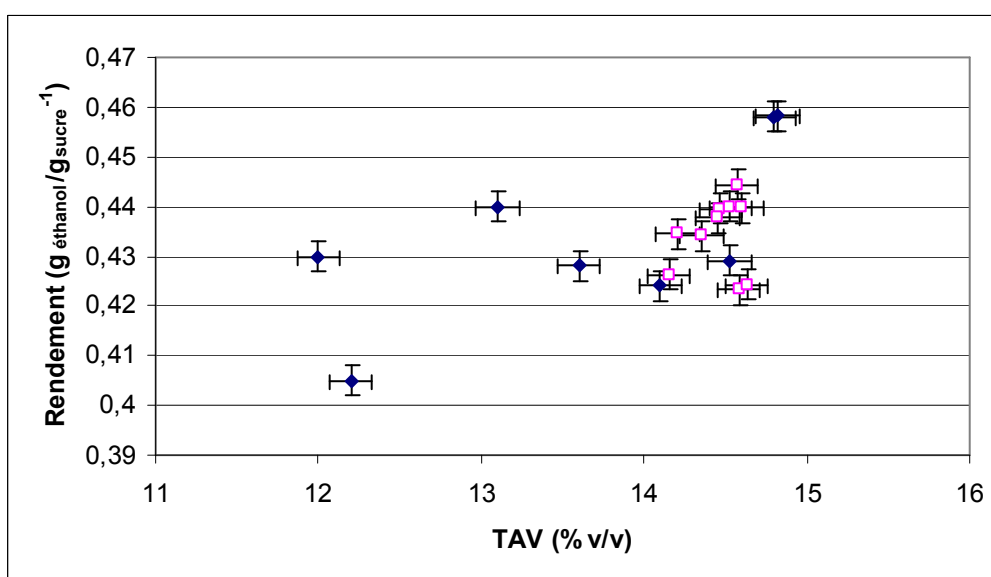


Figure 43: Evolution du rendement de conversion du sucre en éthanol en fonction du TAV final. Les (◆) représentent les Milieux S et les (◻) représentent la série Test X0.

Comme le montre la figure 43, l'augmentation du rendement semble corrélée à celle du TAV surtout au delà de 14 % d'éthanol et ce, même s'il y a encore du sucre résiduel en fin de fermentation comme cela a été le cas pour toutes les fermentations réalisées à partir du milieu S. Il est donc indispensable, pour obtenir des concentrations élevées en éthanol, d'atteindre des rendements de conversion sucre éthanol les plus élevés possible.

Ces résultats montrent que le taux d'inoculation optimum dans les conditions appliquées est d'environ  $10^7$  levures.mL<sup>-1</sup>. Ce taux a été utilisé pour les tests suivants. Les résultats exposés ici prouvent aussi qu'il est impossible de faire des comparaisons inter-séries et donc que les résultats doivent être uniquement exprimés par rapport à une référence interne à la série d'expérience et que seuls les résultats relatifs au témoin sont significatifs. Ces irrégularités sont aussi observées en industrie sur moût léger (~180 g<sub>équivalent saccharose</sub>.L<sup>-1</sup>) mais avec une moindre amplitude. La variabilité observée dans le cas présent est certainement accentuée par l'utilisation d'un milieu très stressant pour la levure.

### III.2.5. Screening sur les compléments

La bibliographie a montré que de nombreux composés peuvent être ajoutés au milieu de culture afin d'augmenter la concentration finale en éthanol. Différents composés ont été testés sur le principe appliqué en erlenmeyer pour tester les ions métalliques.

Les milieux pour effectuer ces tests ont été réalisés par ajout d'un complément à un milieu contenant 300 g.L<sup>-1</sup> de sucre équivalent saccharose, 151 ppm de phosphore et 31 ppm d'azote. Tous les milieux ont été réalisés en double. Pour chacune de ces séries d'expériences un témoin, noté S, composé du milieu sans ajout de complément a été réalisé afin de comparer, par rapport à celui-ci les résultats obtenus lors de l'ajout d'un complément.

Les différents compléments testés ont été choisis en fonction de la bibliographie réalisée, des produits commerciaux ou mis au point pour l'amélioration de milieu de fermentation à partir de substrat betteravier (compléments A, B et C) et d'un milieu riche existant en œnologie pour la culture de *Saccharomyces cerevisiae* (milieu MS300). Le milieu MS300 est composé de différents compléments (annexe 2) mis au point par l'INRA de Montpellier afin de prévenir toutes carences de *Saccharomyces cerevisiae* en anaérobiose. Ces compléments consistent en des mélanges de vitamines, de minéraux, de 20 acides aminés de la série L et d'un mélange appelé « facteurs anaérobies » à base d'ergostérol et d'acides gras. Dans ce milieu il n'a pas été ajouté d'azote sous forme d'ammoniaque liquide mais 0,45 g.L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>Cl.

Les différents compléments testés ont été regroupés par type de composé ayant d'après la bibliographie des effets proches sur la fermentation afin de déterminer pour chacun de ces types quel composé est le plus performant.

#### III.2.5.1. Composés complexes

Sous ce nom de composés complexes, il a été regroupé des suppléments de composition exacte inconnue. Au cours de ces séries d'expériences les compléments testés ont été :

- Les compléments industriels destinés à l'amélioration des milieux de fermentation notés A, B et C à des concentrations de 0,15 g.L<sup>-1</sup>. Cette concentration est celle recommandée par le fabricant pour ces produits. Un accord de confidentialité ayant été signé, le nom des composés n'est pas communicable.
- Les mêmes compléments industriels destinés à l'amélioration des milieux de fermentation mais cette fois à dix fois la concentration recommandée, soit 1,5 g.L<sup>-1</sup>. Ces milieux ont été nommés Ax10, Bx10 et Cx10. Cette concentration permet de comparer l'effet de ces compléments par rapport à l'extrait de levure qui a été utilisé à une concentration proche.
- L'extrait de levure (Prolabo) à 1 g.L<sup>-1</sup> noté YE. Cette concentration est usuellement utilisée pour la réalisation de milieu de fermentation en microbiologie.

Le tableau 29 présente les résultats obtenus pour cette série d'expériences.



**Tableau 29: Résultats obtenus pour l'ajout de composés complexes pour les viabilités, les concentrations en levure, en éthanol et en sucre consommé en fin de fermentation. Les résultats sont exprimés par comparaison avec le milieu S utilisé comme référence.**

	A	B	C	Ax10	Bx10	Cx10	YE
Concentration cellulaire en fin de fermentation ( $10^8$ levures.mL <sup>-1</sup> )	-0,3	+0,6	+0,2	-0,7	+0,6	-0,2	-1,2
Viabilité en fin de fermentation (%)	+4	+7	-1	-7	-3	-5	-2
TAV (% v/v)	0,0	+0,1	-0,1	+1,1	-0,8	-1,5	+1,8
Rendement ( $g_{\text{éthanol}} \cdot g_{\text{sucre}}^{-1}$ )	-0,001	0,000	0,000	+0,015	-0,013	-0,025	+0,038
Sucre consommé ( $g_{\text{sucre}} \cdot L^{-1}$ )	+1	+2	-1	+11	-6	-13	+10

Les compléments A, B et C sont d'après ces résultats inefficaces aux concentrations recommandées. Les milieux avec ajout du complément A à 10 fois la concentration recommandée et d'extraits de levure sont les seuls à avoir permis d'obtenir plus d'éthanol que le milieu S, avec respectivement 1,1 et 1,8% (v/v) et de meilleurs rendements, avec des augmentations respectives de, 0,015 et 0,038  $g_{\text{éthanol}} \cdot g_{\text{sucre}}^{-1}$ . Les compléments B et C à 10 fois la concentration recommandée ont nuï à la fermentation. Les extraits de levure sont donc le meilleur complément pour la production d'éthanol dans les conditions appliquées.

Si la composition des compléments A, B et C n'a pas été communiquée, il a été observé au laboratoire que le complément A semble composé en grande partie de levures inactives entières. Celles-ci se lysent très certainement au cours de la fermentation et produiraient donc des extraits de levures, ce qui expliquerait les effets proches de l'extrait de levure et du complément A.

Seuls les extraits de levure ont été retenus comme complément pour l'amélioration des milieux de fermentation à base de SBP. En effet, les extraits de levure ont montré leurs intérêts pour améliorer la production d'éthanol, de plus, il est possible de les produire directement dans les ateliers de productions en lysant une partie des levures en fin de fermentation.

### III.2.5.2. Milieu MS300

Le milieu MS300 est composé de différents compléments, mis au point par l'INRA de Montpellier afin de permettre un développement optimal de *Saccharomyces cerevisiae* en anaérobiose dans les conditions de vinification. L'ensemble des compléments de ce milieu a été testé simultanément, milieu nommé MS300, mais aussi de manière individuelle.

Le milieu AA correspond au milieu avec ajout de la solution d'acides aminés, le milieu FA, de la solution de facteurs anaérobies, le milieu Min, de la solution de minéraux et le milieu Vit de la solution de vitamines. Les concentrations des différents composés dans les milieux de fermentations sont exposées en annexe 1.

Le milieu nommé MS300 n'a pas été supplémenté avec 31 ppm d'azote sous forme d'ammoniaque mais avec 0,45 g.L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>Cl. Tous les autres milieux ont été supplémentés avec 31 ppm d'azote sous forme d'ammoniac.

**Tableau 30: Résultats obtenus pour l'ajout des compléments utilisés pour la réalisation du milieu MS300. La viabilité, la concentration en éthanol, le rendement et la concentration en sucre consommé en fin de fermentation sont exprimés par comparaison avec le milieu S.**

	MS300	AA	FA	Min	Vit
Concentration cellulaire en fin de fermentation (levures.mL <sup>-1</sup> )	-0,9	+0,8	+0,3	0	+0,5
Viabilité (%)	-1	-1	-2	+2	+1
TAV (%)	0	+0,2	+0,6	-0,6	-0,1
Rendement ( $g_{\text{éthanol}} \cdot g_{\text{sucre}}^{-1}$ )	+0,014	+0,009	+0,010	-0,023	-0,001
Sucre consommé ( $g_{\text{sucre}} \cdot L^{-1}$ )	-7	-1	+5	+4	-2

Le tableau 30 montre que, l'utilisation simultanée de l'ensemble des compléments du milieu MS300 n'a aucun effet sur la fermentation. L'apport de minéraux tel qu'il a été réalisé est néfaste pour la production d'éthanol. L'apport de vitamines et d'acides aminés n'ont quant à eux eu aucun effet. Seul l'apport de facteurs anaérobies permet une amélioration nette de la production d'éthanol. Cependant, il est impossible de déterminer s'il s'agit réellement d'un bénéfice causé par les composés de la solution de facteurs anaérobies ou s'il s'agit de leur effet antimousse. En effet, la présence de ces composés dans le milieu de fermentation empêche la formation de mousse or la présence de celle-ci est néfaste pour les cultures en erlenmeyer car elle limite les échanges de gaz entre l'air et le milieu de culture. Cette dernière affirmation est d'ailleurs confirmée par la série suivante sur l'utilisation des lipides insaturés.

### III.2.5.3. Lipides insaturés

Certaines huiles végétales contiennent une forte proportion d'acides gras insaturés. Ces acides gras sont indispensables pour le bon développement de la levure et sont essentiels pour la protection de celles-ci contre les stress causés par des concentrations élevées en éthanol ou en sucre.

Il a donc été décidé de réaliser des tests de fermentation avec des apports en huiles d'arachide (Ara), d'olive (Oli), de tournesol (Tou) et un mélange de quatre huiles (ISIO 4) contenant de l'huile de colza, de tournesol oléagineux, de tournesol et de pépin de raisin. Ces différentes huiles ont été choisies en fonction de leur proportion en acide gras insaturés. Toutes les huiles utilisées étaient de marque Lesieur car il s'agit de la seule marque présente chez tous les distributeurs et disposant dans sa gamme de toutes ces huiles. Afin de mettre en évidence plus facilement les effets de ces huiles, il a été décidé de les tester à des concentrations de  $500 \mu\text{L.L}^{-1}$  même si cette dose est irréaliste en industrie car cette dose représenterait par exemple sur le site N°1 une consommation journalière d'environ  $1 \text{ m}^3$  d'huile.

Deux tests ont servi de témoin, un avec ajout d'antimousse Rhodorsil (Rho), qui est un antimousse siliconé ne pouvant pas être utilisé par la levure, et un avec ajout d'antimousse Ouvrie 922k (Ouv) couramment utilisé en industrie et composé d'huiles végétales (composition exacte non communiquée par le producteur). Ces deux antimousses ont eux été incorporés au milieu à des concentrations de  $500 \mu\text{L.L}^{-1}$ , comme pour les huiles végétales. Ils ont également été testés à une concentration de  $50 \mu\text{L.L}^{-1}$  qui correspond à la concentration utilisée en industrie, respectivement nommés RhodN et OuvN.

**Tableau 31: Résultats obtenus pour l'ajout des huiles. La viabilité, la concentration en éthanol, le rendement et la concentration en sucre consommé en fin de fermentation sont exprimés par comparaison avec le milieu S utilisé comme référence.**

Ajouts	Ouv	Rho	Ara	Oli
Concentration cellulaire en fin de fermentation ( $10^8$ levures.mL <sup>-1</sup> )	-0,1	-0,2	-0,3	-0,2
Viabilité (%)	+0	-1	0	-1
TAV (%)	+0,8	+0,4	+0,7	+0,4
Rendement ( $\text{g}_{\text{éthanol}}.\text{g}_{\text{sucre}}^{-1}$ )	+0,039	+0,014	+0,025	+0,018
Sucre consommé ( $\text{g}_{\text{sucre}}.\text{L}^{-1}$ )	-8	-2	-2	-3
Ajouts	OuvN	RhodN	Tou	Isio 4
Concentration cellulaire en fin de fermentation ( $10^8$ levures.mL <sup>-1</sup> )	+0,5	-0,3	-0,4	-0,5
Viabilité (%)	+7,9	+4,5	-1	-1
TAV (%)	+1,2	+0,6	+0,3	+0,3
Rendement ( $\text{g}_{\text{éthanol}}.\text{g}_{\text{sucre}}^{-1}$ )	+0,031	+0,022	+0,002	+0,008
Sucre consommé ( $\text{g}_{\text{sucre}}.\text{L}^{-1}$ )	+6	-2	+4	+1

Le tableau 31 montre que les deux antimousses testés ont eux un effet bénéfique sur la fermentation quelle que soit la concentration testée. L'antimousse Rhodorsil ne contenant que des huiles de silicone non assimilable par la levure, son effet bénéfique peut s'expliquer par le fait qu'il a prévenu la

formation de mousse au cours de la croissance des levures, représentant habituellement plus de la moitié de l'erenmeyer et ainsi permis la diffusion d'oxygène dans le milieu. La diminution des performances fermentaires entre le test Rho, à  $500 \mu\text{L.L}^{-1}$ , et RhoN, à  $50 \mu\text{L.L}^{-1}$ , peut s'expliquer par un effet inhibiteur de cette antimousse lorsqu'il est présent en forte concentration. L'antimousse Ouvrie, à l'instar de l'antimousse Rhodorsil, pourrait permettre une meilleure diffusion des gaz. De plus, cet antimousse contient des acides gras en partie insaturés (composition non communiquée par le fournisseur), ce qui pourrait expliquer le bénéfice supplémentaire qu'apporte ce produit à la fermentation par rapport à l'antimousse siliconé. La différence entre le milieu avec l'antimousse Rhodorsil et l'antimousse Ouvrie peut donc être imputée à la présence d'acides gras qui seraient bénéfiques pour la production d'éthanol. Comme pour l'antimousse Rhodorsil il y est montré ici un effet inhibiteur de l'antimousse Ouvrie lorsqu'il est présent à forte concentration.

Les tests portant sur l'antimousse Rhodorsil ont présenté des résultats proches de ceux obtenus pour la solution de facteurs anaérobies précédemment testée. Les facteurs anaérobies n'ont donc eu qu'un effet antimousse et non pas de complément.

Les quatre huiles alimentaires testées montrent une amélioration des performances fermentaires. Ces expériences confirment que la présence d'antimousses, qu'ils soient composés d'huiles de silicone ou végétales permet une amélioration de la production d'éthanol. Néanmoins, les meilleurs résultats sont obtenus avec ajout d'antimousse Ouvrie 922k. La composition exacte de cet antimousse étant inaccessible, il est impossible de conclure sur l'intérêt d'un ou plusieurs acides gras en particulier qui permettraient l'amélioration des performances fermentaires.

Le problème de diffusion des gaz engendré par la présence de mousse durant la croissance des levures est spécifique aux cultures en erlenmeyer car en réacteur, l'antimousse est forcément ajouté au réacteur pour prévenir les risques de débordement du à la formation de mousse. De plus, en réacteur l'oxygène diffuse essentiellement par le bas du réacteur au niveau du système d'aération. L'antimousse Ouvrie 922k, à des concentrations de  $50 \mu\text{L.L}^{-1}$ , est donc le seul composé retenu de ceux testés ici.

#### III.2.5.4. Le chitosan

Deux tests de fermentation ont été effectués avec apport de chitosan (14,3% de désacétylation). D'après la bibliographie (Patil et Patil, 1989), l'apport de chitosan au milieu de fermentation à une concentration de 0,2% permet de diviser par deux le temps de fermentation en milieu canne à sucre. Il a donc été décidé de réaliser un test de fermentation avec ajout de  $2 \text{ g.L}^{-1}$  de chitosan (Chit0,2) et de  $5 \text{ g.L}^{-1}$  (Chit0,5).

**Tableau 32 : Résultats obtenus pour l'ajout de chitosan. La viabilité, la concentration en éthanol, le rendement et la concentration en sucre consommé en fin de fermentation sont exprimés par comparaison avec le milieu S utilisé comme référence.**

	Chit0,2	Chit0,5
Concentration cellulaire en fin de fermentation ( $10^8 \text{ levures.mL}^{-1}$ )	-0,4	-0,3
Viabilité (%)	+13	+22
TAV (%)	-0,6	-1
Rendement ( $\text{g}_{\text{éthanol}}.\text{g}_{\text{sucre}}^{-1}$ )	+0,015	-0,005
Sucre consommé ( $\text{g}_{\text{sucre}}.\text{L}^{-1}$ )	-19	-14

Le chitosan semble permettre le maintien d'une viabilité plus élevée en fin de fermentation. Cependant, le tableau 32 montre que la présence de chitosan dans le milieu aux concentrations de 0,2 ou 0,5% est néfaste pour la production d'éthanol. L'amélioration de la viabilité en fin de fermentation peut donc s'expliquer par une plus faible concentration en éthanol dans les milieux avec chitosan. Le chitosan n'a donc pas été retenu pour l'amélioration des milieux de fermentation.

### III.2.5.5. Les vinasses

Il a été décidé de réaliser une étude sur l'impact de l'ajout de vinasses sur la fermentation et ainsi de déterminer la quantité maximale de vinasses incorporable au milieu de culture sans perturber la production d'éthanol. Ces vinasses sont couramment utilisées pour diluer de SBP pour la réalisation des milieux de fermentation pour limiter la consommation d'eau sur les sites de production, mais aussi pour diminuer le volume de vinasses à traiter. Les vinasses utilisées pour l'ensemble des expériences ont été transportées congelées à partir d'un atelier de production et ont été conservées à -20 °C jusqu'à utilisation.

Afin de déterminer cette quantité, différentes proportions de vinasses ont été ajoutées dans les milieux. Les pourcentages indiqués tableau 33 correspondent, aux pourcentages volumiques de vinasses utilisés pour réaliser la dilution du SBP. Par exemple pour 1 L de milieu 30%, l'eau représentait 439,6 mL et la vinasse 188,4 mL.

**Tableau 33: Résultats obtenus pour des fermentations réalisées avec différents pourcentages de vinasses pour les viabilités, les concentrations en levure, en éthanol et en sucre consommé en fin de fermentation. Les résultats sont exprimés par comparaison avec le milieu S, réalisé sans vinasses, utilisé comme référence.**

	10%	30%	50%
Concentration cellulaire en fin de fermentation ( $10^8$ levures.mL <sup>-1</sup> )	0	-0,1	-0,2
Viabilité (%)	-1	-4	-4
TAV (%)	-0,2	-0,1	-0,8
Rendement (g <sub>éthanol</sub> .g <sub>sucré</sub> <sup>-1</sup> )	0,032	-0,001	-0,002
Sucre consommé (g <sub>sucré</sub> .L <sup>-1</sup> )	-17	-2	-12

D'après les résultats présentés ci-dessus, l'utilisation de vinasses pour réaliser la dilution du SBP ne perturbe pas la fermentation, à condition que le volume ne représente pas plus de 30% du volume utilisé pour la dilution du SBP et pour un milieu à 300 g<sub>sucré</sub>.L<sup>-1</sup> de milieu. Ce qui représente environ 20% du volume total du réacteur. Ceci est en accord avec les informations recueillies auprès des producteurs d'éthanol.

### III.2.6. Conclusion intermédiaire sur l'amélioration de la composition du milieu

Cette première partie d'étude a montré que de nombreux composés peuvent avoir un effet positif sur les performances fermentaires et peuvent ainsi permettre de répondre à la demande fixée d'augmenter la concentration en éthanol des vins en fin de fermentation. Cependant dans les conditions appliquées ici les composés retenus pour la supplémentation des milieux sont :

- L'azote à 31 ppm
- Le phosphore à 151 ppm
- Le magnésium à 120 ppm
- L'extrait de levure à 1 g.L<sup>-1</sup>
- L'antimousse Ouvrie 922k à 50 µL.L<sup>-1</sup>
- Les vinasses utilisées à 30% (v/v) pour diluer le SBP

Enfin, la souche C10 inoculée à 10<sup>7</sup> levures.mL<sup>-1</sup> s'est révélée être la plus performante.

Ces résultats présentent de grandes différences par rapport à ce qui se fait actuellement en industrie (cf partie III.1.5. Tableau comparatif des sites). En effet, par rapport aux besoins des levures dans le milieu à haute densité, il est possible de constater que :

- Pour l'azote, les concentrations utilisées sont supérieures pour les sites 1 et 4 à celles prescrites ici. Cependant, les moûts étant plus légers, l'apport d'azote par le substrat est inférieur, d'où l'augmentation du besoin de supplémentaire. Pour les autres sites l'apport est insuffisant.
- Pour le phosphore, les apports sont systématiquement inférieurs aux besoins
- Pour le magnésium, seul le site 1 fait un apport de magnésium mais à une concentration 36 fois inférieure aux besoins
- Pour l'extrait de levure, aucun site n'en utilise
- Pour l'antimousse Ouvrie 922k les concentrations utilisées sont proches des besoins
- Pour les vinasses, elles sont parfois utilisées en excès

### III.2.7. Etude sur le moment de l'apport des nutriments

Cette partie, réalisée en parallèle du screening, concerne la détermination des besoins de la levure en oxygène, azote et phosphore non pas en terme de concentration, comme précédemment mais en terme de moment. En effet, la conduite d'une fermentation ne se limite pas au simple mélange de composés en début de fermentation mais en une régulation de l'ensemble du procédé en stabilisant une température, une acidité ou encore en apportant des nutriments en cours de fermentation.

La maîtrise de l'aération des milieux de culture en erlenmeyer étant difficile à mettre en œuvre, il a été décidé de réaliser les expériences pour cette partie en réacteur Sétic set 1. Ces fermentations ont été divisées en deux phases, une de 12 h servant à la propagation en moût léger et l'autre jusqu'à la fin de la fermentation et servant uniquement à la production d'éthanol en moût lourd.

#### III.2.7.1. L'oxygène tout au long de la fermentation

Les tests sur l'apport d'oxygène ont été menés à deux taux d'aération différents. Dans un premier temps à hauteur de 1 vvh qui est proche de ce qui se fait en industrie (cf partie III.1. Visites réalisées en distillerie), puis à un taux de 10 vvh tout en sachant que ce niveau d'aération est difficilement applicable en industrie de par les coûts du matériel nécessaire, les coûts d'entretien, les besoins supérieurs en antimousse ainsi que les coûts énergétiques pour le fonctionnement des pompes. Ce dernier taux d'aération a donc été utilisé plus à titre exploratoire que dans un but d'application réelle. Les vitesses de transfert d'oxygène indiquées sur les figures ci-après sont données à titre indicatif car les mesures ont été réalisées en milieu abiotique sur les milieux avant inoculation.

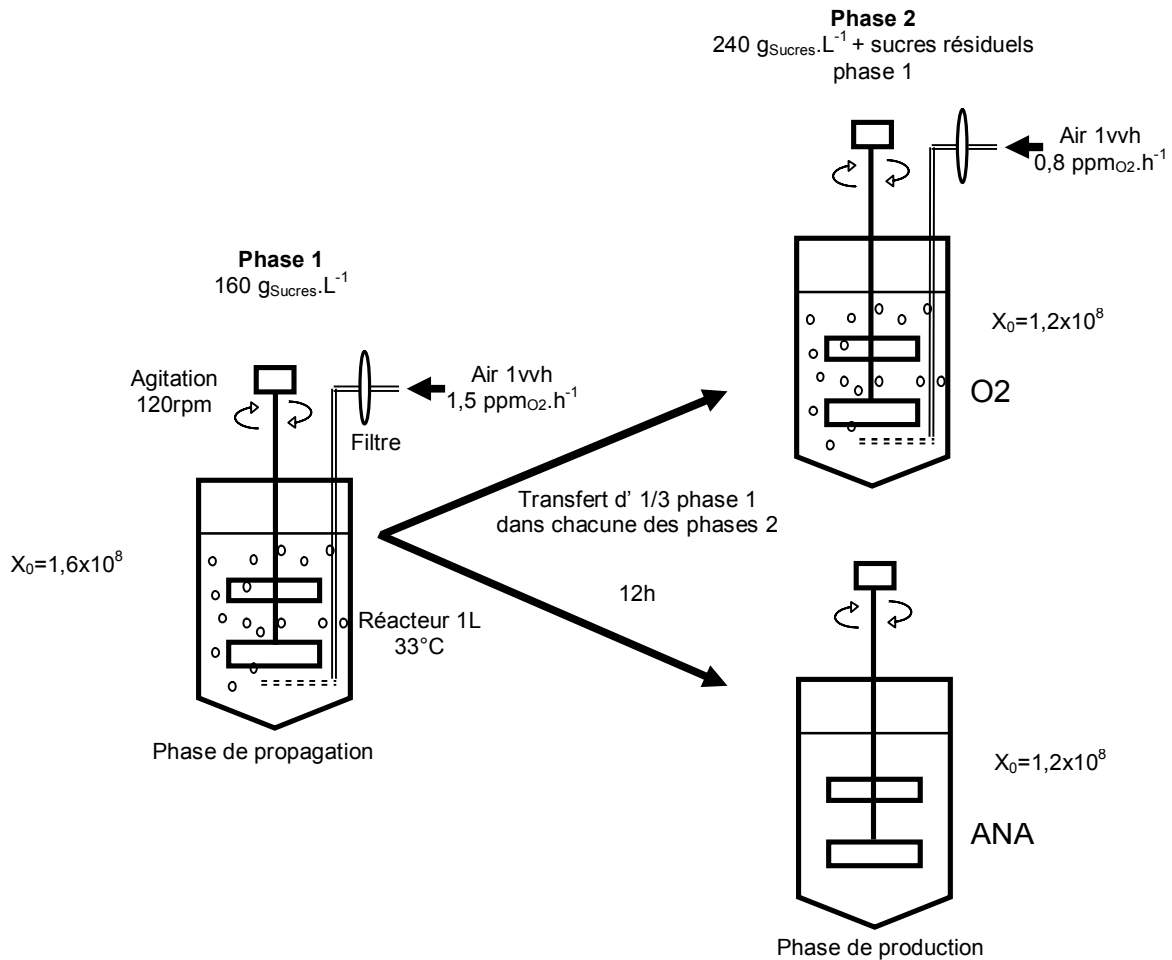
Dans tous les cas une aération a été réalisée en phase de propagation car, comme cité dans la bibliographie partie I.3.3.2., l'oxygène est indispensable pour la bonne croissance des levures. Cependant, ces tests ont été effectués afin de déterminer si les besoins de la levure en oxygène, dans ce milieu de fermentation, se limitaient à la phase de croissance ou s'étendaient à l'ensemble de la fermentation.

##### III.2.7.1.a. Test d'aération à 1 vvh en phase de production

La première étape de ces fermentations a consisté en une phase de propagation dans un milieu contenant  $160 \text{ g}_{\text{sucré}} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $151 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de phosphore,  $31 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  d'azote et  $50 \mu\text{L}$  d'antimousse Ouvrie 922k. L'antimousse a été utilisé car il est indispensable de limiter la formation de mousse en cas d'aération pour éviter le débordement des réacteurs. Ce milieu a été aéré à hauteur de 1 vvh pendant 12 h en réacteur Sétic sous 120 rpm d'agitation à  $33^\circ\text{C}$ .

Au bout de 12h, comme illustré figure 44, 333 mL de ce milieu ont été transférés dans un autre réacteur Sétic aéré à hauteur de 1 vvh contenant 667 mL d'un milieu à  $370 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de sucre équivalent saccharose,  $151 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de phosphore,  $31 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  d'azote et  $50 \mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$  d'antimousse Ouvrie 922k (O2) et un autre tiers dans un troisième réacteur contenant le même milieu mais sans aération (ANA). Les milieux, après homogénéisation, contenaient donc environ  $240 \text{ g}_{\text{sucré}} \cdot \text{L}^{-1}$  plus les sucres résiduels restant après la phase de propagation. Ceci a permis d'obtenir sur l'ensemble de la fermentation  $300 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de sucre équivalent saccharose.

Pour cette expérience, la même phase de propagation a donc été employée pour inoculer les deux milieux de production, ceci afin de s'affranchir des éventuels biais apportés par différentes propagations.



**Figure 44 : Schéma de la fermentation batch bi-étagée réalisée pour le test sur l'apport d'oxygène**

Les figures 45 et 46 montrent que la consommation de sucre et la production d'éthanol ont été supérieures lorsque l'oxygène a été apporté de façon continue. Les résultats obtenus en fin de fermentation sont présentés tableau 34.

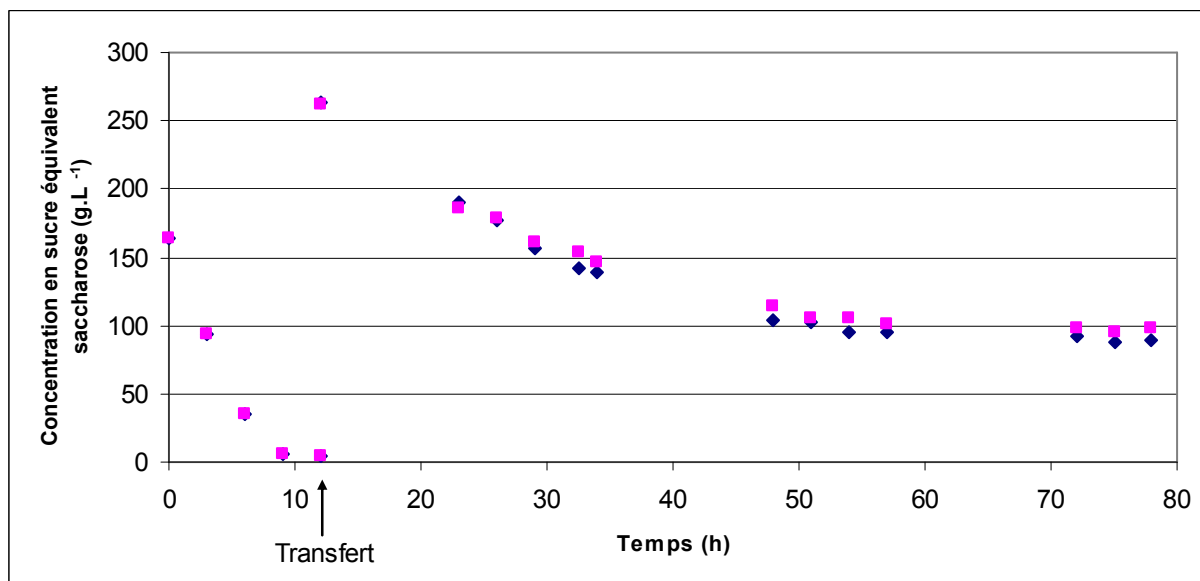


Figure 45: Suivi des concentrations en sucre équivalent saccharose au cours du temps. Les (◆) représentent les concentrations en sucre équivalent saccharose pour le milieu avec apport d'oxygène tout au long de la fermentation (O<sub>2</sub>) et les (■) représentent celles du milieu sans apport d'oxygène en phase de production (ANA).

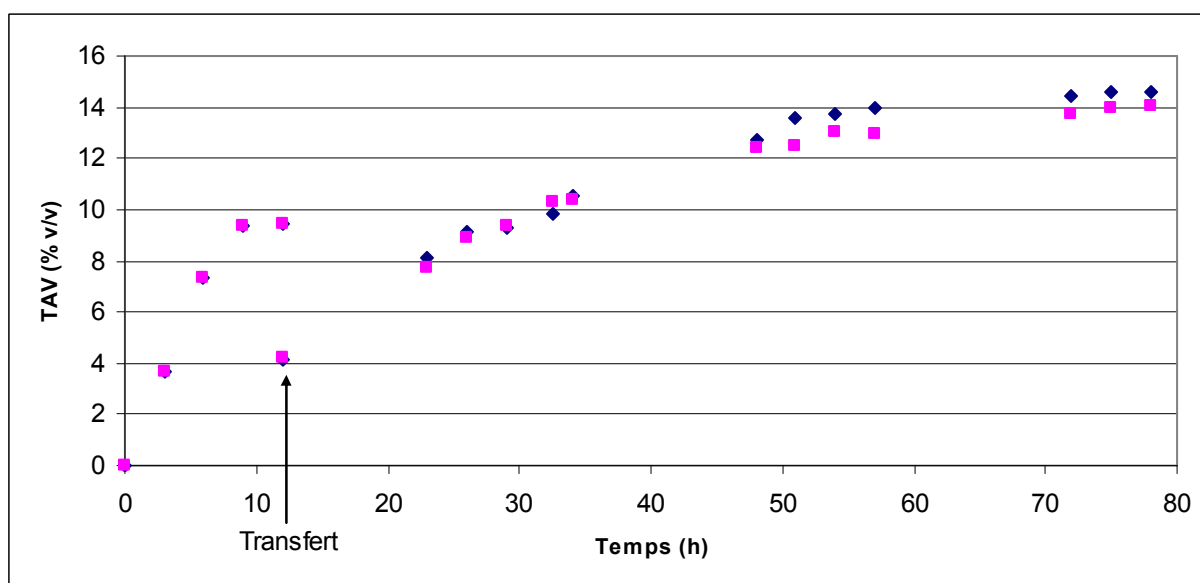


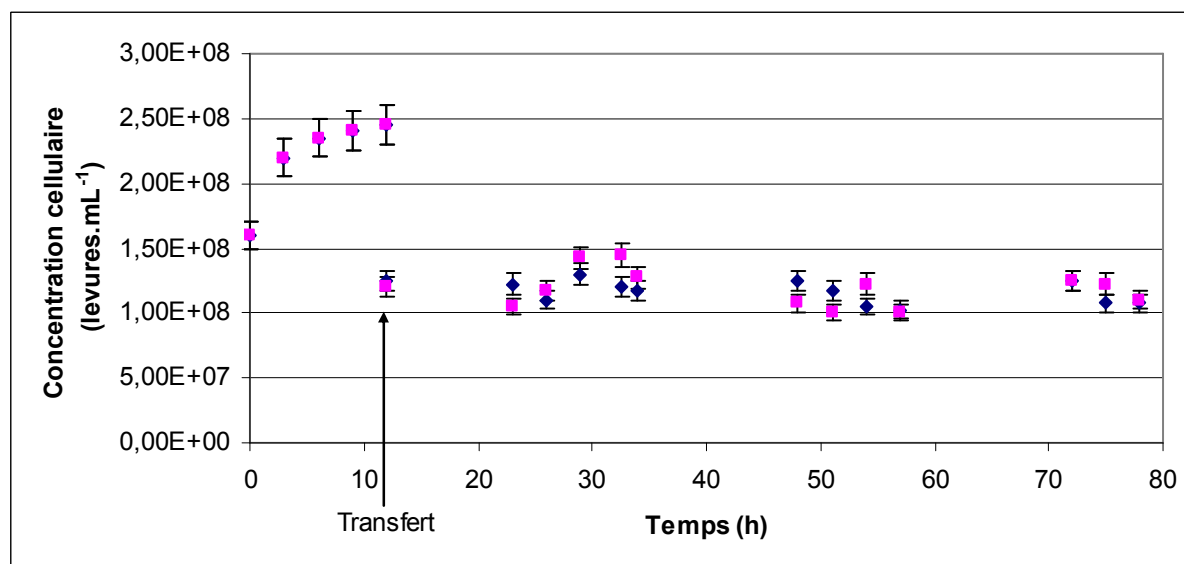
Figure 46: Suivi des TAV au cours du temps. Les (◆) représentent les TAV pour le milieu avec apport d'oxygène tout au long de la fermentation (O<sub>2</sub>) et les (■) représentent les TAV du milieu sans apport d'oxygène en phase de production (ANA).

Le tableau 34 montre que les seules différences notables entre les deux milieux concernent le TAV final et la concentration en sucre consommé. En effet, l'apport d'oxygène a entraîné une augmentation de la concentration finale en éthanol et de la concentration en sucre consommé. Ce tableau montre aussi que le procédé mis en œuvre ici permet d'obtenir des rendements supérieurs à ceux observés lors des fermentations en erlenmeyer ( $\sim 0,44 \text{ g}_{\text{éthanol}} \cdot \text{g}_{\text{de sucre}}^{-1}$ ).

**Tableau 34: Résultats obtenus pour les différentes phases de fermentation réalisées. O2 et ANA correspondent respectivement au milieu avec et sans aération lors de la phase de production.**

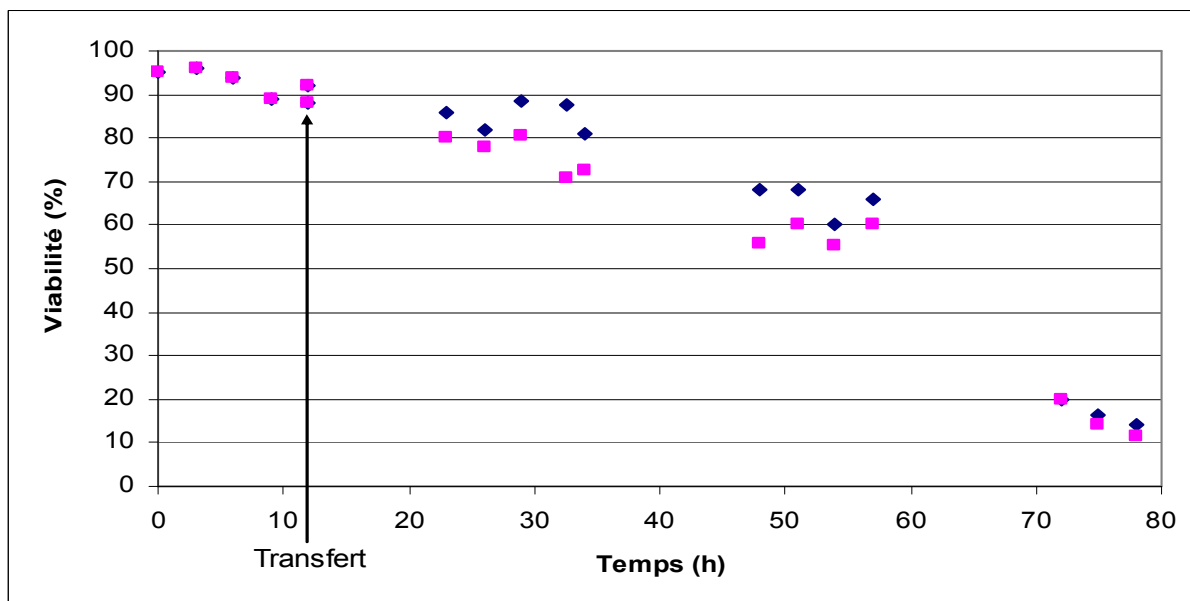
	O2	ANA
TAV en fin de phase de propagation (% v/v)	9,5	9,5
TAV en fin de phase de production (% v/v)	14,6	14,0
Rendement sur l'ensemble de la fermentation ( $\text{g}_{\text{éthanol}} \cdot \text{g}_{\text{sucré}}^{-1}$ )	0,503	0,507
Rendement sur la phase de propagation ( $\text{g}_{\text{éthanol}} \cdot \text{g}_{\text{sucré}}^{-1}$ )	0,469	0,469
Rendement en phase de production ( $\text{g}_{\text{éthanol}} \cdot \text{g}_{\text{sucré}}^{-1}$ )	0,518	0,523
Concentration en sucre consommé en phase de propagation ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	159	159
Concentration en sucre consommé en phase de production ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	175	164
Concentration en sucre consommé sur la fermentation ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	228	217

Les figures 47 et 48 présentent les résultats obtenus pour le suivi des concentrations en levure et des viabilités. Si aucune différence significative n'est visible sur les concentrations cellulaires, la viabilité est légèrement supérieure lorsqu'il y a apport d'oxygène au milieu. Le rendement en phase de production est légèrement meilleur quand cette phase n'est pas aérée (ANA) mais la consommation des sucres est un peu plus faible. L'oxygène semble donc stimuler le métabolisme de la levure malgré une légère perte d'efficacité lors de la conversion sucre éthanol.



**Figure 47: Suivi des concentrations cellulaires au cours du temps. Les (◆) représentent les concentrations cellulaires pour le milieu avec apport d'oxygène tout au long de la fermentation et les (■) représentent celles du milieu sans apport d'oxygène en phase de production.**





**Figure 48: Suivi des viabilités au cours du temps. Les (◆) représentent les viabilités pour le milieu avec apport d'oxygène tout au long de la fermentation et les (■) représentent celles du milieu sans apport d'oxygène en phase de production.**

D'après les résultats présentés ci-dessus, l'apport d'oxygène au milieu tout au long de la fermentation est bénéfique pour la production d'éthanol. Si l'oxygène ne permet pas d'augmenter la concentration cellulaire, il permet néanmoins de maintenir une viabilité plus élevée plus longtemps, ce qui pourrait expliquer de meilleures performances fermentaires pour le milieu avec apport d'oxygène tout au long de la fermentation. Ce dernier point est en total accord avec la bibliographie réalisée sur l'oxygène et son intérêt pour la réoxydation des coenzymes, pour la synthèse de composés cellulaires et les réactions faites par les oxydases (cf I.3.3.2.).

### III.2.7.1.b. Test d'aération à 10 vvh tout au long de la fermentation

Les travaux précédents ayant montré que l'apport d'oxygène était bénéfique pour la production d'éthanol et devait être réalisé à chaque phase de la fermentation, il a été décidé de réaliser un test afin de mesurer l'impact d'une forte aération sur la production d'éthanol.

La première étape a consisté en une phase de propagation dans un milieu contenant  $160 \text{ g}_{\text{sucre}} \cdot \text{L}^{-1}$ , comme précédemment. Ce milieu a été aéré à hauteur de 10 vvh pendant 12 h. Par la suite, un tiers de ce milieu a été transféré dans un autre réacteur Setric aéré à hauteur de 10 vvh et un autre tiers dans un troisième réacteur avec une aération de seulement 1 vvh. Les vitesses de transfert d'oxygène estimées étaient :

- Dans le milieu de propagation de  $6,9 \text{ ppm}_{\text{O}_2} \cdot \text{h}^{-1}$ , pour 10 vvh
- Dans le milieu de production de  $5,6 \text{ ppm}_{\text{O}_2} \cdot \text{h}^{-1}$ , pour 10 vvh
- Dans le milieu de production de  $0,8 \text{ ppm}_{\text{O}_2} \cdot \text{h}^{-1}$ , pour 1 vvh

Encore dans ce cas, le même milieu de propagation a été employé pour inoculer les deux milieux de production afin de s'affranchir des éventuels biais apportés par différentes propagations.

La comparaison entre les figures 47 et 49 d'une part et 48 et 50 d'autre part montre qu'un apport supérieur en oxygène durant la phase de propagation permet d'augmenter de manière très significative la concentration cellulaire durant la phase de production ( $2,5$  au lieu de  $1,1 \times 10^8 \text{ levures} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) ainsi que de maintenir une viabilité plus élevée plus longtemps.

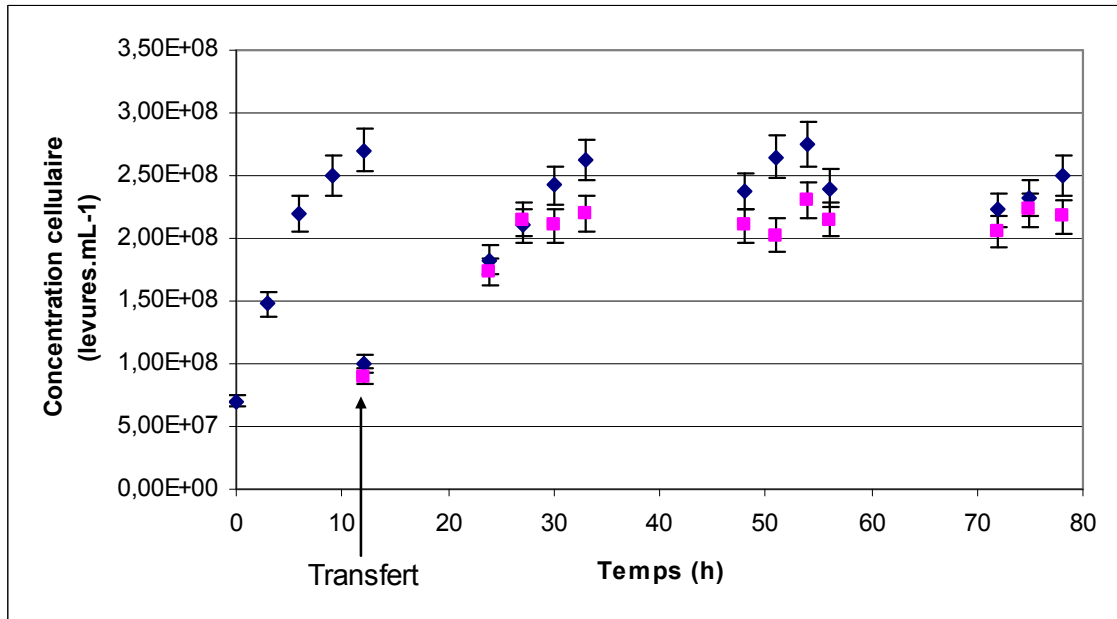


Figure 49: Suivi des concentrations cellulaires au cours du temps. Les (◆) représentent les concentrations cellulaires pour le milieu avec une aération de 10 vvh tout au long de la fermentation, les (■) représentent celles du milieu avec une aération de 10 vvh en phase de propagation puis 1 vvh en phase de production.

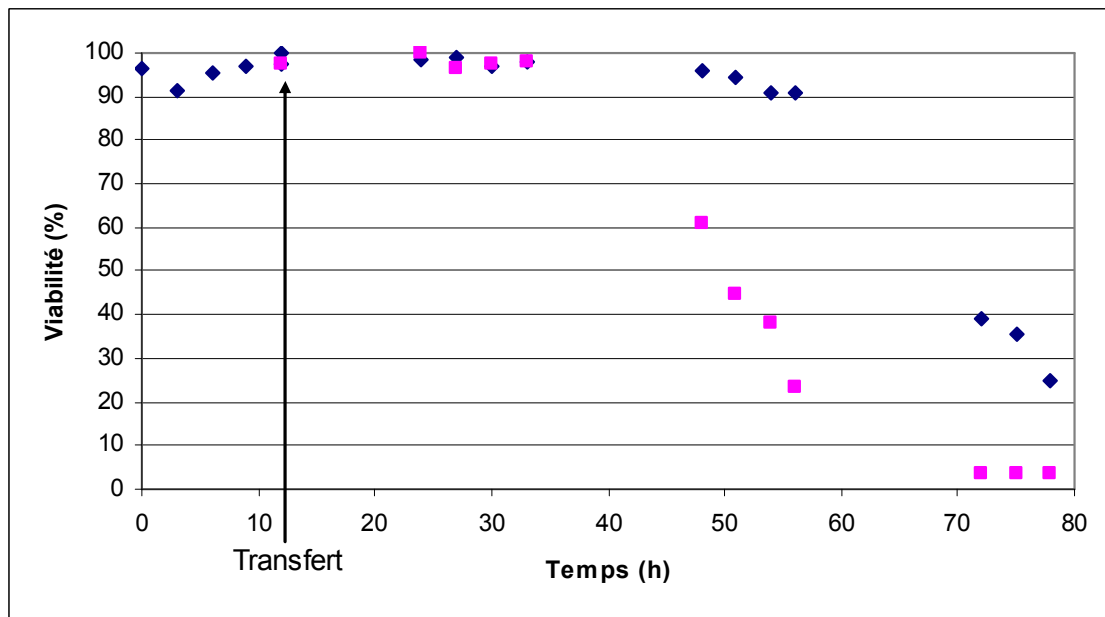


Figure 50: Suivi des viabilités au cours du temps. Les (◆) représentent les viabilités pour le milieu avec une aération de 10 vvh tout au long de la fermentation, les (■) représentent celles du milieu avec une aération de 10 vvh en phase de propagation puis 1 vvh en phase de production.

La figure 51 montre que la préparation du milieu de production était mauvaise. En effet, celui-ci contenant 260 g.L<sup>-1</sup> de sucre au lieu de 370 g.L<sup>-1</sup>. Sur l'ensemble de la fermentation il a donc été apporté uniquement 210 g.L<sup>-1</sup> de sucre au lieu de 300 g.L<sup>-1</sup>. L'utilisation des sucres a donc été complète et aussi plus rapide. Ce qui peut aussi expliquer pourquoi il y a une croissance dans la phase de production (moins de stress).

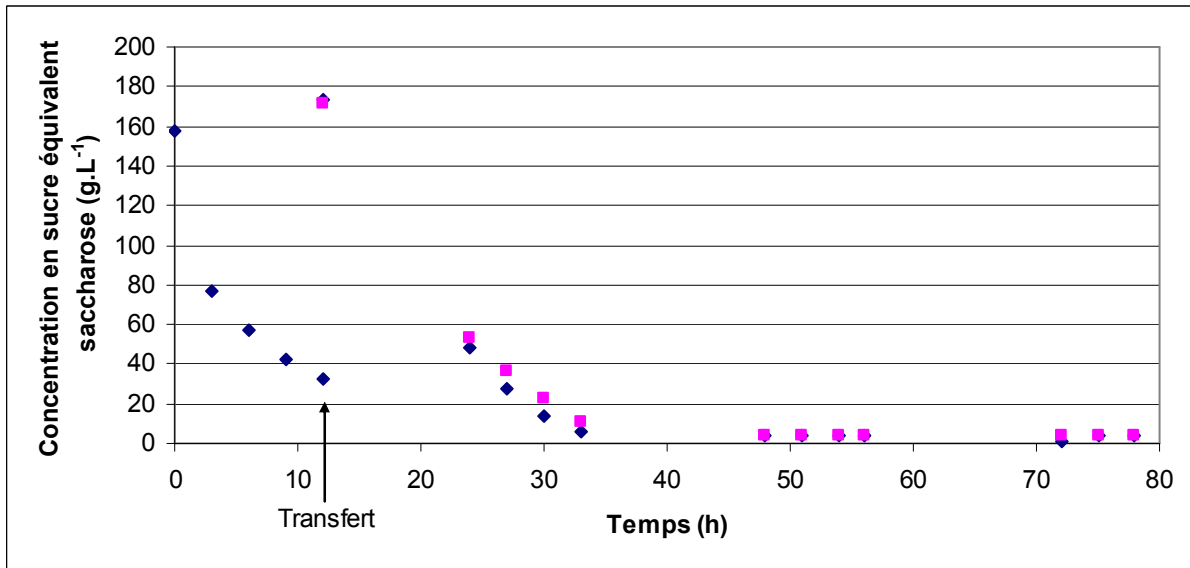


Figure 51: Suivi des concentrations en sucre au cours du temps. Les (◆) représentent les concentrations en sucre pour le milieu avec une aération de 10 vvh tout au long de la fermentation et les (■) représentent celles du milieu avec une aération de 10 vvh en phase de propagation puis 1 vvh en phase de production.

La figure 52 montre que le maximum d'éthanol (12,7%) est produit avec un débit d'air de 1 vvh. Alors qu'à 10 vvh le TAV diminue au cours du temps. Cette diminution de 0,04% par heure est imputable à un déficit de la capacité de condensation du fermenteur. Ainsi une partie de l'éthanol qui a été produit est entraîné par l'effluent gazeux au cours du temps.

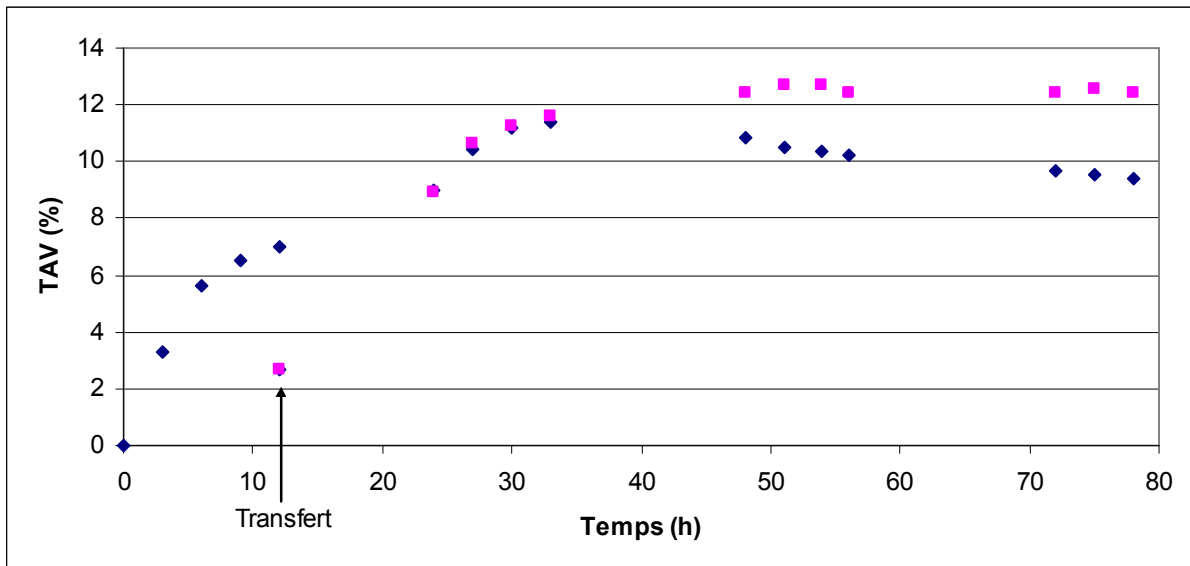


Figure 52: Suivi des TAV au cours du temps. Les (◆) représentent les TAV pour le milieu avec une aération de 10 vvh tout au long de la fermentation et les (■) représentent ceux du milieu avec une aération de 10 vvh en phase de propagation puis 1 vvh en phase de production.

Cette importante différence de TAV à partir de 48h explique que la viabilité observée pour le réacteur à 10 vvh soit supérieure en fin de fermentation. Toutefois, à cause du problème de préparation du milieu de production et du manque de capacité de condensation, il est impossible de conclure quant à l'intérêt d'une forte aération sur la fermentation.

Cependant, cela soulève le problème du stripping par une forte aération. Les ateliers de production d'éthanol étant limités en termes d'émission de composés organiques volatiles (COV), cela leur imposerait de s'équiper de condenseur puissant à la fois pour limiter les émissions de COV mais aussi pour limiter les pertes d'éthanol.

Toutes les contraintes dans le cadre d'une application de ces travaux de recherche sur une forte aération au milieu industriel, les rendent incohérents avec les objectifs de la thèse qui stipulent que l'optimisation ne doit pas passer par des investissements dans les ateliers de production. Ces travaux ont donc été suspendus et il a été considéré que le meilleur procédé pour l'aération consistait en un taux d'alimentation en air de 1 vvh tout au long de la fermentation, soit en moyenne environ  $1 \text{ ppmO}_2 \cdot \text{h}^{-1}$  transféré.

### III.2.7.2. L'azote et le phosphore tout au long de la fermentation

Suite aux travaux précédents, il a été établi que les besoins en phosphore et en azote de la souche C10 étaient respectivement de  $151 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  et  $31 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  et que l'apport d'oxygène était bénéfique tout au long de la fermentation.

Les expériences présentées ci-dessous ont été menées afin d'évaluer la nécessité ou non d'apporter l'azote et le phosphore tout au long de la fermentation ou juste durant la phase de propagation. Pour ce faire deux phases de propagation différentes ont été réalisées. Une avec un milieu contenant  $160 \text{ g}_{\text{sucre}} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $151 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de phosphore,  $31 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  d'azote et  $50 \mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$  d'antimousse Ouvrie 922k nommée NP et une avec un milieu contenant  $160 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $453 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de phosphore,  $93 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  d'azote et  $50 \mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$  d'antimousse Ouvrie 922k nommée NP X 3, soit trois fois les doses d'azote et de phosphore nécessaires.

Ces milieux de propagation ont, au bout de 12 h, respectivement été mélangés à hauteur d'un tiers pour deux tiers à un milieu contenant  $370 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de sucre équivalent saccharose,  $151 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de phosphore,  $31 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  d'azote et  $50 \mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$  d'antimousse Ouvrie 922k (NP) et à un milieu contenant uniquement  $370 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de sucre équivalent saccharose et  $50 \mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$  d'antimousse Ouvrie 922k (NPX3). Comme précédemment, les milieux ainsi produits contenaient après homogénéisation environ  $240 \text{ g}_{\text{sucre}} \cdot \text{L}^{-1}$  plus les éventuels sucres résiduels restant après la phase de propagation.

Les figures 53 et 54 montrent que la consommation de sucre a été légèrement supérieure lorsque la totalité de l'azote et du phosphore a été introduite en début de fermentation. La production d'éthanol a quant à elle été supérieure lorsque l'apport d'azote et de phosphore a eu lieu tout au long de la fermentation. Les résultats obtenus en fin de fermentation sont présentés tableau 35.

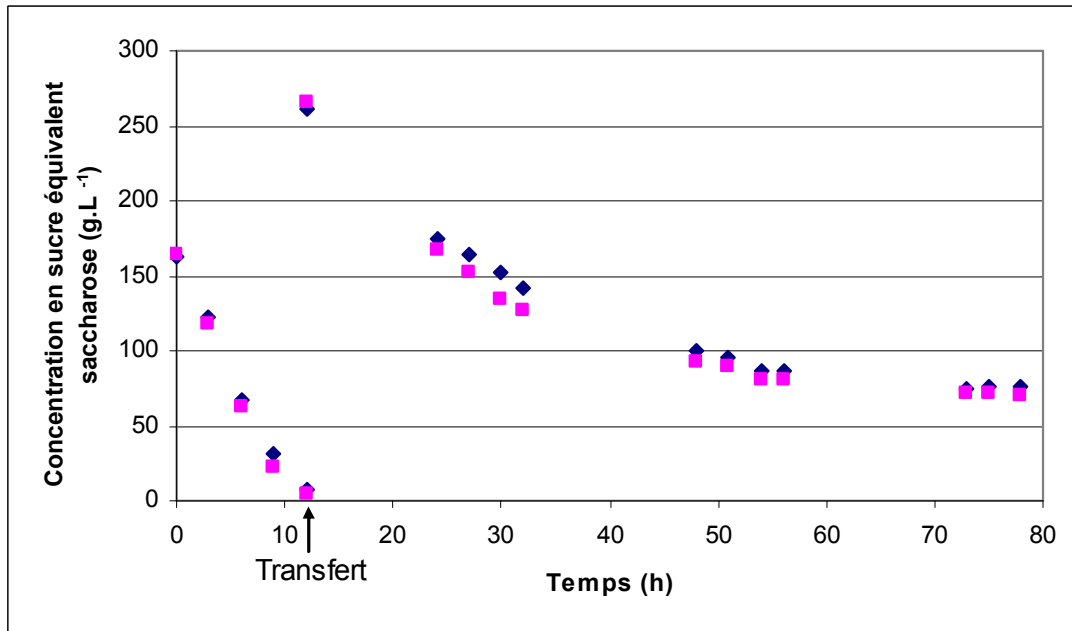


Figure 53: Suivi des concentrations en sucre équivalent saccharose au cours du temps. Les (◆) représentent les concentrations en sucre équivalent saccharose pour le milieu avec apport d'azote et de phosphore au cours des deux phases de la fermentation (NP) et les (■) représentent celles du milieu avec apport d'azote et de phosphore uniquement durant la phase de propagation (NPX3).

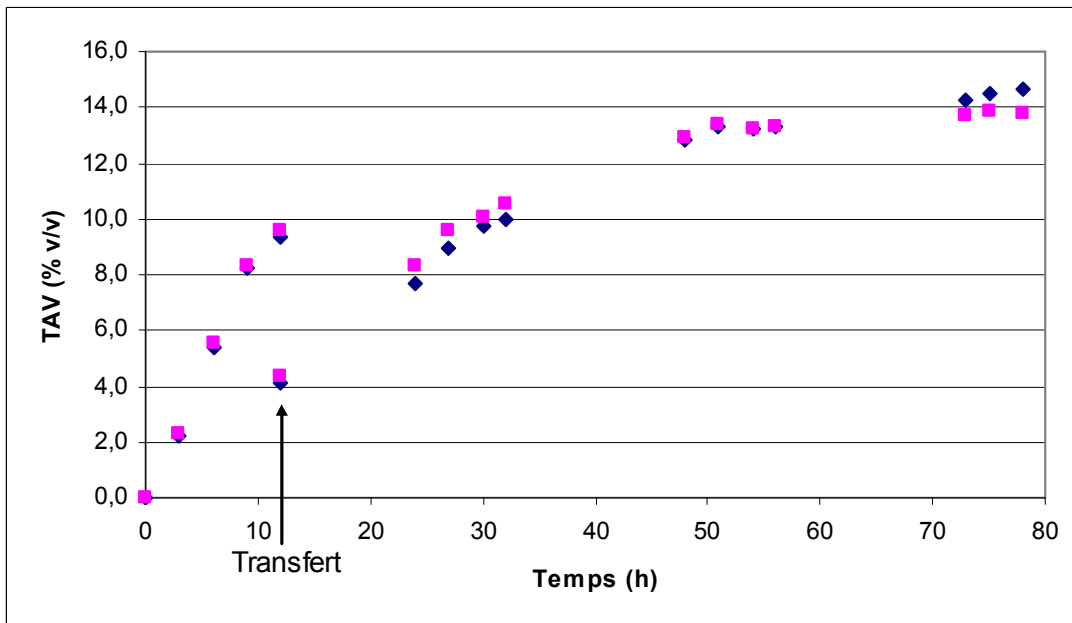


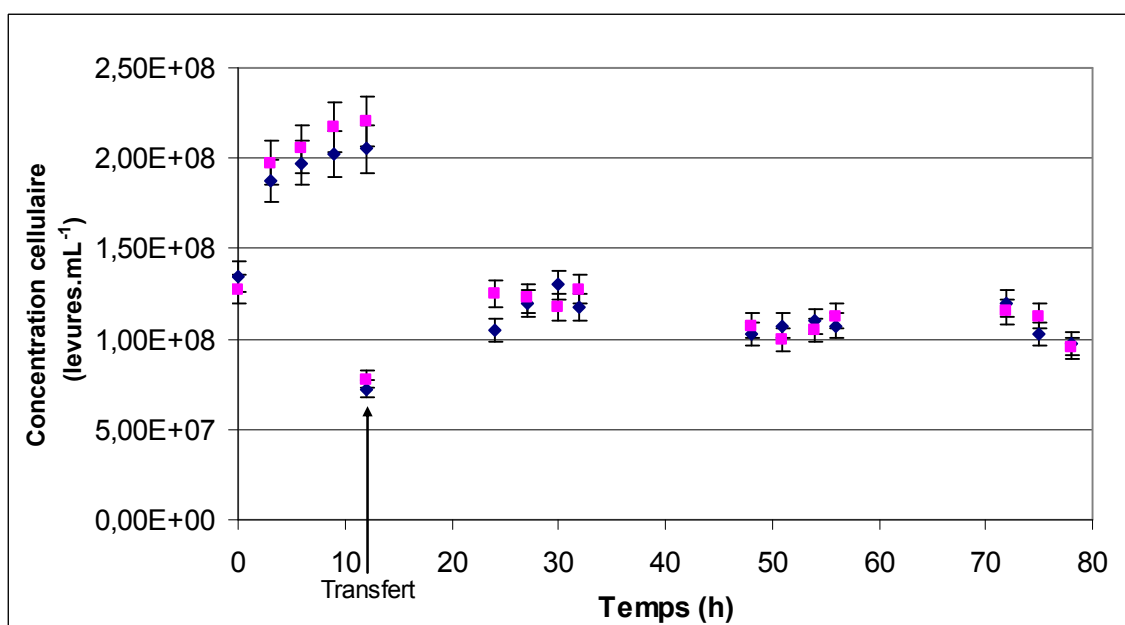
Figure 54: Suivi des TAV au cours du temps. Les (◆) représentent les TAV pour le milieu avec apport d'azote et de phosphore au cours des deux phases de la fermentation (NP) et les (■) représentent ceux du milieu avec apport d'azote et de phosphore uniquement durant la phase de propagation (NPX3).

Le tableau 35 montre que l'apport de la totalité de l'azote et du phosphore durant la phase de propagation ne permet pas d'améliorer la production d'éthanol. Au contraire, l'apport d'azote et de phosphore au cours des deux phases de la fermentation permet d'obtenir des meilleurs TAV finaux, rendements et productivité. Il est donc certes nécessaire de prendre en compte les concentrations en azote et phosphore dans les milieux de fermentation mais aussi le moment auquel ils sont apportés.

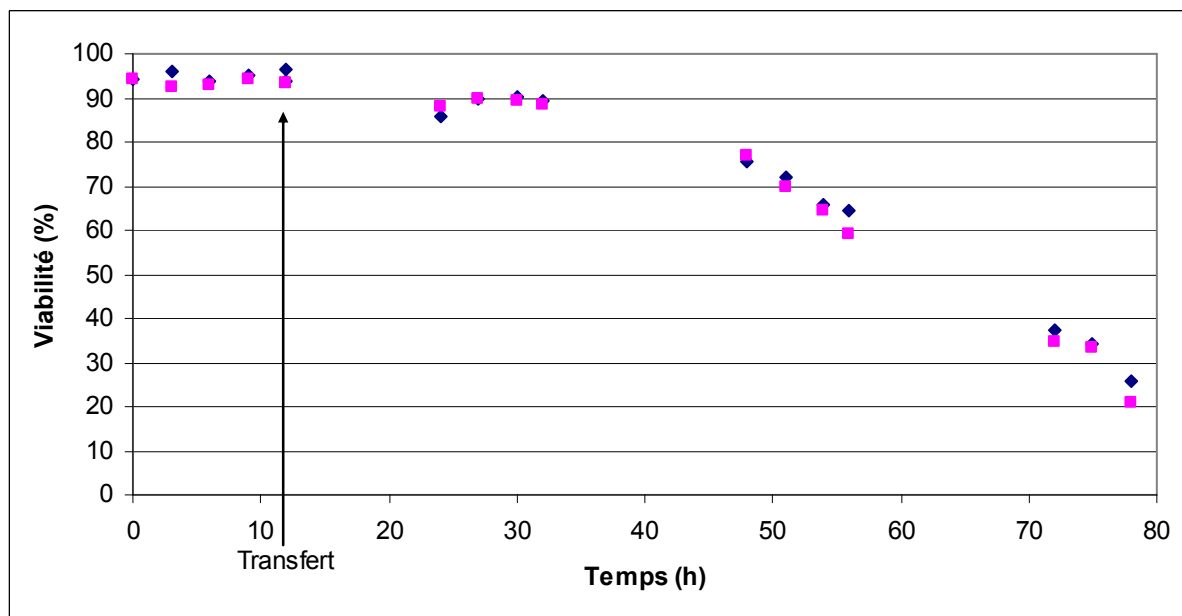
**Tableau 35: Résultats obtenus pour les différentes phases des fermentations réalisées. NP correspond au milieu avec apport d'azote et de phosphore au cours des deux phases de la fermentation et NP X 3 au milieu avec apport d'azote et de phosphore uniquement durant la phase de propagation.**

	NP	NP X 3
TAV en fin de phase de propagation (% v/v)	9,3	9,6
TAV en fin de phase de production (% v/v)	14,7	13,8
Rendement sur l'ensemble de la fermentation ( $g_{\text{éthanol}} \cdot g_{\text{sucré}}^{-1}$ )	0,482	0,433
Rendement sur la phase de propagation ( $g_{\text{éthanol}} \cdot g_{\text{sucré}}^{-1}$ )	0,476	0,476
Rendement sur la phase de production ( $g_{\text{éthanol}} \cdot g_{\text{sucré}}^{-1}$ )	0,490	0,425
Concentration en sucre consommé en phase de propagation ( $g \cdot L^{-1}$ )	155	159
Concentration en sucre consommé en phase de production ( $g \cdot L^{-1}$ )	186	196
Concentration en sucre consommé sur la fermentation ( $g \cdot L^{-1}$ )	238	249

Les figures 55 et 56 présentent les résultats obtenus pour le suivi des concentrations en levure et des viabilités. Ces deux figures ne permettent pas de mettre en évidence un quelconque effet de l'apport de l'azote et du phosphore tout au long de la fermentation.



**Figure 55: Suivi des concentrations cellulaires au cours du temps. Les (◆) représentent les concentrations cellulaires pour le milieu avec apport d'azote et de phosphore au cours des deux phases de la fermentation et les (◼) représentent celles du milieu avec apport d'azote et de phosphore uniquement durant la phase de propagation.**



**Figure 56: Suivi des viabilités au cours du temps. Les (◆) représentent les viabilités pour le milieu avec apport d'azote et de phosphore au cours des deux phases de la fermentation et les (■) représentent celles du milieu avec apport d'azote et de phosphore uniquement durant la phase de propagation.**

D'après les résultats présentés ci-dessus, les besoins en azote et en phosphore de la levure ne se concentrent pas uniquement lors de la phase de croissance mais tout le long de la fermentation pour, par exemple le turn over des composants cellulaires. Ainsi, il semble nécessaire d'apporter ces éléments de manière régulière afin qu'ils soient toujours disponibles. Comme il a été montré, dans les conditions appliquées ici, l'azote et le phosphore n'ont pas d'impact significatif sur la croissance ou le maintien des cellules dans le milieu. Cependant, lorsqu'ils sont disponibles à chaque étape de la fermentation ils permettent d'augmenter l'activité cellulaire.

### III.2.7.3. Conclusion sur les apports de nutriment en cours de fermentation

Les résultats présentés ci-dessus montrent qu'il est nécessaire d'apporter de l'oxygène, l'azote et le phosphore au cours de chaque étape de la fermentation.

Ces fermentations batch bi-étagées ont permis l'obtention de plus de 14,5 % d'éthanol et ce avec des rendements d'environ  $0,50 \text{ g}_{\text{éthanol}} \cdot \text{g}_{\text{sucrose}}^{-1}$  contre environ  $0,44 \text{ g}_{\text{éthanol}} \cdot \text{g}_{\text{sucrose}}^{-1}$  en batch en erlenmeyer sur les différents milieux S. Ceci montre l'intérêt de l'apport d'oxygène, d'une bonne gestion des apports d'azote et de phosphore ainsi que l'intérêt de limiter les stress que subit la levure par un apport en nutriment à différents moments de la fermentation. Les besoins de la levure en nutriments ne se limitent donc pas à la phase de croissance mais tout au long de la fermentation.

Enfin, en comparant les fermentations O2 et NP qui ont été réalisées à l'identique mais à plusieurs semaines d'intervalles il est possible d'observer des résultats presque identiques pour les paramètres suivis. Ce dernier point souligne le fait que les fermentations en réacteur, contrairement aux fermentations en erlenmeyer, sont reproductibles avec des concentrations finales en éthanol à +/- 0,05 % (v/v).

Après avoir travaillé sur la composition du milieu de culture et le moment d'apport des nutriments les travaux de recherche se sont portés sur le procédé de fermentation en lui-même.

## III.3. Recherche du procédé de fermentation le plus performant

Suite aux observations faites sur l'amélioration de la composition du milieu de culture et sur les apports de nutriments en cours de fermentation, l'étude portant sur le procédé de fermentation le plus performant a débuté par l'utilisation d'un procédé batch multi-étagé avec un milieu comportant tous les facteurs bénéfiques pour la fermentation (cf partie III.2.6 Conclusion sur l'amélioration de la

composition du milieu). Puis des procédés fed-batch ont été testés car ce procédé correspond à des fermentations avec une infinité d'étages, il y a donc un apport régulier en nutriments. Ces fermentations en fed-batch ont été réalisées dans un réacteur LH Inceltech Series 210 d'une capacité de 4L sous une agitation de 150 rpm (minimum possible pour l'utilisation de ces réacteurs) et les fermentations multi-étagées en réacteur Sétric Set 1 sous une agitation de 120 rpm comme pour les tests bi-étagés précédents.

Pour toutes les fermentations regroupées dans cette partie les différents milieux utilisés ont été supplémentés avec  $151 \text{ mg.L}^{-1}$  de phosphore ajouté,  $31 \text{ mg.L}^{-1}$  d'azote ajouté,  $1 \text{ g.L}^{-1}$  d'extrait de levure, 120 ppm de magnésium et de  $50 \text{ }\mu\text{L.L}^{-1}$  d'antimousse Ouvrie 922k. Des vinasses ont été utilisées pour réaliser la dilution du SBP, celles-ci représentaient 30% du volume de dilution. L'inoculation a été réalisée avec la souche C10 à un taux d'environ  $10^7$  levures viables. $\text{mL}^{-1}$ . L'utilisation de vinasses pour la réalisation du milieu entraîne l'incorporation d'une grande quantité de cellules inertes, la concentration cellulaire totale n'est donc, dans cette partie, plus un critère. Seul y est retenue la concentration en levures viables.

La concentration en sucre de  $300 \text{ g.L}^{-1}$  sur l'ensemble de la fermentation a été conservée. Les températures pour les précultures utilisées pour l'ensemencement des réacteurs étaient identiques aux températures appliquées durant les fermentations. En effet, afin de limiter la synergie des stress causés par l'éthanol et la température, les fermentations ont été réalisées à  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Deux fermentations identiques, à part pour la température, ont été réalisées afin de démontrer l'intérêt de la diminution de la température de  $33$  à  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  pour l'obtention de concentrations finales élevées en fin de fermentation. Enfin, toutes ces fermentations ont été aérées à 1 vvh et, ce durant toute la durée des fermentations.

### III.3.1. Procédé batch bi-étagé avec tous les composés bénéfiques

Une fermentation batch bi-étagée a été réalisée comme précédemment mais cette fois à  $30^\circ\text{C}$  et avec addition de tous les composés bénéfiques pour la production d'éthanol ainsi que l'utilisation de vinasses. Les concentrations en sucre dans les phases étaient comme précédemment  $160 \text{ g.L}^{-1}$  pour la phase 1 et  $240 \text{ g.L}^{-1}$  additionné des sucres résiduels de la phase 1 pour la phase 2.

La figure 57 montre que contrairement aux deux fermentations bi-étagées précédentes, il y a une seconde croissance de la biomasse qui a eu lieu durant le début de la phase de production. Ceci s'explique par la diminution des deux stress que sont la température ainsi que la concentration en éthanol, qui était inférieure en début de la phase de production pour la fermentation bi-étagée tous composés. La chute importante de la viabilité en fin de fermentation à partir de 48 h s'explique par une concentration élevée en éthanol.

Cette fermentation a aussi connu un temps de latence marqué, de deux heures en début de fermentation, chose qui n'était pas observée pour l'ensemble des fermentations précédentes.



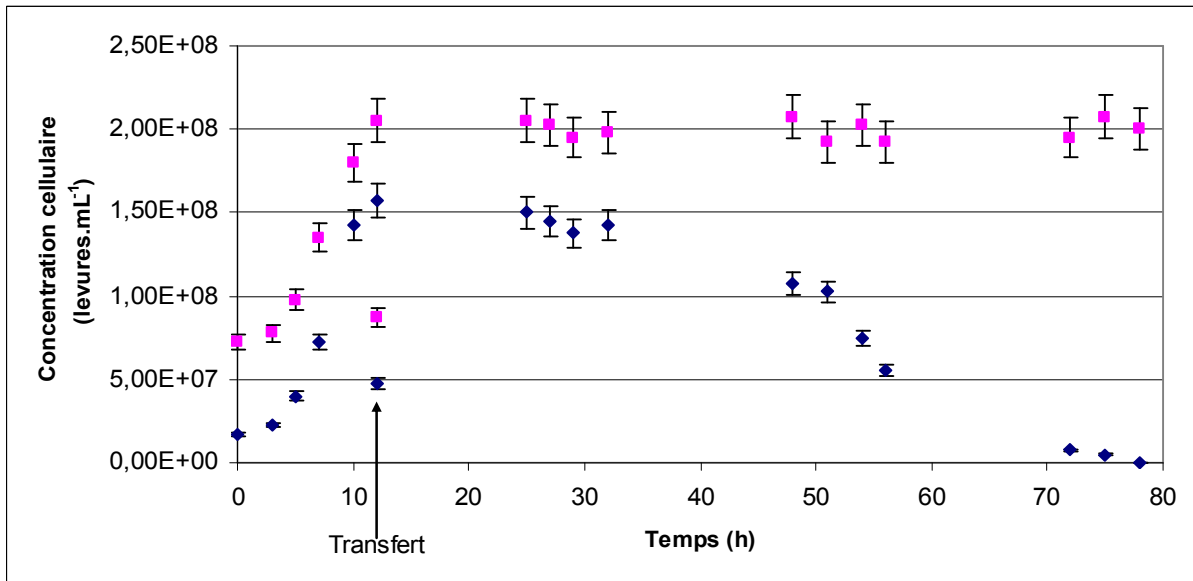


Figure 57: Suivi des concentrations cellulaires au cours du temps lors du bi-étagé à 30 °C avec milieu optimisé. Les (◆) représentent les concentrations de cellules viables et les (■) représentent celles de cellules totales.

La figure 58 montre un profil de production d'éthanol et de consommation de sucre très similaire aux fermentations bi-étagés O2 et NP précédentes qui étaient les fermentations les plus proches en terme de procédé réalisées jusqu'ici. De plus, la durée de la fermentation est ici identique à ces fermentations. Le tableau 36 montre les résultats obtenus pour ces trois fermentations.

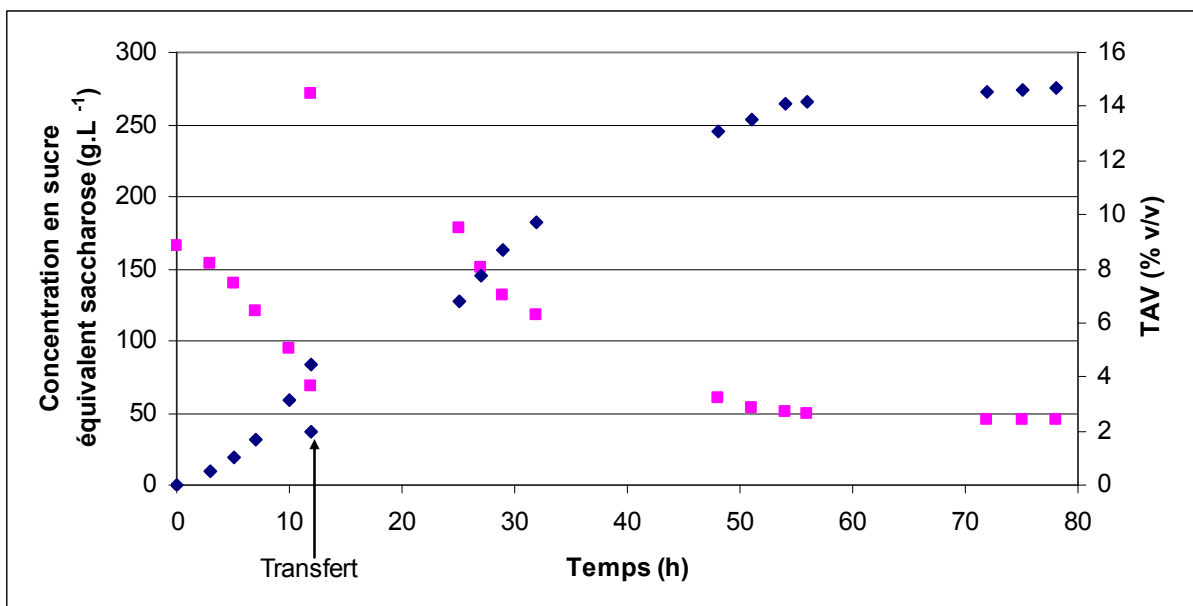


Figure 58: Suivis du TAV et de la concentration en sucres équivalent saccharose au cours du temps lors du bi-étagé à 30 °C avec milieu optimisé. Les (◆) représentent le TAV et les (■) représentent la concentration en sucres équivalent saccharose.

Le tableau 36 montre qu'en diminuant la température de fermentation ainsi que la concentration de l'inoculum, 10<sup>8</sup> levures.mL<sup>-1</sup> pour NP et O2 contre 10<sup>7</sup> levures.mL<sup>-1</sup> pour le batch bi-étagé tous composés, l'éthanol produit en de phase de propagation est divisé par 2. De plus à cause d'une croissance supérieure de la biomasse, le rendement indiqué pour la phase de propagation de la fermentation bi-étagée tous composés est inférieur de près de 10 % par rapport à ceux de O2 et NP.

L'apparition d'une seconde croissance au début de la phase de production explique la diminution de rendement en phase de production observée ici. Or d'après les observations faites, l'obtention d'une concentration finale en éthanol passe par l'augmentation du rendement (cf partie III.2.4.2. Etude sur la quantité d'inoculum). Il est donc nécessaire d'obtenir une biomasse suffisante pour la production d'éthanol sans que celle-ci soit excessive. Cette concentration en levures semblerait, d'après ces résultats comprise, entre 1 et  $1,5 \times 10^8$  levures.mL<sup>-1</sup>.

Enfin, comme le montre le tableau 36, le TAV final obtenu ici est identique à ceux observés pour les fermentations O2 et NP, ce qui indique que l'amélioration du procédé bi-étagé tel qu'il a été réalisé, ne passe ni pas l'amélioration de la composition du milieu ni par la diminution de la température. La limite vient donc du procédé batch bi-étagé en lui-même tel qu'il a été réalisé et non pas de la composition du milieu ou de la température.

**Tableau 36: Résultats obtenus pour les différentes phases de la fermentation batch bi-étagée tous composés. Les résultats pour les fermentations O2 et NP correspondent au milieu à 300 g.L<sup>-1</sup> de sucre avec ajout d'azote et phosphore incubé à 33 °C. Les phases de propagation ont toutes duré 12 heures avant le transfert d'un tiers du milieu dans une cuve contenant du milieu frais.**

	Bi-étagé tous composés (30°C)	O2 (33°C)	NP (33°C)
TAV en fin de phase de propagation (% v/v)	4,5	9,5	9,3
TAV en fin de phase de production (% v/v)	14,7	14,6	14,7
Rendement sur la phase de propagation (g <sub>éthanol</sub> .g <sub>sucré</sub> <sup>-1</sup> )	0,362	0,469	0,476
Rendement en phase de production (g <sub>éthanol</sub> .g <sub>sucré</sub> <sup>-1</sup> )	0,461	0,518	0,490
Rendement sur l'ensemble de la fermentation (g <sub>éthanol</sub> .g <sub>sucré</sub> <sup>-1</sup> )	0,448	0,503	0,482
Concentration en sucre consommé en phase de propagation (g.L <sup>-1</sup> )	98	159	155
Concentration en sucre consommé en phase de production (g.L <sup>-1</sup> )	226	175	186
Concentration en sucre consommé sur la fermentation (g.L <sup>-1</sup> )	259	228	238

Le procédé bi-étagé est néanmoins intéressant car il est à la fois performant et simple à mettre en œuvre. Cependant, il n'a jamais permis de dépasser 14,7% d'éthanol même à 30°C avec les composés bénéfiques pour la production d'éthanol.

Afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle la limite viendrait du procédé batch bi-étagé en lui-même, une fermentation batch tri-étagée a été réalisée. Cette fermentation a été considérée comme un procédé intermédiaire entre le bi-étagé et le fed-batch.

### III.3.2. Procédé tri-étagé

Cette fermentation a été menée de manière identique à la fermentation bi-étagée tous composés. La différence a résidé dans l'ajout d'une phase de production supplémentaire. Ceci a permis de limiter le stress dû au sucre subi par les levures puisque le sucre a été apporté en trois fois et non plus en deux.

Comme illustré figure 59, la première étape, phase 1, a consisté en une phase de propagation dans un milieu contenant 160 g<sub>sucré</sub>.L<sup>-1</sup>. Au bout de 12 h, 333 mL de ce milieu ont été transférés dans un autre réacteur contenant 667 mL d'un milieu à 285 g.L<sup>-1</sup> de sucre équivalent saccharose, ce qui a permis après dilution d'obtenir un milieu à 190 g<sub>sucré</sub>.L<sup>-1</sup>, phase 2. Puis après 24h, 667 mL du milieu de la phase 2 ont été transférés dans un troisième réacteur contenant 333 mL d'un milieu à 420 g.L<sup>-1</sup> de sucre équivalent saccharose, ce qui a permis après dilution d'obtenir un milieu à 140 g<sub>sucré</sub>.L<sup>-1</sup>, phase 3, pour une concentration globale en sucre de 300 g.L<sup>-1</sup>.

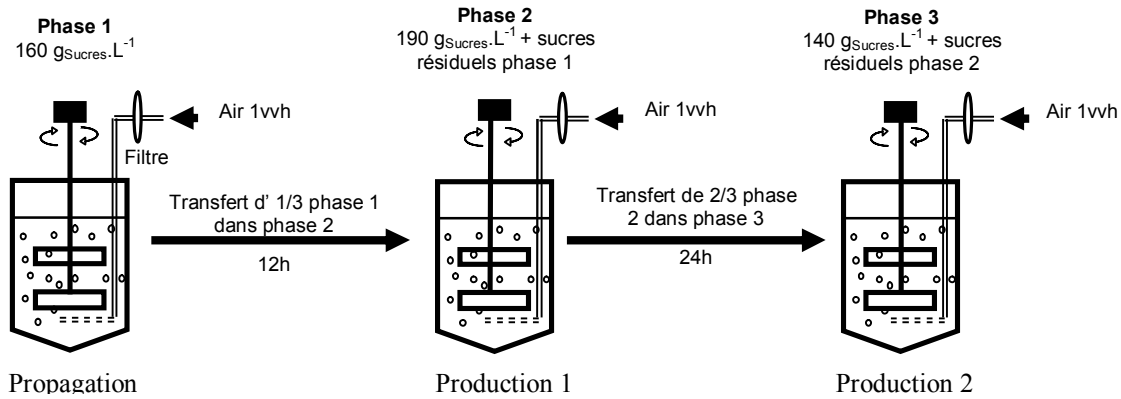


Figure 59: Schéma de la fermentation batch tri-étagée

La figure 60 montre que comme pour la fermentation batch bi-étagée tous compléments, il y a une seconde croissance de la biomasse qui a eu lieu durant le début de la première phase de production. Durant la seconde phase de production aucune croissance n'est observée, ce qui est dû à la concentration en éthanol au début de la seconde phase de production (phase 3).

En effet, au cours de l'expérience précédente en batch bi-étagé à 30 °C avec le milieu optimisé, il y a eu croissance de la biomasse en début de phase 2 alors que la concentration en sucre y était supérieure à celle observée dans ce batch tri-étagé en début de phase 3. Le seul paramètre expliquant l'inhibition de la croissance en phase 3 du batch tri-étagé est donc la concentration initiale en éthanol qui été de 6 % (v/v) contre 2 % (v/v) en début de phase 2 pour le batch bi-étagé. Ceci indique, qu'en fermentation étagée dans les conditions appliquées, la croissance est inhibée par des concentrations en éthanol de l'ordre de 6 % (v/v).

La comparaison entre les suivis de la viabilité pour la fermentation batch bi-étagée tous compléments, figure 57, et pour la fermentation tri-étagée, figure 60, montre qu'un apport régulier de nutriments permet de maintenir une meilleure viabilité et, ce jusq'en fin de fermentation.

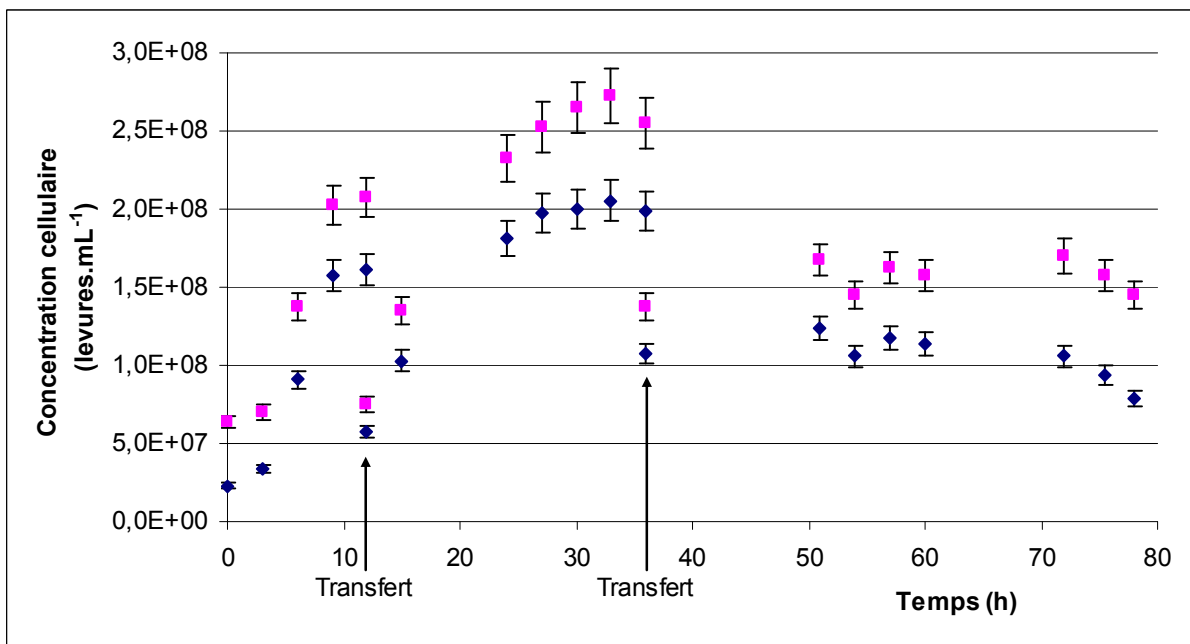


Figure 60: Suivi des concentrations cellulaires au cours du temps lors du tri-étagé avec milieu optimisé. Les (◆) représentent les concentrations de cellules viables et les (■) représentent celles de cellules totales.

La figure 61 présente les résultats obtenus pour le TAV et la concentration en sucres équivalent saccharose. Ce graphique présente des profils d'évolution similaires à la fermentation batch bi-étagée tous composés. Cependant, ici il n'y a pas de temps de latence en début de fermentation ce qui explique une concentration en éthanol supérieure dans le réacteur en fin de phase de propagation. La figure 61 montre aussi que la concentration en sucre résiduel est faible en fin de fermentation, cela s'explique par une concentration initiale en sucre pour la phase 3 qui a été inférieure à ce qu'elle aurait dû. Ceci n'a pas permis l'apport de  $300 \text{ g}_{\text{sucres}} \cdot \text{L}^{-1}$  sur l'ensemble de la fermentation mais uniquement de  $279 \text{ g}_{\text{sucres}} \cdot \text{L}^{-1}$ .

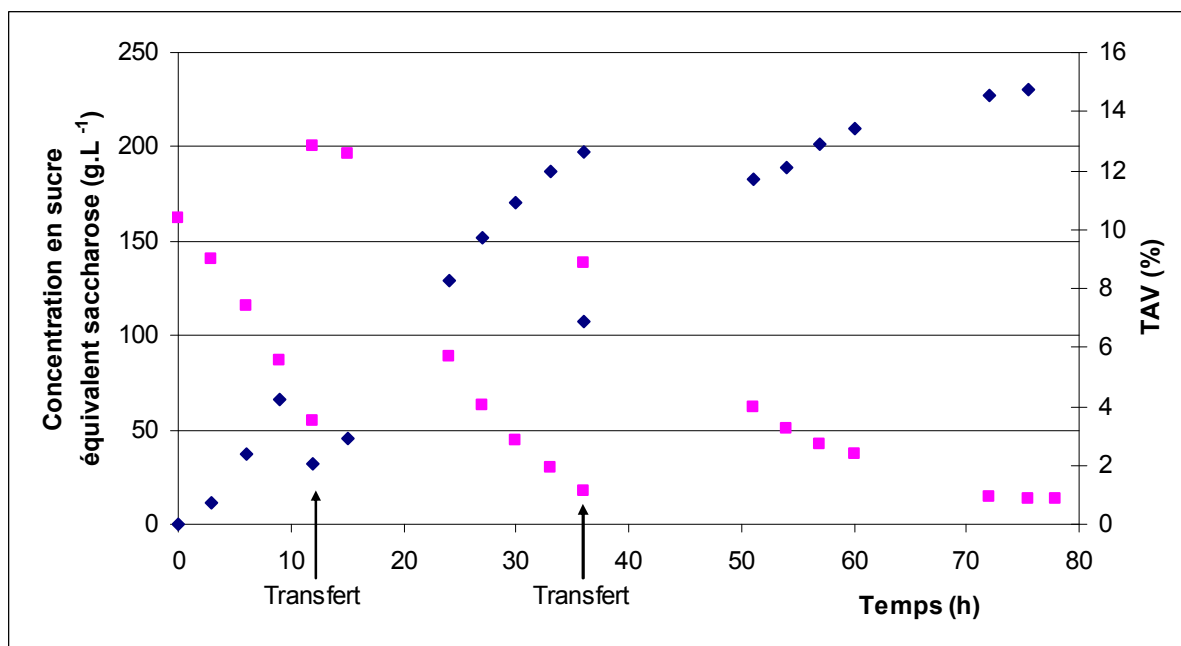


Figure 61: Suivis du TAV et de la concentration en sucres équivalent saccharose au cours du temps lors du tri-étagé avec milieu optimisé. Les (◆) représentent le TAV et les (■) représentent la concentration en sucres équivalent saccharose.

Le tableau 37 montre que le TAV en fin de phase 1, correspondant à la propagation, est inférieur à ceux observés pour les fermentations bi-étagées NP et O2. Ceci s'explique, comme pour le batch bi-étagé tous composés, par un inoculum plus faible et une température inférieure. Néanmoins, en fin de phase 2, le TAV obtenu est de 12,6% en seulement 36h alors qu'il en avait fallu environ 48 pour les fermentations bi-étagées. Les conditions de culture sont donc plus favorables dans ce cas. Le TAV obtenu en fin de fermentation est légèrement supérieur à ceux obtenus en fermentation bi-étagée.

**Tableau 37: Résultats obtenus pour les différentes phases de la fermentation tri-étagée. La phase 1 correspond à la phase de propagation a duré 12 heures avant le transfert d'un tiers du milieu dans une cuve contenant du milieu frais. La phase 2 correspond à la première phase de production qui a duré 24 h. La phase 3 correspond à la seconde phase de production.**

TAV en fin de phase de phase 1 (% v/v)	5,6
TAV en fin de phase de phase 2 (% v/v)	12,6
TAV en fin de phase de phase 3 (% v/v)	14,9
Rendement sur la phase 1 ( $\text{g}_{\text{éthanol}} \cdot \text{g}_{\text{sucré}}^{-1}$ )	0,411
Rendement sur la phase 2 ( $\text{g}_{\text{éthanol}} \cdot \text{g}_{\text{sucré}}^{-1}$ )	0,458
Rendement sur la phase 3 ( $\text{g}_{\text{éthanol}} \cdot \text{g}_{\text{sucré}}^{-1}$ )	0,491
Rendement sur l'ensemble de la fermentation ( $\text{g}_{\text{éthanol}} \cdot \text{g}_{\text{sucré}}^{-1}$ )	0,442
Concentration en sucre consommé en phase 1 ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	107
Concentration en sucre consommé en phase 2 ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	162
Concentration en sucre consommé en phase 3 ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	116
Concentration en sucre consommé sur l'ensemble de la fermentation ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	266

Le rendement pour la phase 2 est proche de ceux observés pour les phases de propagation des fermentations bi-étagées. Le rendement observé en phase 3 est proche de ceux observés lors des phases de production des fermentations bi-étagées O2 et NP. Cette double croissance pourrait en partie expliquer le faible rendement observé sur l'ensemble de la fermentation puisque dans le cas présent  $3,7 \times 10^8$  levures.mL<sup>-1</sup> ont été produits alors que seule la moitié l'a été lors des deux fermentations bi-étagées.

La viabilité est ici remarquable. En effet, pour des TAV finaux proches lors de fermentation bi-étagée tout composés, la viabilité en fin de fermentation était proche de 0, ici elle est supérieure à 50 % ce qui est préférable en cas de recyclage cellulaire. Les résultats obtenus au cours de cette fermentation tri-étagée indique que l'augmentation du nombre d'étages permet d'augmenter la concentration finale en éthanol. C'est pour cette raison que le procédé fed-batch a été testé par la suite car ce procédé permet de réaliser des fermentations avec une infinité d'étages.

### III.3.3. Procédé fed-batch

#### III.3.3.1. Fed-batch alimentation longue / débit constant : Influence de la température

La température est un paramètre important pour la fermentation alcoolique comme le présente la partie I.3.3.3.. Or, si le choix de réaliser les fermentations à 30 °C a été fait, les effets de la température n'avaient pas encore été étudiés. Les fed-batch réalisés ici ont servi à déterminer quelle température, de 30 ou 33 °C respectivement nommés fed-batch 1 et fed-batch 2, permet d'atteindre les plus hautes teneurs en éthanol en fin de fermentation avec le milieu utilisé. Ces deux températures ont été choisies car, 33 °C correspond à la consigne actuellement recherchée en industrie (cf partie III.1.5. Tableau comparatif des sites) et 30 °C est d'après la bibliographie (cf partie I.3.3.3 La température) la température limite au dessus de laquelle la concentration finale en éthanol est susceptible de diminuer et la croissance des levures stopper. 30 °C est donc d'après la bibliographie le meilleur compromis entre vitesse de production et stress subi par les levures.

La méthode 1 (cf partie II.8. Réalisation des fermentations en fed-batch) à été adaptée au type de fermentations réalisées ici à partir des données collectées sur le site N° 2 et N° 4 qui réalisent actuellement des fermentations en fed-batch et obtiennent les concentrations finales en éthanol les plus élevées. Comme en industrie, les expériences en fed-batch ont été réalisées en trois phases :

- La première consistait en une propagation des levures en batch durant 6 h dans un volume de 1,33 L en moût léger composé de 130 g.L<sup>-1</sup> de sucre équivalent saccharose. Cette phase a servi au développement de la biomasse accompagné d'une production d'éthanol.

- La seconde phase consistait en une alimentation du réacteur à un débit de  $55,5 \text{ mL.h}^{-1}$  pendant 48h avec un moût lourd composé de  $385 \text{ g.L}^{-1}$  de sucre équivalent saccharose conservé sous agitation constante dans une cuve maintenue à  $6^\circ\text{C}$ . Cette phase a servi principalement à la production d'éthanol.
- La dernière phase consistait en un « temps de chute » d'une durée de 24h afin d'épuiser au maximum les sucres jusqu'à stabilisation de la concentration en éthanol.

Le graphique 62 présente l'évolution du volume de milieu dans la cuve pour les fed-batch 1 et 2 ainsi que celle de la concentration en sucre dans l'hypothèse où il n'y a pas de consommation. Ce graphique montre que l'augmentation de la concentration en sucre est beaucoup plus importante en début qu'en fin de fermentation.

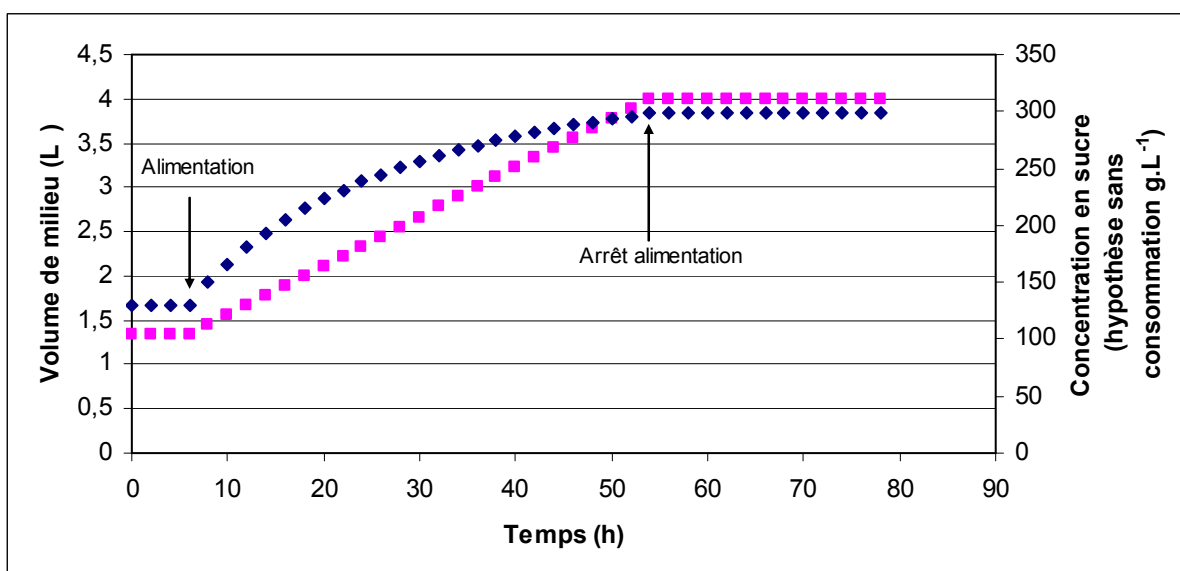


Figure 62: Evolution du volume et de la concentration en sucre dans le milieu dans l'hypothèse d'un milieu non inoculé lors d'un fed-batch réalisé à  $30^\circ\text{C}$ . Les (◆) représentent la concentration en sucre équivalent saccharose et les (■) représentent le volume de milieu dans le réacteur.

Les graphiques 63 et 64 présentent les résultats obtenus pour le fed-batch à  $30^\circ\text{C}$ , pour respectivement les concentrations cellulaires et les concentrations en sucre et en éthanol.

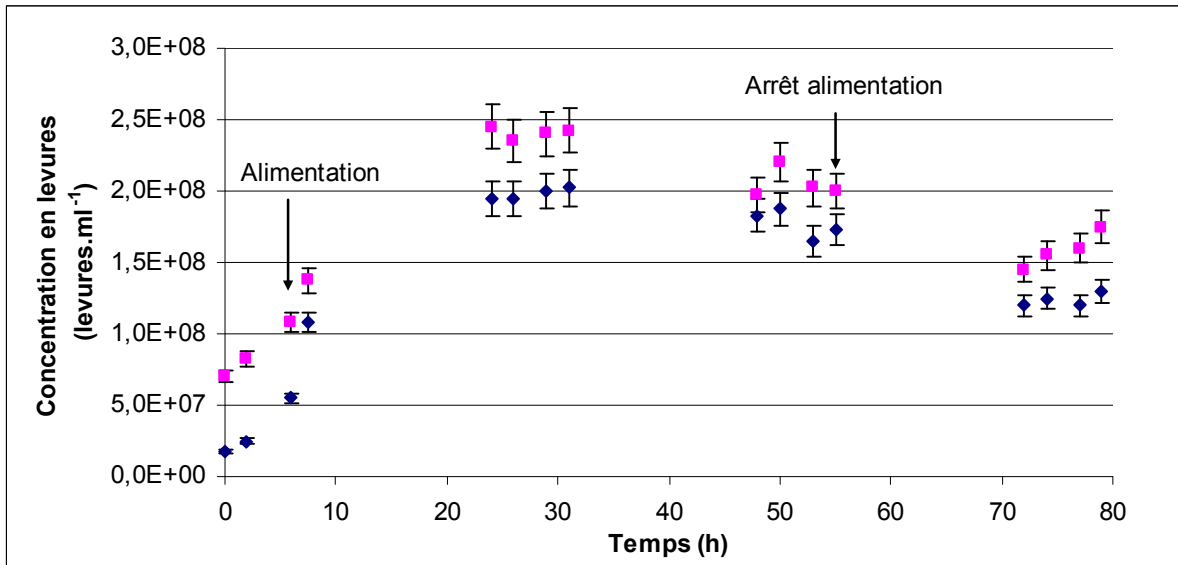


Figure 63: Suivi des concentrations cellulaires au cours du temps lors d'un fed-batch réalisé à 30°C. Les (◆) représentent les concentrations de cellules viables et les (■) représentent celles de cellules totales.

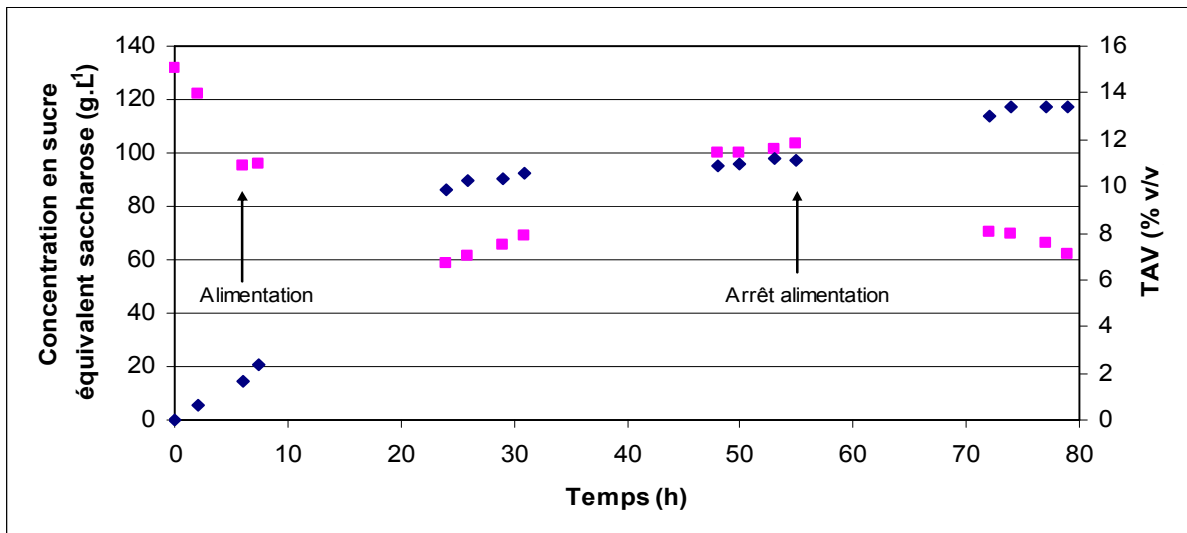


Figure 64: Suivis du TAV et de la concentration en sucres équivalent saccharose au cours du temps lors d'un fed-batch réalisé à 30°C. Les (◆) représentent le TAV et les (■) représentent la concentration en sucres équivalent saccharose.

Les graphiques 63 et 64 montrent que la population levurienne et le TAV augmentent au cours des premières 24h après alimentation pour par la suite se stabiliser à respectivement environ  $2 \times 10^8$  levures.mL<sup>-1</sup> et 11 % de TAV. Un TAV de 11 % à 30°C perturbe donc très fortement la fermentation en diminuant de manière nette la production volumique d'éthanol dans le milieu. La stabilisation de la concentration en éthanol durant la phase d'alimentation montre qu'il y a eu équilibre en la production d'éthanol et la dilution causée par l'apport de milieu frais. Cette stabilisation de la concentration en éthanol au cours de l'alimentation ne sert pas l'objectif de ces travaux de thèse puisque le TAV final obtenu ici est inférieur de 1,5 % (v/v) à ce qui a été obtenu lors de la fermentation tri-étagée.

La figure 64 montre aussi qu'il y a eu au cours de la phase d'alimentation une importante accumulation de sucre dans le réacteur. Ceci montre que l'alimentation a été inappropriée et trop rapide : le stress causé par le sucre a probablement augmenté au cours de la fermentation.

Les graphiques 65 et 66 présentent les résultats obtenus pour le fed-batch à 33°C, pour respectivement les concentrations cellulaires et les concentrations en sucre et en éthanol.

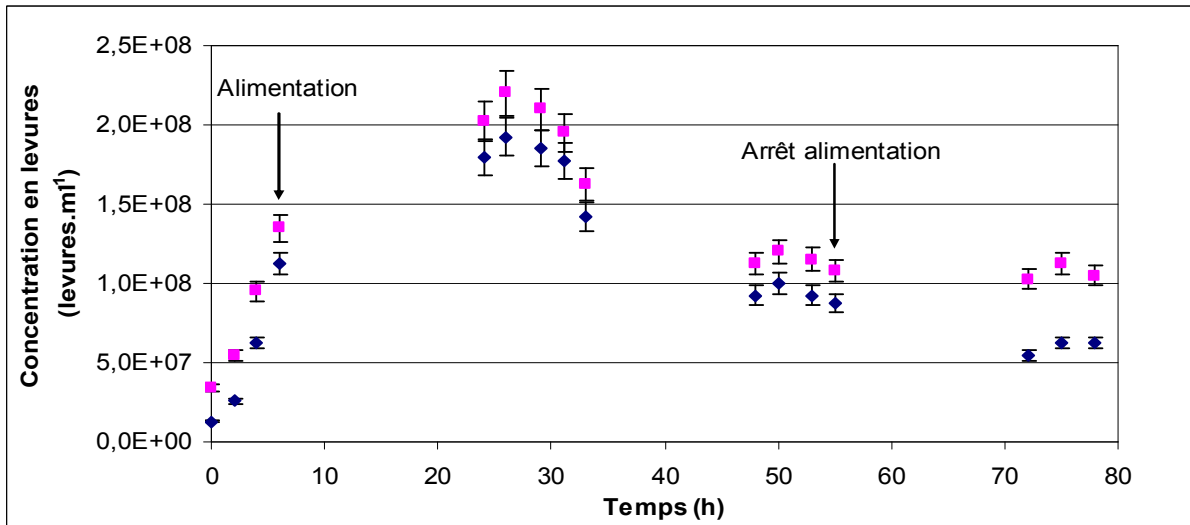


Figure 65: Suivi des concentrations cellulaires au cours du temps lors d'un fed-batch réalisé à 33°C. Les (◆) représentent les concentrations de cellules viables et les (■) représentent celles de cellules totales.

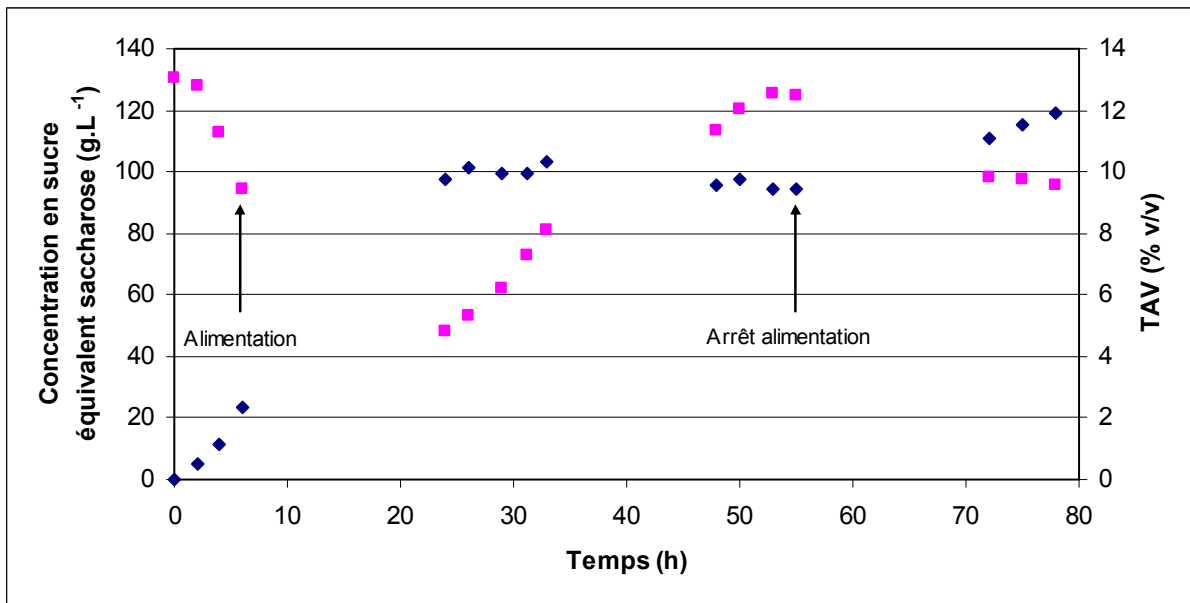


Figure 66: Suivis du TAV et de la concentration en sucres équivalent saccharose au cours du temps lors d'un fed-batch réalisé à 33°C. Les (◆) représentent le TAV et les (■) représentent la concentration en sucres équivalent saccharose.

Comme à 30°C, les graphiques 65 et 66 montrent que la population levurienne et le TAV augmentent en début de fermentation mais à 33°C cette augmentation dure moins longtemps. Après 18 h d'alimentation, la concentration en levure et en éthanol se stabilisent à respectivement environ  $2 \times 10^8$  levures.mL<sup>-1</sup> et 9,5% de TAV alors le sucre s'accumule encore plus que précédemment à 30 °C. Par la suite, les concentrations en levure et en éthanol diminuent jusqu'à l'arrêt de l'alimentation. Ceci montre qu'il y a une synergie entre les stress dus à la température et à la teneur en alcool. De plus, ici aussi l'alimentation a été inappropriée car le stress causé par le sucre a augmenté au cours de la fermentation.

Le tableau 38 présente les résultats obtenus pour les deux fermentations pour les temps clefs de la fermentation.



**Tableau 38 : Résultats obtenus pour les deux températures de fermentation en fed-batch pour les concentrations en levure, en éthanol et en sucre et les rendements observés.**

Phase	Temps (h)	Fed-batch 1 30°C				Fed-batch 2 33°C			
		Levures viables ( $10^7$ levures.mL <sup>-1</sup> )	TAV (%)	Sucre (g.L <sup>-1</sup> )	Rendement* (g <sub>éthanol</sub> .g <sub>sucrose</sub> <sup>-1</sup> )	Levures viables ( $10^7$ levures.mL <sup>-1</sup> )	TAV (%)	Sucre (g.L <sup>-1</sup> )	Rendement* (g <sub>éthanol</sub> .g <sub>sucrose</sub> <sup>-1</sup> )
Propagation	0	1,7	0,0	132	/	1,3	0,0	130	/
Début d'alimentation	6	5,5	1,7	95	0,363	11,3	2,3	95	0,512
Alimentation	30	20,0	10,4	67	0,439	18,5	9,9	65	0,413
Arrêt alimentation	54	16,5	11,1	102	0,448	9,3	9,4	125	0,426
Arrêt de la fermentation	78	13,1	13,4	62	0,444	6,3	11,9	95	0,458

\*Les rendements présentés dans le tableau ont été calculés entre le moment pris en compte et T0

Le tableau 38 montre que pour la phase de propagation, la température 33°C a été plus favorable pour les concentrations en levure et en éthanol ainsi que pour le rendement. Par la suite toutes les valeurs montrent que la température 30°C est la plus favorable. Ceci confirme qu'il y a une synergie inhibitrice entre plusieurs stress que subit la levure. Dans ce cas la sensibilité à l'éthanol est plus importante à 33°C qu'à 30°C.

Les résultats présentés ici montrent que la température de 33°C permet de diminuer la durée des phases de propagation sur moût léger. Cependant, il est préférable de réaliser le reste de la fermentation à 30°C afin de limiter le stress subi par la levure. Suite à ces résultats, la température appliquée pour les fermentations suivantes a toujours été de 30 °C.

Les fed-batch présentés ci-avant, montrent des performances fermentaires très nettement inférieures à celle observés lors des fermentations batch bi et tri-étagées. Le procédé a donc été revu avec une alimentation optimisée permettant d'équilibrer l'apport de sucre et sa consommation afin qu'il ne s'accumule pas.

### III.3.3.2. Fed-batch alimentation longue / débit variable

Les deux expériences en fed-batch précédentes montrent que la vitesse de consommation maximale en sucre a lieu en début de fermentation. Par la suite, les vitesses de consommation en sucre ont diminué. Le graphique 61 montre aussi que la vitesse de consommation de sucre diminue fortement après 30 h à environ 9% d'éthanol.

Les vitesses de consommation de sucre observées pour le fed-batch 1, présentées figure 67, ont été modélisées par un polynôme de degrés 3 de T0 à T29 et par une droite de T29 à T77. Les équations de ces modélisations sont représentées, respectivement par  $y_1$  et  $y_2$  sur le graphique 67 avec le nombre de chiffre significatif pris en compte.

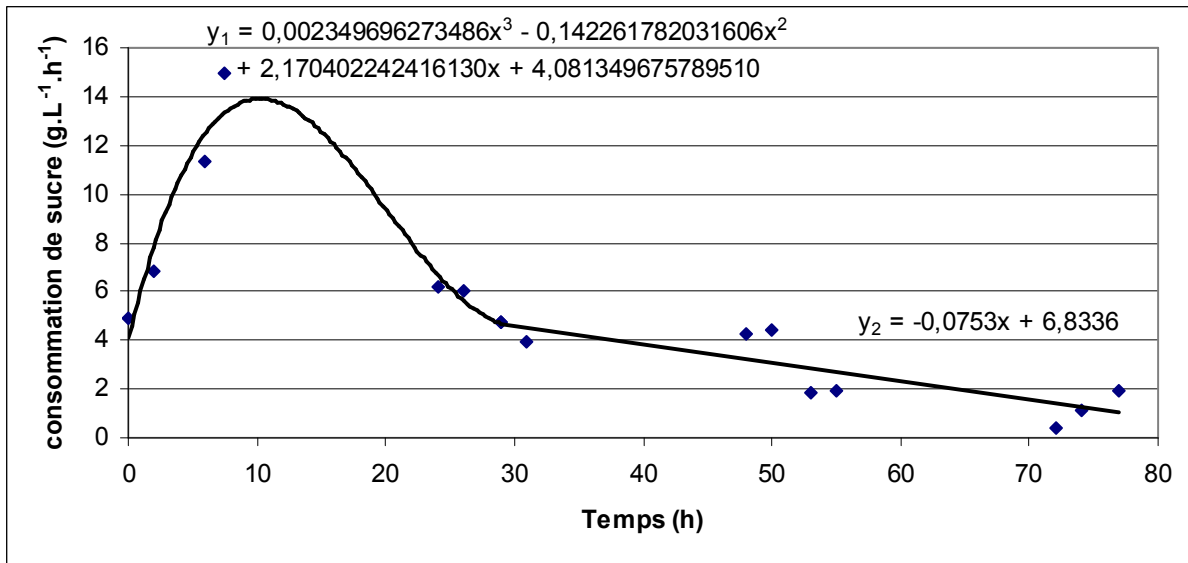


Figure 67: Evolution de la vitesse de consommation de sucre observée lors du fed-batch 1. Les points représentés à chaque temps  $t$  correspondent aux vitesses moyennes observées entre les mesure  $t$  et  $t+dt$ . L'équation  $y_1$  représente le polynôme utilisé pour modéliser la vitesse de consommation de sucre entre  $T_0$  et  $T_{29}$  et  $y_2$  pour celle observée entre  $T_{29}$  et  $T_{77}$ .

A partir de la modélisation réalisée figure 67, un profil de débit d'alimentation a été établi grâce à l'équation 17 dans le but d'équilibrer l'alimentation et la consommation de sucre :

$$D_{\Delta t} = (C_t \times V_t - C_{t+dt} \times V_t - v_t \times V_t \times \Delta t) / (C_{t+dt} \times \Delta t - C_{alim} \times \Delta t) \quad (\text{eq17})$$

Où  $D_{\Delta t}$  est le débit appliqué entre  $t$  et  $t+dt$ ,  $C_t$  est la concentration en sucre du réacteur au temps  $t$ ,  $V_t$  est le volume de milieu au temps  $t$ ,  $C_{t+dt}$  est la concentration de la cuve au temps  $t+dt$ ,  $v_t$  est la vitesse de consommation de sucre au temps  $t$  modélisée figure 67,  $\Delta t$  est l'intervalle de temps entre  $t$  et  $t+dt$  et  $C_{alim}$  est la concentration en sucre de l'alimentation.

La figure 68 montre le profil d'évolution du débit calculé à l'aide de l'équation 14 ainsi que les débits réellement appliqués lors de la réalisation de l'expérience. Comme le montre cette figure, l'alimentation de la cuve a été presque identique à la modélisation malgré une régulation manuelle d'une pompe non programmable. Cette figure montre que l'alimentation du réacteur est stoppée à  $T_{57}$  car la cuve était alors pleine.

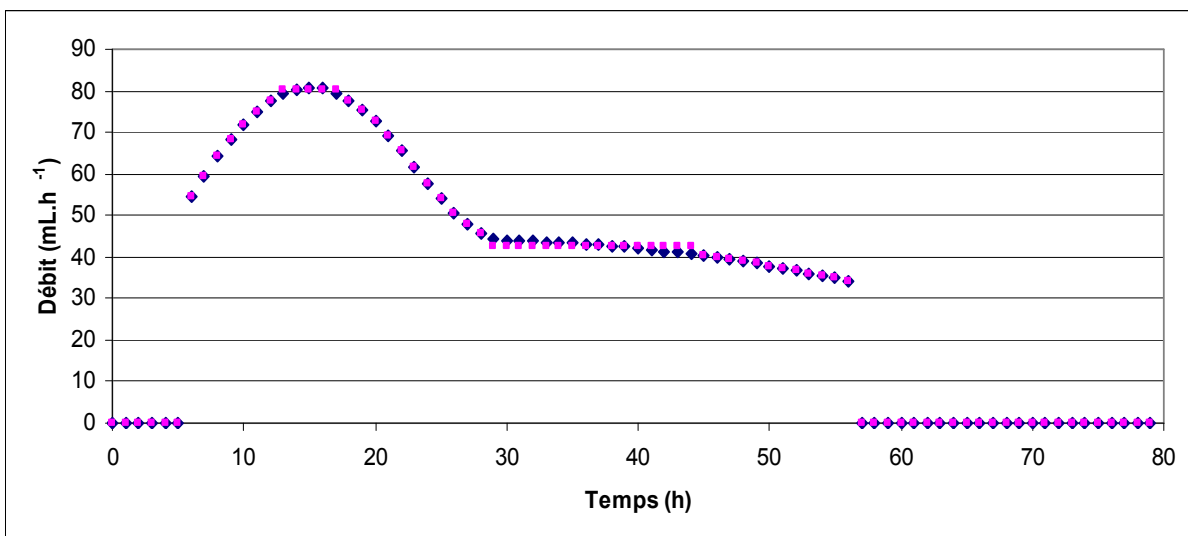


Figure 68: Evolution du débit d'alimentation de la cuve de fermentation. Les (♦) représentent les débits calculés et les (■) représentent les débits réellement appliqués lors de la réalisation de la fermentation.

L'expérience fed-batch 3 a été réalisée identiquement à la fermentation fed-batch 1 à l'exception du débit d'alimentation qui a été ici variable. La figure 69 montre que la biomasse a été stabilisée jusqu'à 48h puis qu'il y a eu une légère dilution de cette biomasse causée par l'augmentation du volume dans la cuve et une croissance cellulaire nulle. La concentration en cellules viables en fin de fermentation reste élevée.

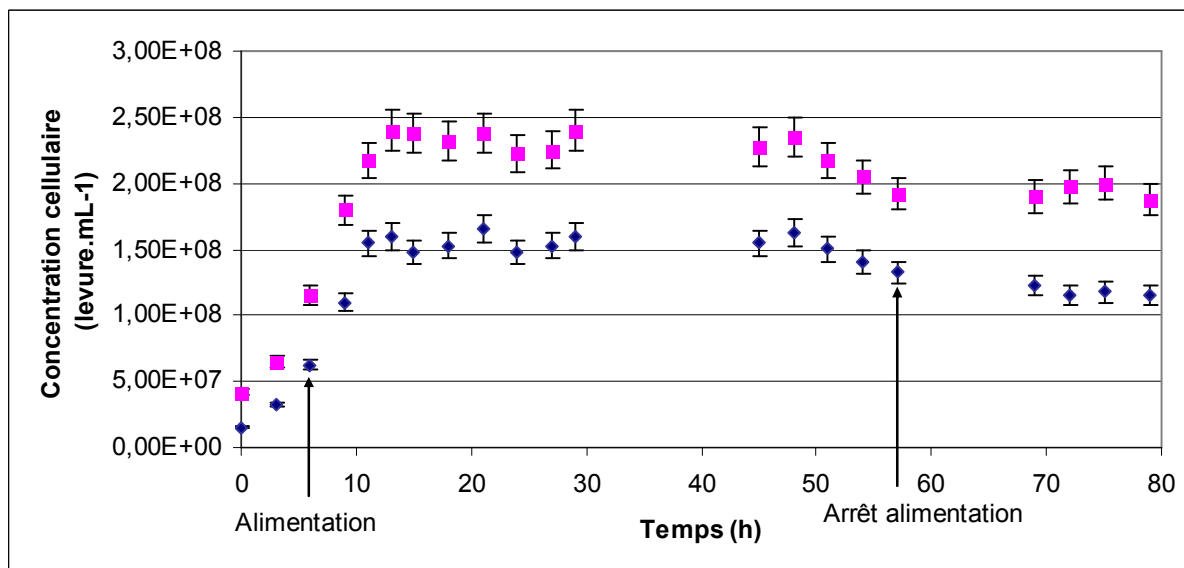


Figure 69: Suivi des concentrations cellulaires au cours du temps lors du fed-batch 3. Les (◆) représentent les concentrations de cellules viables et les (■) représentent celles de cellules totales.

La figure 70 montre que la concentration en sucre est relativement stable au cours de l'alimentation même si une lente diminution de cette concentration est observée en début de fermentation jusqu'à 48h, due à une consommation de sucre légèrement sous-estimée par la modélisation réalisée. Après 48h cette concentration augmente faiblement ce qui correspond à la dilution de la biomasse observée sur la figure 69.

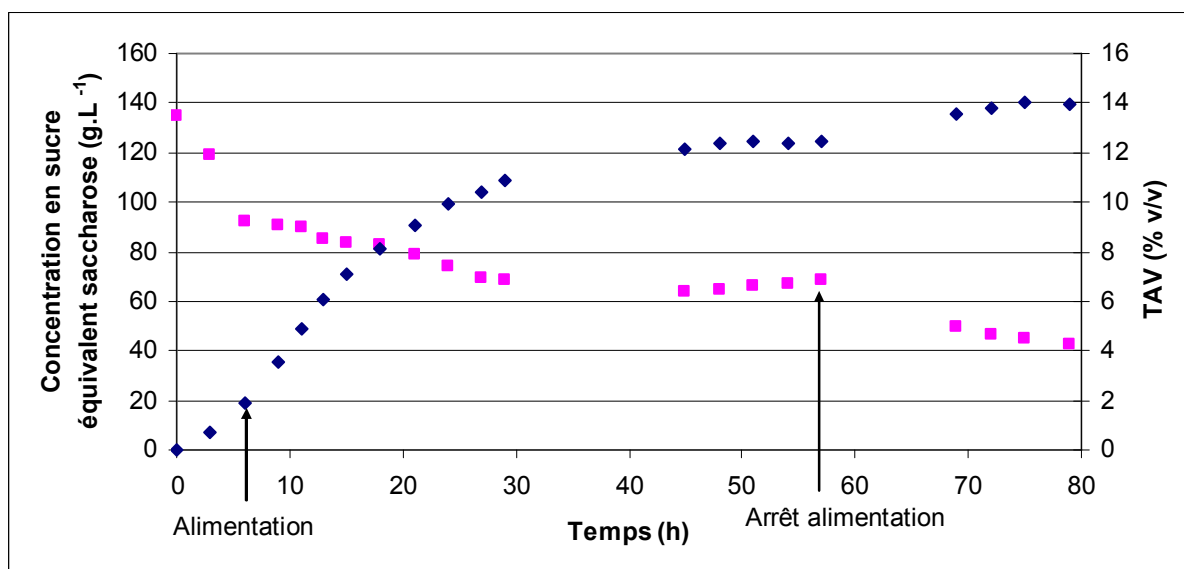


Figure 70: Suivis du TAV et de la concentration en sucres équivalent saccharose au cours du temps lors du fed-batch 3. Les (◆) représentent le TAV et les (■) représentent la concentration en sucres équivalent saccharose.

Le TAV final, de 14,0 % (v/v), est supérieur à ce qui a été observé en fed-batch dans des conditions proche (fed-batch 1 et 2) mais reste cependant inférieur à ce qui a été obtenu jusqu'à présent en multi-étagé. Une alimentation longue et un faible volume de propagation (un tiers du volume de cuve) ne semblent pas permettre l'obtention de TAV élevé en fed-batch.

S'il est connu que la concentration en éthanol dans le milieu de fermentation diminue la production de l'éthanol, il est possible de supposer que le temps d'exposition à l'éthanol a aussi une influence sur sa production. Afin de vérifier cette hypothèse, une autre méthode pour le fed-batch a été testée.

### III.3.3.3. Fed-batch alimentation courte / débit constant

Suite aux observations faites sur les différentes fermentations fed-batch précédentes, il a été décidé de réaliser un fed-batch avec une alimentation rapide suivie d'un temps de chute plus long, ceci afin de limiter l'effet de dilution de la biomasse dans le réacteur causé par l'inhibition de la croissance due à l'exposition de la biomasse à l'éthanol.

Il a donc été décidé de réaliser une phase de propagation dans un volume représentant deux tiers de la cuve durant 9 heures. En effet, d'après les résultats des fed-batch 30 et 33°C il s'agit de la durée minimale permettant d'obtenir la concentration cellulaire maximale.

Le milieu de propagation contenait  $160 \text{ g}_{\text{sucre équivalent saccharose}} \cdot \text{L}^{-1}$ , ceci a été imposé par la concentration en sucre du SBP. En effet, moins on met de sucre au début plus l'alimentation devra être concentrée. Pour cette expérience le SBP a été apporté avec une très faible dilution et avec ajout des différents compléments. Les différences avec le fed-batch 1 (méthode 1 30 °C) sont uniquement, le volume du milieu de propagation et les concentrations de ce milieu et du milieu d'alimentation.

L'expérience a été réalisée en trois phases :

- La première consistait en un batch de 9 h dans un volume de 2,66 L en moût léger composé de  $160 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de sucre équivalent saccharose.
- La seconde phase consistait en une alimentation du réacteur à un débit de  $55,5 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$  pendant 24h avec un moût lourd composé de  $580 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de sucre équivalent saccharose. Le moût lourd a été conservé sous agitation constante dans une cuve maintenue à 6°C.
- La dernière phase consistait en un temps de chute d'une durée de 48h afin d'épuiser au maximum les sucres.

Les graphiques 71 et 72 présentent les résultats obtenus pour le fed-batch à 30°C, pour respectivement les concentrations cellulaires et les concentrations en sucre et en éthanol.

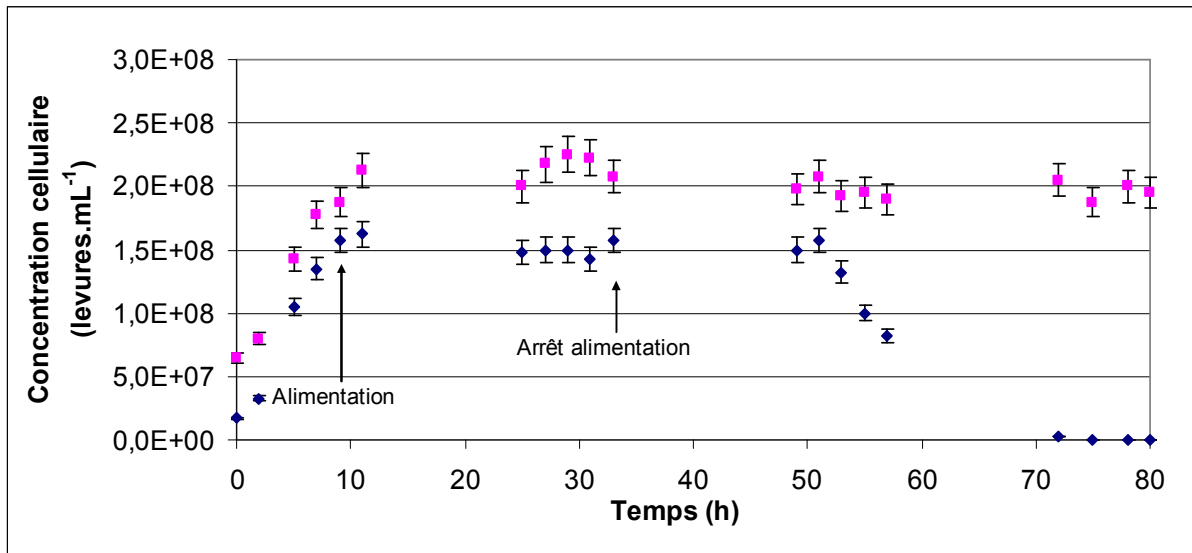


Figure 71: Suivi des concentrations cellulaires au cours du temps lors du fed-batch 4. Les (◆) représentent les concentrations de cellules viables et les (■) représentent celles de cellules totales.

La figure 71 montre que la population en cellules viables est, comme attendue, maximale 9 heures après inoculation. Celle-ci reste alors stable jusqu'à 50 heures après inoculation et aucun effet de dilution n'est observé après le début de l'alimentation ce qui répond bien au problème posé par les fed-batch précédents. Cependant, la viabilité diminue très rapidement à partir de 50 heures jusqu'à devenir nulle 78 heures après inoculation. Ce dernier point pose évidemment problème en cas de recyclage cellulaire en usine. Ce problème est inévitable lorsque des concentrations très élevées en éthanol sont atteintes et devra être considéré lors du choix du meilleur procédé de fermentation.

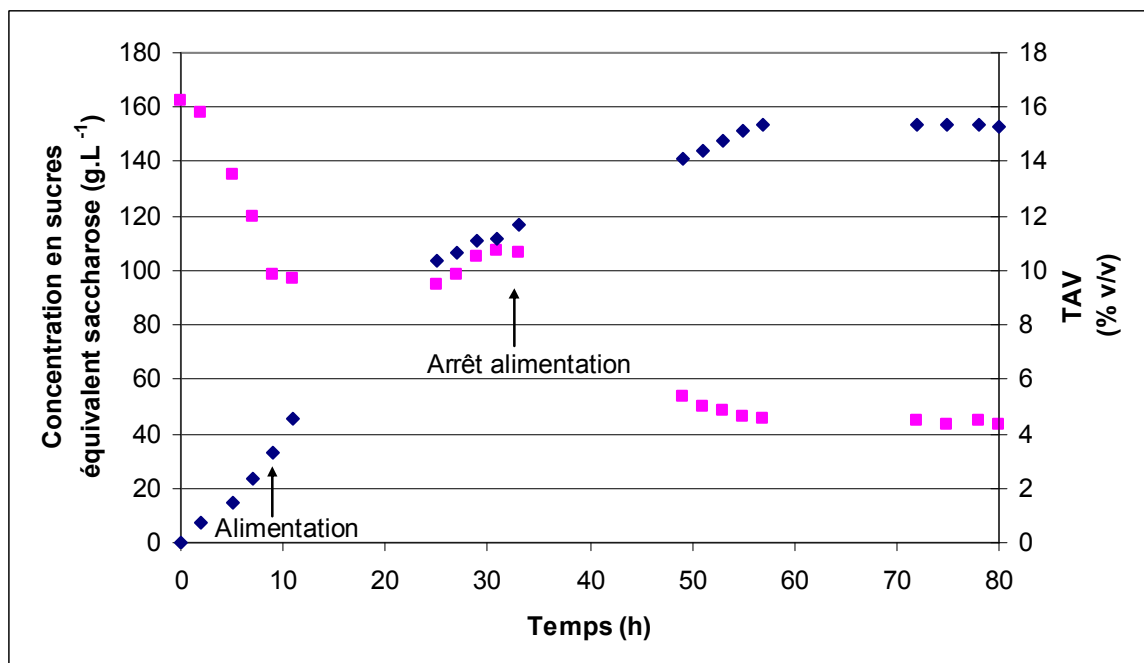


Figure 72: Suivis du TAV et de la concentration en sucres équivalent saccharose au cours du temps lors du fed-batch 4. Les (◆) représentent le TAV et les (■) représentent la concentration en sucres équivalent saccharose.

La figure 72 montre que l'alimentation n'a pas causé d'accumulation de sucre et a même permis une certaine stabilisation de la concentration au cours de l'alimentation. Le TAV, quant à lui, a augmenté très rapidement durant la première phase de batch comme observé lors des différents fed-batch et fermentations bi-étagées. Cependant ici, la productivité a été relativement constante entre 24 et 57 heures. Il n'y a pas eu dans ce cas de ralentissement de la productivité au cours du temps. Le TAV maximum de 15,4 % (v/v) est observé 57 heures après inoculation pour un rendement de  $0,477 \text{ g}_{\text{éthanol}} \cdot \text{g}_{\text{sucrose}}^{-1}$  et une productivité de  $2,127 \text{ g}_{\text{éthanol}} \cdot \text{h}^{-1}$ . Le rendement est proche des valeurs qui ont été observées lors des fermentations multi-étagées, la productivité quant à elle est augmentée de 50 %.

D'après les figures 71 et 72, la diminution de la viabilité, dans les conditions appliquées ici, est liée davantage au temps d'exposition à une fortes concentrations en éthanol qu'à la concentration en éthanol elle-même.

Le seul point négatif de cette expérience est la rapide diminution de la viabilité, qui soit empêcherait toute possibilité de recyclage cellulaire pour servir d'inoculum soit imposerait d'arrêter rapidement et au bon moment la fermentation.

### III.3.3.4. Bilan intermédiaire sur la recherche du type de fermentation le plus performant

Le graphique 73 résume les résultats obtenus avec les différents procédés testés lors de l'utilisation du milieu optimisé. La concentration finale en éthanol du fed-batch 4 étant la plus élevée et la durée de fermentation la plus courte, un dernier fed-batch a été réalisé dans des conditions similaires avec cependant un apport de sucre total inférieur. Ceci, afin d'obtenir en fin de fermentation moins de 2 grammes de sucre résiduel par litre, ce qui est imposé par les producteurs d'éthanol. La concentration en sucre résiduel observée pour le fed-batch 4 étant de  $45 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , la concentration totale en sucre pour réaliser ce fed-batch ne sera plus  $300 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  mais  $255 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ .

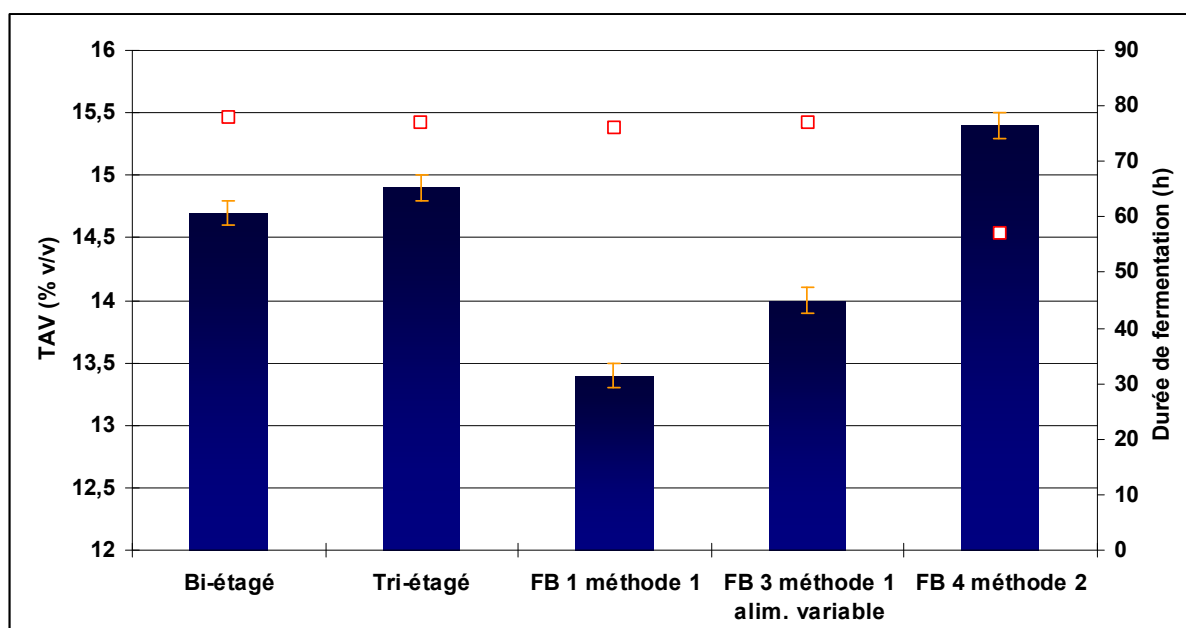


Figure 73: TAV obtenus en fin de fermentation et durée de fermentation pour les différents procédés testés à 30 °C. Les barres représentent les TAV et les  $\square$  représentent les durées de fermentation.

### III.3.3.5. Fed-batch alimentation courte épuisement des sucres

Le milieu et procédé utilisés pour le fed-batch 4 (méthode 2) a permis l'obtention du plus haut TAV depuis le début de la thèse tout en ayant une productivité élevée. Ce procédé a donc été utilisé pour réaliser la dernière expérience en vue de l'obtention à la fois du TAV le plus élevé et d'une concentration en sucre résiduel inférieur à  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ .

Il y avait trois possibilités pour diminuer la concentration finale en sucre tout en gardant une mise en œuvre proche :

- Diminution de la concentration en sucre du milieu de propagation
- Diminution de la concentration d'alimentation
- Diminution de la durée d'alimentation

Dans l'objectif d'une application directe de ces travaux, la diminution de la durée d'alimentation a été choisie. En effet, ce choix permet de remplir les cuves le plus vite et d'avoir la quantité de biomasse la plus élevée dès le début de la fermentation sans impliquer de dilution du SBP ou éventuellement du jus vert. La fermentation pourrait donc être réalisée durant la campagne betteravière en jus vert pour la phase de propagation et avec ajout de SBP directement dans la cuve une fois que la concentration en levure est maximale. Il s'agit donc ici du procédé le plus simple et facile à mettre en œuvre en industrie.

La diminution de la durée d'alimentation (débit de 55,5 mL.h<sup>-1</sup> conservé) entraîne de fait l'augmentation du volume de la phase de propagation.

Cette fermentation a été réalisée, comme les autres fed-batch, dans un réacteur d'une capacité de 4L (LH Inceltech Series 210) sous une agitation de 150 rpm et avec une aération de 1 vvh. L'expérience a été découpée en trois phases :

- La première a consisté en un batch de 9 h dans un volume de 3,08 L en moût léger composé de 160 g.L<sup>-1</sup> de sucre équivalent saccharose, 151 mg.L<sup>-1</sup> de phosphore ajouté, 31 mg.L<sup>-1</sup> d'azote ajouté, 1g.L<sup>-1</sup> d'extraits de levure, 120 ppm de magnésium et de 50 µL.L<sup>-1</sup> d'antimousse Ouvre 922k. Des vinasses ont été utilisées pour réaliser la dilution du SBP, celles-ci représentaient 30% du volume de dilution. L'inoculation a été réalisée avec la souche C10 à un taux de 10<sup>7</sup> levures viables.mL<sup>-1</sup> à partir d'une préculture en milieu YEPD incubée à 30°C.
- La seconde phase a consisté en une alimentation du réacteur à un débit de 55,5 mL.h<sup>-1</sup> pendant 16,6 h avec du SBP contenant 580 g.L<sup>-1</sup> de sucre équivalent saccharose, 151 mg.L<sup>-1</sup> de phosphore ajouté, 31 mg.L<sup>-1</sup> d'azote ajouté, 1g.L<sup>-1</sup> d'extraits de levure, 120 ppm de magnésium et de 50 µL.L<sup>-1</sup> d'antimousse Ouvre 922k. Ce moût lourd a été conservé sous agitation constante dans une cuve maintenue à 6°C.
- La dernière phase a consisté en un temps de chute d'une durée de 27,4 h afin d'épuiser la totalité des sucres.

La figure 74 montre l'évolution de la concentration cellulaire au cours du temps. Cette évolution est identique à celle observée pour le fed-batch 4. Cependant, la chute de viabilité en fin de fermentation est moins rapide dans le cas présent grâce à temps d'exposition à de fortes concentrations en éthanol plus court. Néanmoins, cette diminution impose, en cas de recyclage cellulaire, un traitement rapide des levures en fin de fermentation.

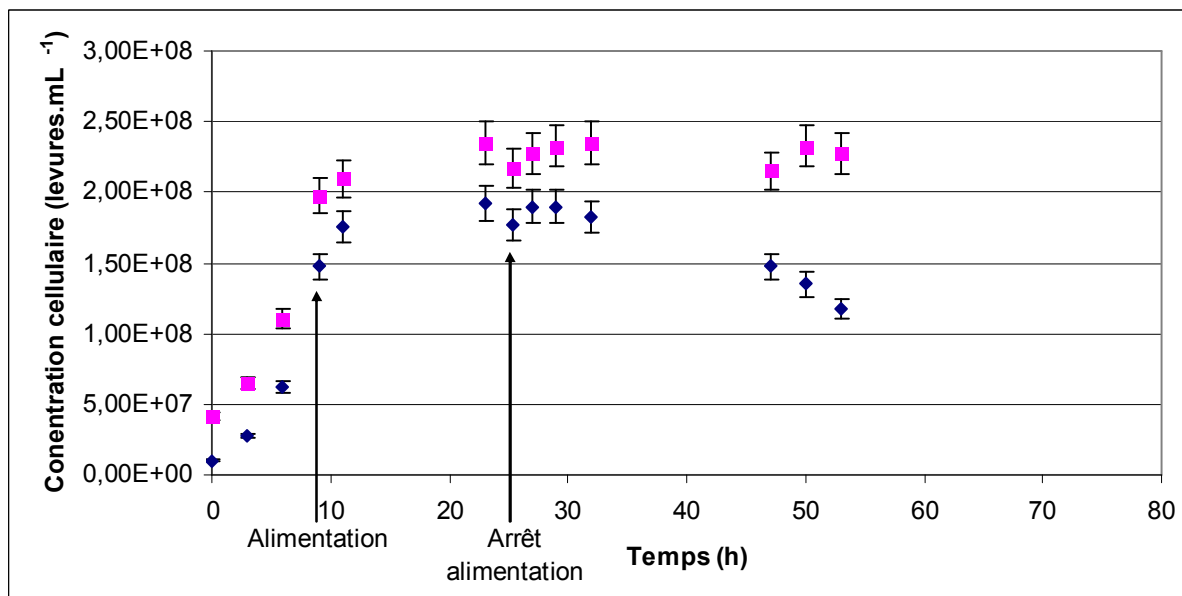


Figure 74: Suivi des concentrations cellulaires au cours du temps lors fed-batch 5. Les (◆) représentent les concentrations de cellules viables et les (■) représentent celles de cellules totales.

La figure 75 présente les évolutions du TAV et de la concentration en sucre dans le milieu de fermentation. Ce graphique montre qu'il y a eu un temps de latence de 2 heures et que la production d'éthanol durant la phase de propagation a été plus faible, 1,3 % contre 3,3 % (v/v), que pour le fed-batch 4. Cela s'explique par une différence de concentration à l'inoculation d'un facteur 2. Le fed-batch 4 a été inoculé à un taux de  $1,7 \times 10^7$  levures viables.mL<sup>-1</sup> contre  $0,9 \times 10^7$  levures viables.mL<sup>-1</sup> pour le fed-batch 5, soit moitié moins. Ce retard a été comblé par une productivité plus élevée pour le fed-batch 5, car à T29 les TAV des deux fermentations étaient de 11 % (v/v).

Comme pour le fed-batch 4, la productivité est constante jusqu'à la fin de la fermentation ceci s'explique par une bonne gestion de l'apport des nutriments, ce qui augmente la résistance de la levure au stress et lui permet d'exprimer entièrement son potentiel fermentaire dans les conditions appliquées.

Contrairement à la fermentation fed-batch 4, il n'y a pas de stabilisation de la concentration de sucre mais une diminution. En effet, si le débit et la concentration de l'alimentation sont les mêmes, l'augmentation du volume de propagation entraîne une plus forte dilution de l'alimentation.



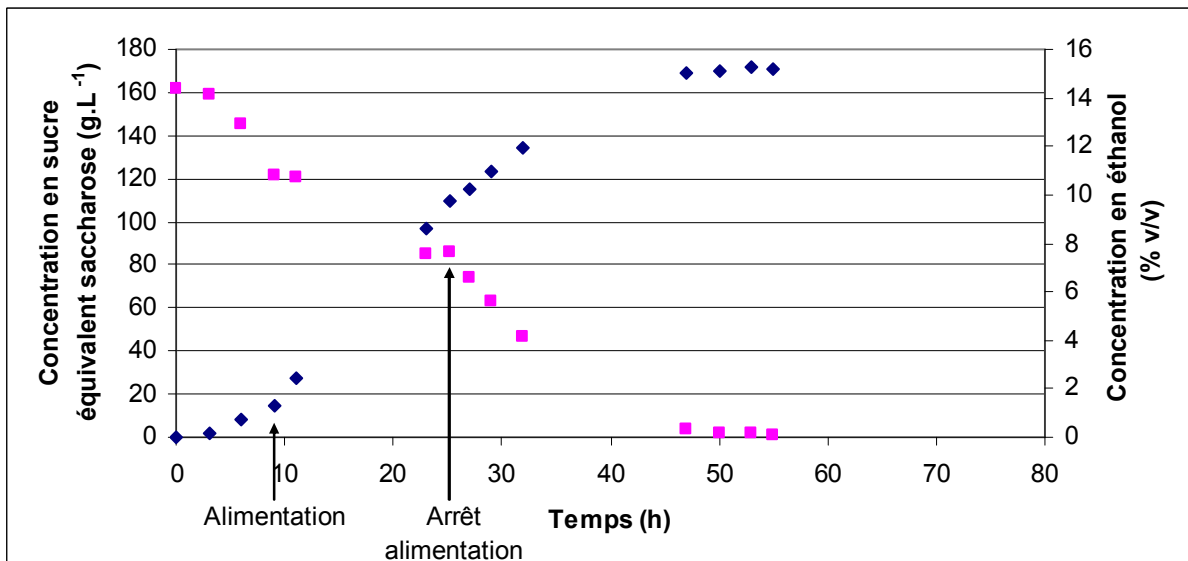


Figure 75: Suivis du TAV et de la concentration en sucres équivalent saccharose au cours du temps lors du fed-batch 5. Les (◆) représentent le TAV et les (■) représentent la concentration en sucres équivalent saccharose.

La fermentation Fed-batch 5 a permis d'obtenir une concentration en éthanol de 15,2 % (v/v) avec une concentration en sucre résiduel de 1 g.L<sup>-1</sup> et ce avec la durée totale de fermentation la plus courte observée durant ces travaux de thèse. De plus, cette fermentation utilise un procédé facilement applicable dans les ateliers de production. Cette durée de fermentation pourrait être portée à 48 h si la phase de propagation présente les mêmes caractéristiques que celle observée au cours du fed-batch 4.

Des analyses ont été réalisées par l'UNGDA afin de doser les acides organiques et les alcools supérieurs en fin de fermentation pour le fed-batch 5. Ces résultats ont essentiellement pour but de communiquer auprès des industriels partenaires, la composition possible du vin obtenu avant distillation avec ce procédé afin qu'ils puissent évaluer son impact sur leur production d'éthanol. Le tableau 39 présente les résultats des dosages ainsi que l'estimation faite de la production de chaque composé en cours de fermentation, car certains composés ont été apportés par le SBP (annexe 4). De plus les vinasses utilisées pour diluer le SBP contenaient 10 g.L<sup>-1</sup> d'acide lactique et 10 g.L<sup>-1</sup> de glycérol (uniques résultats au dessus des seuils de détection).

La production d'acide lactique, tableau 39, semble indiquer que le SBP a subi des contaminations lors de sa production même s'il n'y a pas eu d'observations directs confirmant cela. Les résultats montrent que par litre d'éthanol produit il y a eu 79 g (63 mL) de glycérol, 0,9 g (0,7 mL) d'acétaldéhyde, 0,14 g (0,13 mL) d'acétate d'éthyle et 2,5 g (3,1 mL) d'alcools supérieurs produits.

En fin de fermentation l'éthanol contenait 58 % (m/m) du carbone, l'acide lactique 2 %, le glycérol 4 %, l'acétaldéhyde 0,07 %, l'acétate d'éthyle 0,01 % et les alcools supérieurs 0,23 %.

**Tableau 39: Résultats des dosages effectués par l'UNGDA sur le vin en fin de fermentation pour le fed-batch 5. Les notations < indiquent que les concentrations des composés concernés sont inférieures au seuil de détection. Les résultats sont présentés dans ce tableau tel qu'ils ont été fournis par l'UNGDA. La colonne production indique les concentrations estimées des composés produits en cours de fermentation.**

Analyses	Unité	Résultat des dosages	Production (estimées)
Acide Lactique	g.kg <sup>-1</sup>	8	6
Acide acétique	g.kg <sup>-1</sup>	<1	<1
Glycérol	g.L <sup>-1</sup>	14	12
Acétaldéhyde	mg.L <sup>-1</sup>	142	137
Acétal	mg.L <sup>-1</sup>	<10	<10
Acétate d'éthyle	mg.L <sup>-1</sup>	22	22
Méthanol	mg.L <sup>-1</sup>	<10	<10
Propanol-1	mg.L <sup>-1</sup>	45	45
Isobutanol	mg.L <sup>-1</sup>	83	83
Butanol-1	mg.L <sup>-1</sup>	<5	<5
Butanol-2	mg.L <sup>-1</sup>	<5	<5
Méthyl-2 butanol-1	mg.L <sup>-1</sup>	69	69
Méthyl-3 butanol-1	mg.L <sup>-1</sup>	183	183



# **Chapitre IV :**

# **Conclusions**

## IV. Conclusions et perspectives

### IV.1. Conclusion Générale

L'objectif de ces travaux de thèse était d'identifier les paramètres permettant d'augmenter la concentration finale des vins en éthanol et ce, pour une application directe en industrie sans nécessiter d'investissement dans les ateliers de production. Pour ce faire, il a fallu augmenter la concentration en sucre des milieux de fermentation. En effet, les milieux actuellement utilisés contiennent moins de  $190 \text{ g}_{\text{sucre}} \cdot \text{L}^{-1}$  et ne permettent pas de produire de vins contenant plus 12,5 % (v/v) d'éthanol. La fermentation à haute densité a donc été un choix qui s'est imposé de lui-même. Cependant, ce type de fermentation est très stressante pour *Saccharomyces cerevisiae*.

Il a rapidement été établi que ces travaux ne pouvaient pas être exhaustifs, à cause des nombreux paramètres à prendre en compte, leurs interactions éventuelles, ainsi que le temps imparti pour les effectuer. Il a donc fallu faire des choix afin d'obtenir, à l'issue de ces recherches, une solution à proposer aux ateliers de production pour augmenter la teneur en éthanol en fin de fermentation. C'est pourquoi la stratégie mise en œuvre a porté, dans un premier temps, sur la composition du milieu de production, afin d'augmenter la résistance de la levure à de fortes concentration en éthanol et en sucre, puis par la suite sur le procédé de fermentation, afin de limiter au maximum les stress subis par la levure.

La première partie des travaux réalisés sur la composition du milieu de fermentation ont été effectués en regroupant les tests par type de composés ainsi que par leurs impacts supposés sur l'amélioration des conditions de culture. Afin de réaliser ces tests dans un milieu contenant les éléments principaux et essentiels pour la croissance des levures, que sont les atomes C, H, O, N et P, un plan d'expériences a été réalisé. Ce plan a montré que les concentrations optimales étaient :  $31 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  d'azote ajouté,  $151 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de phosphore ajouté et  $220 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de sucre initial (soit une concentration totale en azote assimilable de  $190 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Par la suite, le milieu utilisé pour la suite des expériences était composé des concentrations en azote et phosphore optimisées mais la concentration en sucre a été augmentée à  $300 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  afin de ne pas être limitant en sucre et de mettre plus facilement en évidence les effets des paramètres testés (soit une concentration totale en azote assimilable de  $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ).

Les contributions à l'amélioration des conditions de culture, et donc à l'augmentation de la concentration finale en éthanol, de chaque composé ont été testées individuellement dans ce milieu. Tous les résultats obtenus ont été comparés à un milieu standard qui était de composition identique et réalisé simultanément mais sans ajout de complément. En effet, si les résultats des fermentations effectuées en erlenmeyer sont parfois variables entre les différentes séries d'expériences, ils sont très reproductibles à l'intérieur d'une même série. Il est ressorti de ces expériences que :

- Parmi les ions testés, le magnésium à  $120 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  était le seul à améliorer la concentration finale en éthanol. Le fer, bien qu'ayant montré un intérêt pour la production d'éthanol, entraîne probablement la formation de vivianite et rend ainsi inaccessible pour la levure à la fois le fer et le phosphore. Le fer n'a donc pas été retenu pour la composition des milieux de fermentation.
- La souche C10 est, dans les conditions appliquées ici, la plus performante, même si la souche Hirondelle bleue a fourni des résultats relativement proches. Ces deux souches sont les plus couramment utilisées en industrie. Ces résultats confirment donc que les habitudes des ateliers de production en terme de souche peuvent être gardées en milieu à haute densité. Les expériences menées sur l'ensemble des souches testées ont aussi montré que même si celles-ci sont recommandées pour une fermentation haute densité, elles se doivent d'être testées en laboratoire avant leur utilisation en atelier de fermentation car des différences importantes ont été constatées entre les résultats annoncés par le fabricant et ceux obtenus lors des expérimentations.
- La concentration d'inoculum optimale était d'environ  $10^7 \text{ levures} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Cette concentration concerne les cellules viables et non pas les cellules totales. Il a été montré que des concentrations inférieures à celle-ci entraînent un temps de latence en début de fermentation. Des concentrations en levures supérieures ont, quant à elles, eu pour effet de diminuer la durée de fermentation mais elles ont augmenté les besoins de maintenance et diminué de fait les rendements de conversion éthanol/sucre. De plus, des concentrations élevées en

inoculum, par exemple  $10^8$  levures viables.mL<sup>-1</sup>, sont difficilement atteignables en industrie. En effet, si l'inoculation se fait par cuve mère, il faut un volume de cuve mère pour deux volumes de cuve de fermentation et si l'inoculation se fait par recyclage cellulaire, il est impossible d'atteindre une telle concentration cellulaire car la viabilité des levures est très faible en fin de fermentation, surtout en milieu à haute densité. De plus le lavage à l'acide des levures diminue encore la quantité de cellules viables de l'inoculum.

- Deux composés dit « complexes » ont montré un intérêt pour le but visé : un complément commercial à 1,5 g.L<sup>-1</sup>, soit 10 fois la dose prescrite, et des extraits de levure. Les extraits de levure à 1 g.L<sup>-1</sup> ont été préférés car, d'une part, ils ont présenté de meilleurs résultats sur l'amélioration de la concentration finale en éthanol, et d'autre part il est possible de les produire directement sur site à partir des levures produites. Les tests réalisés sur les composés complexes ont montré que les composés commerciaux, même s'ils ont été conçus pour les milieux betteraviers, n'ont pas forcément d'intérêt ou sont sous-dosés. A l'instar des souches de levure, il est préférable de les tester en laboratoire dans des conditions le plus proche possibles des conditions réelles.
- Le milieu défini MS300, comportant l'ensemble des acides aminés, des vitamines, des sels et facteurs anaérobies de *Saccharomyces cerevisiae*, n'a montré aucun intérêt pour la production d'éthanol à partir de substrat betteravier en milieu haute densité. Ceci illustre l'impossibilité de transposer les résultats obtenus pour une souche, un milieu et des conditions donnés à d'autres fermentations.
- Les huiles végétales peuvent, pour celles testées, toutes jouer le rôle d'antimousse ce qui a, en erlenmeyer, un impact positif sur la production de l'éthanol grâce à une meilleure diffusion de l'oxygène dans le milieu. Le point majeur des tests sur les huiles a été qu'un antimousse, actuellement utilisé en industrie, a le meilleur impact sur la fermentation de par son rôle d'antimousse mais aussi par sa composition, et ce à la concentration de 50 µL.L<sup>-1</sup> soit environ la concentration rencontrée en industrie. Comme pour la souche de levure, ces résultats confirment que les habitudes des ateliers de production en terme d'antimousse peuvent être gardées en milieu à haute densité.
- Comme attendu, les vinasses n'apportent aucune amélioration au milieu de culture. Cependant, il a été démontré que dans les conditions appliquées ici elles pouvaient être utilisées pour diluer le SBP pour la réalisation des milieux à hauteur de 30 % (v/v) du volume de dilution. Ceci permet évidemment de diminuer les besoins en eau mais aussi de limiter la quantité de déchet à traiter.

En parallèle de ces travaux, il a été étudié l'apport d'oxygène, d'azote et de phosphore uniquement durant la phase de propagation ou aux différentes étapes de la fermentation. Ces tests ont été menés afin de pouvoir déterminer si les besoins en nutriments se limitaient uniquement à la phase de croissance et ainsi choisir le mode de conduite de la fermentation. Les résultats ont montré une très nette amélioration de la concentration finale en éthanol lorsque les nutriments ont été apportés à chaque étape de la fermentation. Ceci indique très clairement que la levure utilisée nécessite des nutriments pour le maintien de ses performances fermentaires.

Les fermentations en batch ne sont donc pas les plus propices à l'obtention de vin à haute teneur en éthanol et c'est donc pour cela que seul restent les procédés multi-étagés, fed-batch et continus. Ce dernier n'a pas été retenu car les fortes concentrations en éthanol ne permettent pas la croissance cellulaire ce qui entraîne le lessivage du réacteur.

La seconde partie de ces travaux a consisté en l'étude de différentes conduites de fermentations. Les résultats précédents ayant démontré l'intérêt de certains composés, ils ont tous été utilisés simultanément pour la réalisation des milieux lors des tests sur les procédés de fermentation. Les différents milieux de fermentation utilisés pour cette partie ont tous été supplémentés avec 31 mg.L<sup>-1</sup> d'azote, 151 mg.L<sup>-1</sup> de phosphore, 120 mg.L<sup>-1</sup> de magnésium, 1 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure, 50 µL.L<sup>-1</sup> d'antimousse et la souche C10 inoculée à  $10^7$  levures viables.mL<sup>-1</sup>. L'oxygène a été apporté tout au long de la fermentation avec un débit de 1 vvh. La concentration totale en sucre été de 300 g.L<sup>-1</sup> mais cette concentration a été répartie entre les étapes des fermentations. Afin d'être le plus proche possible des conditions industrielles, les vinasses ont aussi été utilisées pour réaliser la dilution du SBP à hauteur de 30 % (v/v) du volume de dilution.

Les fermentations réalisées en batch multi-étagé, même si elles n'ont pas été les plus performantes et n'ont donc pas été retenues pour l'optimisation finale, ont néanmoins présenté des résultats intéressants de par leur concentration finale en éthanol et leur possible transposition en milieu industriel. Les fermentations batch multi-étagées ont aussi montré que l'augmentation du nombre d'étages permettait d'augmenter la concentration finale en éthanol. Ceci s'explique par une diminution des stress causés par l'exposition à de fortes concentrations en sucre, puisque celui-ci est réparti dans les étages, et par un apport plus régulier en nutriments.

Pour l'étude du procédé fed-batch, deux méthodes ont été utilisées : une dérivée de ce qui se fait actuellement en industrie, et une permettant d'atteindre en phase de propagation la concentration maximale en biomasse suivi d'une alimentation avec du SBP légèrement dilué. La première méthode a été utilisée pour démontrer que la température de 33 °C permettait un développement plus rapide de la biomasse en phase de propagation. Toutefois, pour atteindre des concentrations élevées en éthanol il est préférable de réaliser la phase de production à 30 °C afin de ne pas ajouter un stress causé par la température au stress provoqué par une forte teneur en éthanol. Cependant, les résultats obtenus avec cette première méthode ont été décevants même lorsque l'alimentation a été optimisée pour maintenir l'apport de sucre égal à sa consommation durant la phase d'alimentation.

La seconde méthode appliquée a présenté les meilleurs résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse, à la fois en termes de concentration finale en éthanol, de rendement et de durée de fermentation. Cette fermentation a donc été reproduite avec une concentration totale en sucre inférieure afin d'obtenir moins de 2 g.L<sup>-1</sup> de sucre résiduel, et de respecter les demandes des ateliers de production. Cette dernière fermentation consistait en 9 heures de propagation en milieu à 160 g.L<sup>-1</sup> de sucre dans un volume représentant 77 % du volume de cuve et une alimentation constante durant 16,6 h avec du SBP. Sur l'ensemble de la fermentation, 255 g.L<sup>-1</sup> de sucre ont été fermentés et ont permis de produire 15,2 % (v/v) d'éthanol avec une productivité de 2,31 g<sub>éthanol</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> et un rendement de 0,471 g<sub>éthanol</sub>.g<sub>sucré</sub><sup>-1</sup>. Ces performances, déjà très bonnes, sont encore améliorables en réalisant l'inoculation du milieu de propagation à un taux légèrement plus élevé que ce qui a été fait et en effectuant cette phase, et uniquement cette phase, à 33 °C.

Par rapport à des vins contenant de 10 à 12 % (v/v) d'éthanol en fin de fermentation, ces résultats pourraient permettre d'économiser par litre d'éthanol pur, entre 18 et 30 % d'énergie pour la distillation, entre 35 et 49 % d'eau pour la réalisation des milieux de fermentation à partir de SBP et de diminuer de 23 à 38 % le volume de déchet produit après distillation.

Une autre conséquence découlant de cette dernière fermentation, est la limitation du problème lié aux contaminations. En effet, si ce problème n'a pas été étudié au cours de ces travaux, les résultats aboutissent à un type de fermentation permettant d'obtenir plus de 15 % (v/v) d'éthanol, ce qui permet de fortement limiter le développement des contaminants qu'il s'agisse de bactérie ou de levure. De plus, même en cas de présence de contaminant produisant des acides organiques, comme l'acide lactique ou acétique, les pH obtenus au cours de cette fermentation varient entre 4,7 et 5,1, ce qui engendre la dissociation de la majorité des acides organiques dans le milieu, limitant leurs diffusions à travers la membrane plasmique des levures ce qui diminue leurs impacts sur la levure.

Si ces travaux ont montré comment obtenir des concentrations plus élevées en éthanol, ils nécessitent encore certaines études avant d'être transposés dans les ateliers de production :

- Déterminer comment produire les extraits de levure directement dans les ateliers de production. Ce produit étant onéreux, il serait préférable de le produire directement sur site puisque la matière première y est disponible.
- Mesurer l'impact économique que pourrait avoir le procédé proposé sur les ateliers de production. En effet, si des économies significatives peuvent être réalisées pour toutes les raisons précitées, la durée des fermentations sera augmentée, ce qui entraînerait la diminution de la productivité journalière d'éthanol de 25 à 45 %.
- Suivre l'évolution de la population levurienne au cours de temps dans les ateliers de production. En effet, l'ensemencement des cuves s'effectue de une à deux fois par an, il est donc possible qu'il y ait des changements entre les levures inoculées et les levures présentes plusieurs mois après, suite à des mutations ou à l'implantation d'une souche indigène. Des prélèvements avaient été effectués au cours de ces travaux de thèse. Suite à des problèmes

de conservation, ils n'ont pas permis de définir si oui et au bout de quelle durée la population a changé. Les résultats concernant ce problème pourraient permettre de définir quand ré-inoculer les milieux avec la souche utilisée afin de garder des performances fermentaires optimales.

- Réaliser, en ateliers de production, des essais portant sur l'augmentation progressive de la concentration en sucre sur l'ensemble de la fermentation et évaluer l'impact sur la viabilité cellulaire en cas de recyclage de la biomasse.
- Évaluer la possibilité de réaliser la phase de propagation en jus vert pour l'application de ce procédé durant la campagne. En effet, le procédé proposé a été mis au point pour une modularité et une utilisation la plus simple possible en atelier. Cependant, l'utilisation de jus vert n'a pas été testée, or ce substrat est couramment utilisé pour la production d'éthanol durant la campagne betteravière.

## IV.2. Proposition d'application à un atelier de production

Ce travail n'a certes pas été exhaustif sur les effets des différents paramètres testés, mais il permet cependant de proposer un procédé permettant d'améliorer le bilan environnemental et potentiellement économique de la production d'éthanol à partir de substrat betteravier. Le procédé décrit précédemment est facilement applicable dans les ateliers utilisant un procédé fed-batch. Il suffirait donc uniquement de modifier les volumes, débit et concentrations des milieux.

Pour les sites fonctionnant avec des procédés de type continu multi-étagé, le problème est différent car ces usines ont été conçues pour les procédés qui y sont mis en œuvre. L'application du procédé proposé nécessiterait donc des modifications des ateliers de production. En effet, pour la réalisation du procédé fed-batch proposé, il est impératif de disposer d'un temps de chute en batch afin de ne pas lessiver la biomasse et donc diminuer la production d'éthanol. Les cuves ne pourraient donc plus être alimentées en continu mais uniquement de façon séquentielle.

Une partie des cuves permettrait de réaliser la préculture en moût léger, une autre partie serait en phase de remplissage correspondant à la phase d'alimentation du fed-batch pendant que la troisième partie des cuves seraient utilisées pour réaliser la fin de la fermentation appelée « temps de chute » après lequel le contenu de la cuve serait orienté vers la colonne de distillation. Puis la cuve utilisée jusque là pour la préculture serait alors alimentée pendant que la cuve qui était alimentée serait en phase de temps de chute et la cuve qui était en phase de temps de chute serait orientée vers la colonne à distiller. Les fermentations continueraient ainsi de manière cyclique. Le figure 76 présente un exemple de schéma de fonctionnement séquentiel, pour le site N°1 fonctionnant avec un procédé continu multi-étagé. La figure 77 montre l'état de la cuverrie à l'issue de la première rotation de séquence. Ces deux schémas présentent l'utilisation des cuves à un temps donné, les séquences 1, 2 et 3 correspondent à la phase dans laquelle serait un tiers de la cuverrie.



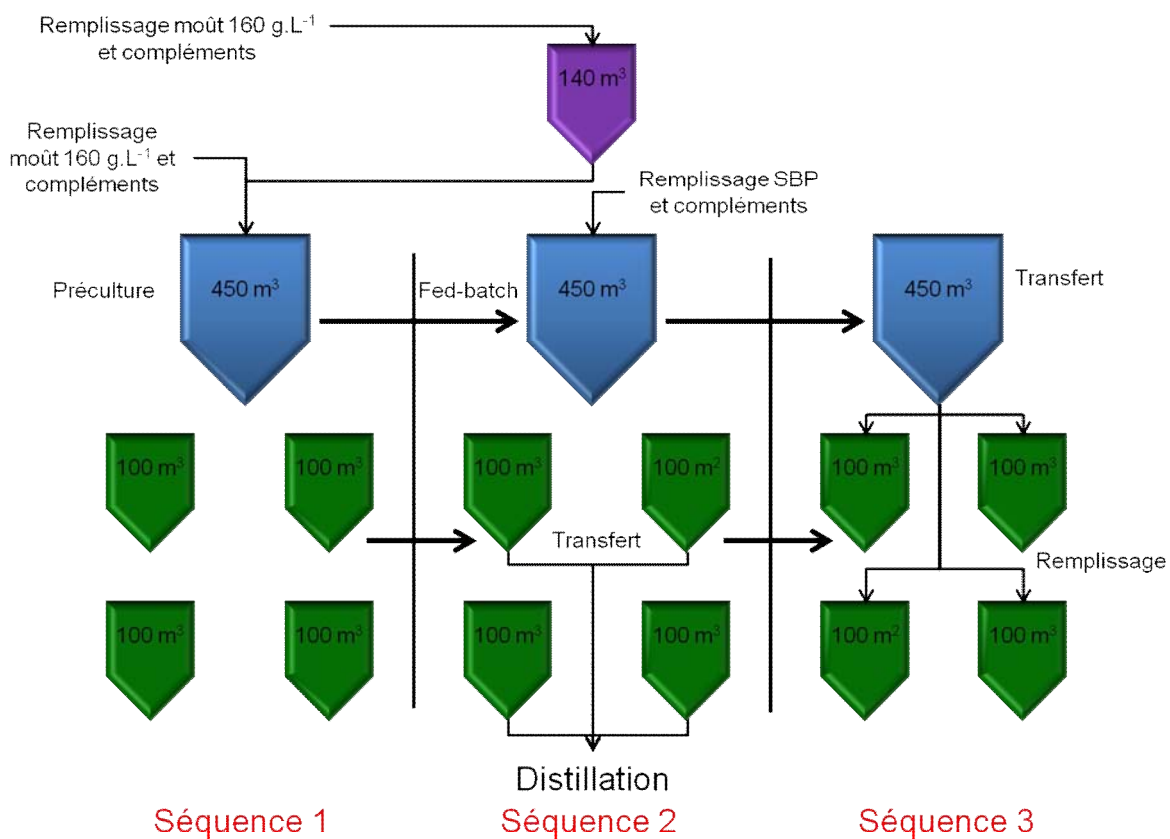


Figure 76: Exemple de schéma de principe pour l'utilisation du procédé proposé. Le schéma présente l'état dans lequel serait l'ensemble de la cuverie à un moment donné. Les flèches horizontales indiquent le sens de changement de séquence.

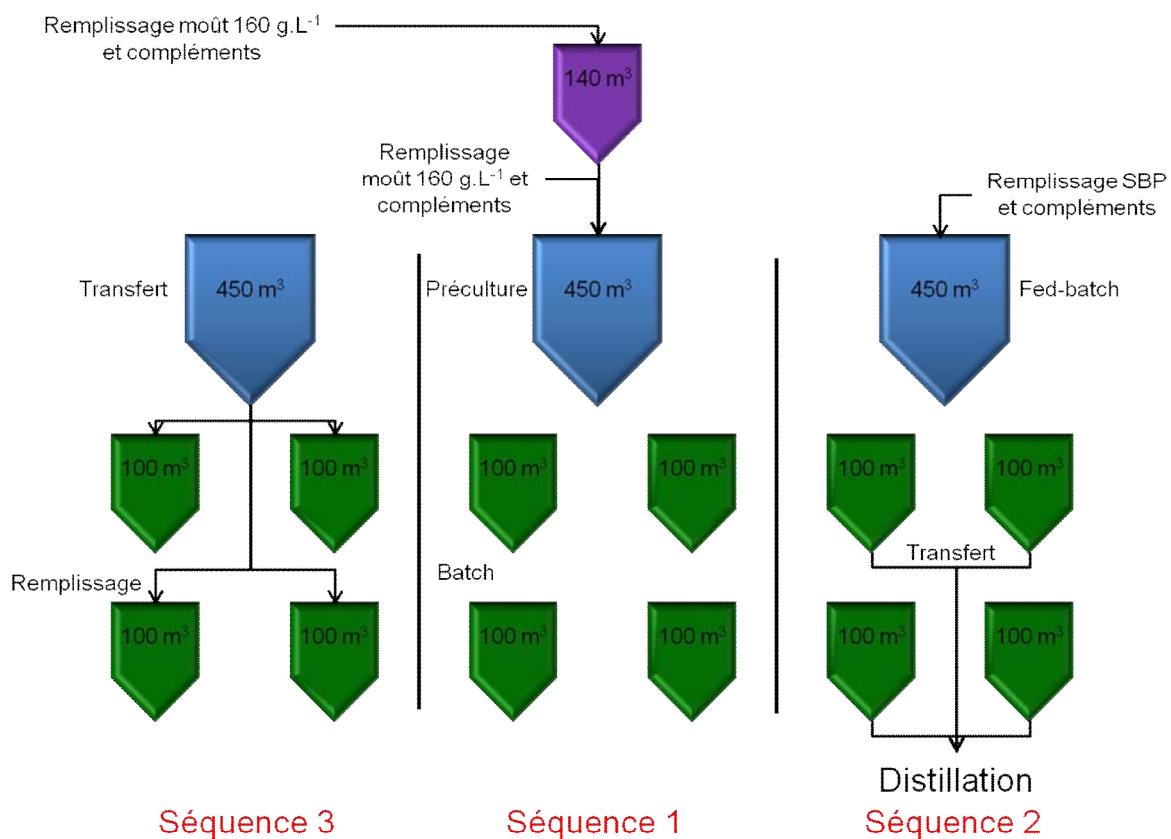


Figure 77: Exemple de schéma de principe pour l'utilisation du procédé proposé. Le schéma présente l'état dans lequel serait l'ensemble de la cuverie après la première rotation de séquence.

### IV.3. Perspectives

Les travaux présentés dans ce manuscrit répondent à l'objectif fixé. Cependant, ils soulèvent de nombreuses questions qui n'ont pas pu être résolues au cours de cette thèse :

- Quelles sont les interactions entre tous les composés testés ? Leurs concentrations sont-elles optimales ? Sont-ils tous utiles simultanément ? D'autres compléments (farine de soja...) seraient-ils plus efficaces ?
- Y a-t-il réellement formation de vivianite en cas d'ajout de fer ? Et si oui, serait-il bénéfique de l'ajouter sous forme de chélate (EDTA, Hème...)?
- Comment serait-il possible en industrie de produire les extraits de levures directement sur site à partir de la biomasse disponible ? Autolyse, lyse enzymatique, ultrasons, broyage mécanique... ?
- Comment l'oxygène est-il utilisé par la levure au cours de la fermentation ? A la synthèse de lipides insaturés en phase de propagation puis à la réoxydation des coenzymes durant le reste de la fermentation ?
- Pourquoi la levure a-t-elle besoin de nutriments lorsqu'il n'y a plus de croissance ? Servent-ils uniquement au renouvellement des composés cellulaires ?
- Pourquoi la concentration optimale en phase de production n'est pas la maximale ? Uniquement à cause de la diminution du rendement par l'augmentation des besoins de maintenance lorsque la concentration cellulaire est élevée ou y a-t-il des problèmes de diffusion de sucre, d'éthanol ou de nutriment lorsque la concentration cellulaire est élevée ?
- Quel est l'effet exact de l'éthanol sur la levure, non pas uniquement en terme de concentration mais aussi en terme de durée d'exposition ? Une concentration faible avec une exposition longue est-elle plus inhibitrice que l'inverse ?
- Quel serait l'effet du recyclage cellulaire sur ce procédé ? Une diminution de la durée de fermentation au fil des cycles ?
- Les contaminations en usine seront-elles moins fréquentes avec l'utilisation du procédé proposé ?
- Comment mettre en œuvre un véritable suivi de la composition du milieu dans les ateliers de fermentation (O<sub>2</sub>, levures...) ? Serait-ce rentable ?



## Références

- AFNOR, 2008, NF EN 15376 Carburants pour automobiles : Ethanol comme base de mélange à l'essence, exigences et méthodes d'essais, Boutique AFNOR
- Abe H., Fujita Y., Takaoka Y., Kurita E., Yano S., Tanaka N. et Nakayama K.-I., 2009, Ethanol-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated under selective conditions by over-expression of a proofreading-deficient DNA polymerase delta, J. of Biosci. and Bioeng. Vol. 108 N° 3, p.199-204
- Aldiguié A. S., Alfenore S., Cameleyre X., Goma G., Uribelarrea J. L., Guillouet S.E. et Molina-Jouve C., 2004, Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behavior in ethanol bio-fuel production, Bioprocess BiosysT. Eng. 26 p. 217-222
- Alfenore S., Molina-Jouve C., Guillouet S.E., Uribelarrea J.L., Goma G. et Bendadis L., 2002, Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by vitamin feeding strategy during feed-batch process, Appl. Microbiol. Biotechnol. 60, p. 67-72
- Alfenore S., Cameleyre X., Bendadis L., Bideaux C., Uribelarrea J.L., Goma G., Molina-Jouve C. et Guillouet S.E., 2004, Aeration strategy: a need for very high ethanol performance in *Saccharomyces cerevisiae* fed-batch process, Appl. Microbiol. Biotechnol. 63 p. 537-542
- Ansanay-Galeote V., Blondin B., Dequin S. et Sablayrolles J.M., 2001, Stress effect of ethanol on fermentation kinetics by stationary-phase cells of *Saccharomyces cerevisiae*, Biotechnol. Lett. 23, p. 677-681
- Argueso J.L., Carazzole M.F. et Mieczkowski P.A., 2009, genome structure of *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production, Genome res. 19, p. 2258-2270
- Arzate A., 2005, Extraction du sucre de betterave, ACER centre de recherche de développement et de transfert technologique en agriculture
- Avery S.V., Howlett N.G., et Radice, S., 1996, Copper toxicity towards *Saccharomyces cerevisiae*: Dependence on plasma membrane fatty acid composition, Appl. Environ. Microbiol. 62, p. 3960-3966
- Azenha M., Vasconcelos M.T. et Moradas-Ferreira, P., 2000, The influence of Cu concentration on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biosci. Bioeng. 90, p. 163-167
- Bai F.W., Chena L.J., Zhang Z., Anderson W.A. et Moo-Young M., 2004, Continuous ethanol production and evaluation of yeast cell lysis and viability loss under very high gravity medium conditions, J. Biotechnol. 110, p. 287-293
- Bai F.W., Ge X.M., Anderson W.A. et Moo-Young M., 2008 (a), Parameter Oscillation Attenuation and Mechanism Exploration for Continuous VHGH Ethanol Fermentation, Biotechnol. bioeng. vol. 102 p. 112-121
- Bai F.W., Anderson W.A. et Moo-Young M., 2008 (b), Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks, Biotechnol. adv. 26 p.89-105
- Balcerek M., Pielech-Przybylska K., Patelski P., 2011, Selection of yeast strains for alcoholic fermentation of sugar beet thick juice and green syrup, Biomass Bioenerg. 35, p.4841-4848
- Ballerini D. et Alazard-Toux N., 2006, Les biocarburants état des lieux, perspectives et enjeux du développement, Editions Technip, IFP publications
- Barber A. R., Henningsson M. et Neville Pamment B., 2002, Acceleration of high gravity yeast fermentations by acetaldehyde addition, Biotechnol. Lett. 24, p. 891-895
- Bayrock D.P. et Ingledew W. M., 2001, Application of multistage continuous fermentation for production of fuel alcohol by very-high-gravity fermentation technology, J. ind. microbial. biot. 27, p. 87-93
- Blackwell K.J., Tobin J.M. et Avery S.V., 1997, Manganese uptake and toxicity in magnesium-supplemented and unsupplemented *Saccharomyces cerevisiae*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 47, p. 180-184
- Box, G.E.P. & Wilson, K.B. 1951 On the experimental attainment of optimum conditions. Journal of the Royal Statistical Society (Series B) 13, 1-45

- Brandberg T., Gustafsson L., Franzén C. J., 2007, The impact of severe nitrogen limitation and microaerobic conditions on extended continuous cultivations of *Saccharomyces cerevisiae* with cell recirculation, *Enzyme Microb. Technol.* 40 p585–593
- Breisha G.Z., 2010, Production of 16 % ethanol from 35 % sucrose, *biomass bioenerg.* 34 1243-1249
- Buttke T.M., Jones S.D. et Bloch K., 1980, Effect of sterol side chains on growth and membrane fatty acid composition of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.* October; 144(1): 124–130
- Bvochora J.M., Read J.S. et Zvauya R., 2000, Application of very high gravity technology to the cofermentation of sweet stem sorghum juice and sorghum grain, *Ind. Crop. Prod.* 11, p. 11-17
- Cabal C. et Gatignol C., 2005, Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques, N° 2757 – Rapport sur « Définitions et implications du concept de voiture propre » Enregistré à la Présidence de l'Assemblée nationale le 14 décembre 2005
- Campbell N.A. et Reece J.B., 2004, *Biologie*, Edition du Renouveau Pédagogique inc., p.168-181
- Casalta E., Sablayrolles J.M. et Salmon J.M., 2011, Comparaison de différentes méthodes de dosage de l'azote assimilable dans le moût de raisin, *Revue Française d'œnologie* n° 247, Juin-Juillet 2011
- Chandrasena G., Walker G.M., 1997, Use of response surface to investigate metal ion interaction in yeast fermentations. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 55:24–29
- Chen L.J., Xu Y.L., Bai F.W., Anderson W.A. et Moo-Young M., 2005, Observed quasi-steady kinetics of yeast cell growth and ethanol formation under very high gravity fermentation condition, *biotechnol. bioprocess eng.* 10, p. 115-121
- Cherubini F., Birda N. D., Cowieb A., Jungmeier G., Schlamadinger B., Woess-Gallasch S., 2009, Energy- and greenhouse gas-based LCA of biofuel and bioenergy systems: Key issues, ranges and recommendations, *Resources, Conservation and Recycling* 53, p. 434–447
- Choi G.-W., Kang H.-W. et Moon S.-K., 2009, Repeated-batch fermentation using flocculent hybrid, *Saccharomyces cerevisiae* CHFY0321 for efficient production of bioethanol, *Appl Microbiol Biotechnol* 84, p. 261-269
- Cipollina C., Ten Pierick A., Canelas A. B., Seifar R. M., van Maris A. J. A., van Dam J. C. et Heijnen J. J., 2009, A comprehensive method for the quantification of the non-oxidative pentose phosphate pathway intermediates in *Saccharomyces cerevisiae* by GC-IDMS, *Journal of Chromatography B* 877, p. 3231-3236
- D'Amore T., Panchal C.J., Russell I. et Stewart G.G., 1990, The study of ethanol tolerance in yeast, *Critical Reviews in Biotechnology* [0738-8551] Vol. 9 issue 4, p. 287-304
- D'Amore T., 1992, Improving yeast fermentation performance, *I. Inst. Brew.*, September-October 98, p. 375-382
- Das Neves M. A., Kimura T., Shimizu N. et Shiiba K., 2006, Production of Alcohol by Simultaneous Saccharification and fermentation of Low-grade Wheat Flour, *Braz. Arch. Biol. Techn.* Vol.49, n. 3, p. 481-490
- De Miniac M., 1988, Conduite des ateliers de fermentation alcoolique de produits sucriers (mélasse et égouts), *Ind. Aliment. Agric* Juillet/Aout, p. 675-688
- Dickinson J. R. et Schweizer M., 1999, *The metabolism and molecular physiology of Saccharomyces cerevisiae*, Taylor & Francis Ltd
- Didderen I., Destain J. et Thonart P., 2008, *Le bioéthanol de seconde génération*, Les presses agronomiques de Gembloux
- Dickey A.N., Yim W.S., and Faller R., 2009, Using Ergosterol To Mitigate the Deleterious Effects of Ethanol on Bilayer Structure, *J. Phys. Chem. B*, 113, 2388–2397
- Dinh T. N., Nagahisa K., Hirasawa T., Furusawa C. et Shimizu H., 2008, Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* cells to high ethanol concentration and changes in fatty acid composition of membrane and cell size, *PLoS One* vol. 3 iss. 7 p. 2623
- DEPD-ADEME, 2010, *Analyses de Cycle de Vie appliquées aux biocarburants de première génération consommés en France*, Direction Production et Energie Durables-ADEME

- Domac J., Richards K. M. et Segon V., 2005, Old fuel modern times: socio-economic drivers and impacts of bioenergy use, Paris, International Energy Agency Bioenergy Task 29, p. 8
- Dragone G., Silva D. P., de Almeida e Silva J. B. et de Almeida Lima U., 2003, Improvement of the ethanol productivity in a high gravity brewing at pilot plant scale, *Biotechnol. Lett.* 25, p. 1171-1174
- Dragone G., Silva D. P. et de Almeida e Silva J. B., 2004, Factors influencing ethanol production rates at high-gravity brewing, *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 37, p. 797-802
- Easterly J., Faaij A., Flavin C., Freimuth L., Fritsche U. et Laser M., 2007, Biofuel for transport, worldwatch institute, [http://www.worldwatch.org/system/files/EBF008\\_1.pdf](http://www.worldwatch.org/system/files/EBF008_1.pdf) (dernière consultation 15/11/2011)
- Ergun M. et Multu F. S., 2000, Application of a statistical technique to the production of ethanol from sugar beet molasses by *Saccharomyces cerevisiae*, *Bioresour. Technol.* 73, p. 251-255
- Fagel N., Alleman L.Y., Granina L., Hatert F., Thamo-Bozso E., Cloots R. and André L., 2005, Vivianite formation and distribution in Lake Baikal sediments, *Global Planet. Change*, Vol. 46, Issues 1-4, p. 315-336
- France Agrimer, 2011, L'économie sucrière Campagne 2009/10, Juin 2011, Edition l'arborial
- Garcia M.J., Rios G., Ali R., Belles J.M. et Serrano R., 1997, Comparative physiology of salt tolerance in *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiology (Reading U.K.)* 143, p. 1125-1131
- Gaffney J. S. et Marley N. A., 2009, The impacts of combustion emissions on air quality and climate – From coal to biofuels and beyond, *Atmos. Environ.* 43, p. 23–36
- Gilis J.-F., 1999, Etude de contaminations de fermentations alcooliques industrielles par les levures *Brettanomyces*, thèse de l'institut national polytechnique de Toulouse
- Goupy J., 2006, Les plans d'expériences, *Revue Modulad*, numéro 34, p. 74-116
- Health Effect Institute, 1996, The potential health effects of oxygenates added to gasoline: a review of the current literature. Health Effect Institute, Cambridge
- Heggart H.M., Margaritis A., Pilkington H., Stewart R.J., Dowhanick T.M. et Russell I., 1999, Factors affecting yeast viability and vitality, *MBAA technical quarterly* 36, p. 383-406
- Henry S.A., 1982, Membrane lipids of yeast: biochemical and genetic study. In: Strathern, J.N., Jones, E.W., Broach, J.R. (Eds.), *Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces cerevisiae: Metabolism and Gene Expression*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, p. 101-158.
- Higgins V.J., Beckhouse A.G., Oliver A.D., Rogers P.J. et Dawes I.W., 2003, Yeast genomewide expression analysis identifies a strong ergosterol and oxidative stress response during the initial stages of an industrial lager fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, p. 4777-4787
- Hou L., Cao X., Wang C. et Lu M., 2009, Effect of overexpression of transcription factors on the fermentation properties of *Saccharomyces cerevisiae* industrial strains, *Lett. Appl. Microbiol.* ISSN 0266-8254
- Hunag W.H., Shieh G.S. et Wang F.S., 2012, Optimization of fed-batch fermentation using mixture of sugars to produce ethanol, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 43, p. 1-8
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 1999, *Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide : part 1*. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Vol. 71. Lyon : International Agency for Research on Cancer. [MO-021119].
- IFP énergies nouvelles, 2012, Panorama 2012: Le point sur les biocarburants : progression des marchés nationaux et internationaux, [www.ifpenergiesnouvelles.fr](http://www.ifpenergiesnouvelles.fr) (dernière consultation 17/09/2012)
- Ingledeu W.M., 1999, Alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast primer, *The alcohol textbook: a reference for beverage, fuel and industrial alcohol industries*, Nottingham University Press, Nottingham, UK, p. 49-87
- Ingledeu W.M., Kelsall D.R. Austin G.D. et Kluhspsies C., 2009, *The alcohol textbook* 5<sup>th</sup> edition, Nottingham university press, p. 108-117

- Jacques K.A., Lyons T.D. et Kelsall D.R., 2003, The alcohol textbook 4<sup>th</sup> edition, Nottingham university press, p. 108-117
- Jones H. L., Margaritis A. et Stewart R. J., 2007, The combined effects of oxygen supply strategy, inoculum size and temperature profile on very-high-gravity beer fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*, J. Inst. Brew. 113, p. 168–184
- Jones A. M. et Ingledew W. M., 1994, Fuel alcohol production: Optimization of temperature for efficient very-high-gravity fermentation, Appl. Environ. Microbiol., vol. 60 N°3, p. 1048-1051
- Jones R.P. et Greenfield P.F., 1984, A review of yeast ionic nutrition – Part 1: Growth and fermentation requirements. Process Biochem. 19, p. 48-60
- Jørgensen H., 2009, Effect of Nutrients on Fermentation of Pretreated Wheat Straw at very High Dry Matter Content by *Saccharomyces cerevisiae*, Appl. Biochem. Biotechnol. 153, p. 44-57
- Kaplan J., Mc Vey Ward D., Crisp R.J. et Philpott C.C., 2006, Iron-dependant metabolic remodeling in *S. cerevisiae*, Biochim. Biophys. Acta 1763, p. 646-651
- Kasavi C., Finore I., Lama L., Nicolaus B., Olivier S.G., Oner E.T. et Kirdar B, 2012, Evaluation of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for ethanol production from biomass, Biomass bioenerg., p. 1-9
- Kruger L., Pickerell A. T. W. et Axcell B., 1992, The sensitivity of different brewing yeast strains to carbon dioxide inhibition fermentation and production of flavour-active volatile compounds, J. I. Brewing vol. 98, n°2, p. 133-138
- Khun H., Friederich U. et Fietcher A., 1979, Defined minimal medium for a thermophilic *Bacillus* sp. Developed by a chemostat pulse and shift technique, J. Microbiol. Biotechn., vol. 6 p. 341-349
- Lang H., Bavouzet J.M., Taillandier P. et Delorme C., 1993, Systematic error and comparaison of four methods for assessing the viability of *Saccharomyces cerevisiae* suspensions, Biotechnol. Tech. 7, p. 223-228
- Landolfo S., Zara G., Zara S., Budroni M., Ciani M. et Mannazzu I., 2010, Oleic acid and ergosterol supplementation mitigates oxidative stress in wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* Int. J. Food Microbiol. 141, p. 229-235
- Laopaiboon L., Nuanpeng S., Srinophakun P., Klanrit P. et Laopaiboon P., 2009, Ethanol production from sweet sorghum juice using very high gravity technology effects of carbon and nitrogen supplementations, Bioresour. Technol. 100, p. 4176-4182
- Lei F., Rotbøll M. et Jørgensen S. B., 2001, A biochemically structured model for *Saccharomyces cerevisiae*, J. Biotechnol. 88, p. 205–221
- Letourneau F., 1986, Etude de la fermentation alcoolique de la mélasse de betterave: optimization du procédé en batch, Thèse de l'université de Picardie, U.F.R des sciences fondamentales et appliquées d'Amiens
- Lemos V.P., da Costa L.M. and Lemos R.L., 2007, Vivianite and siderite in lateritic iron crust: an example of bioreduction, Quim. Nova, Vol. 30, p. 36-40
- Levy M., 1932, Equilibria in the formol titration, Department of Chemistry, New York University and Bellevue Hospital Medical College, online publication: <http://www.jbc.org/content/99/3/767.full.pdf>
- Li F., Zhao X. Q., Ge X. M. et Bai F. W., 2009, An innovative consecutive batch fermentation process for very high gravity ethanol fermentation with self-flocculating yeast, Appl. Microbiol. Biotechnol. 84, p. 1079–1086
- Li F., Dewan A. et Karim M.N., 2012, Optimization of bioethanol ethanol production in fed-batch fermentation, 8<sup>th</sup> IFAC Symposium on advanced control of chemical processes, Furama Riverfront, Singapore
- Lichko L.P., Okorokov L.A. et Kulaev I.S., 1982, Participation of Vacuoles in Regulation of Levels of K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and Orthophosphate Ions in Cytoplasm of the Yeast *Saccharomyces carlsbergensis*, Arch. Microbiol. 132, p. 289-293



- Lidén G., Persson A., Gustafsson L. et Niklasson C., 1995, Energetics and product formation by *Saccharomyces cerevisiae* grown in anaerobic chemostats under nitrogen limitation. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, p. 1034-1038.
- Lima-Costa M.E., Tavares C., Rasposo S., Rodrigues B. et Peinado J.M., 2012, Kinetics of sugars consumption and ethanol inhibition in carob pulp fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fed-batch cultures, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39, p. 789-797
- Lin Y.-H., Bayrock D.P. et Ingledew W.M., 2002, Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* grown in a multistage chemostat environment under increasing levels of glucose, *Biotechnol. Lett.* 24, p. 449-453
- Nag A., 2008, Biofuel refining and performance, Mc Graw Hill editions
- Nanzyo M., Yaginuma H., Kanno H. and Takahashi T., 2010, Formation of iron plaque and vivianite on the roots of paddy rice, 19th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World, Brisbane, Australia
- Manning P.G., Murphy T.P. and Prepas E.E., 1991, Intensive formation of vivianite in the bottom sediments of mesotrophic narrow lake, *Can. Mineral.*, vol. 29, p. 77-85
- Mas A., 2009, Les plans d'expériences pour surfaces de réponses, Institut de Modélisation Mathématiques de Montpellier II, cours LMGC I3M
- Mehdikhani P., Hovsepyan H. et Bari M.R., 2011, Sugar beet genotype effect on potential of bioethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* fermentation, *Afr. J. Biotechnol.*, Vol. 10, Issue 20, P. 4100-4105
- Morrison D., 2006, Ethanol fuel presents a corn-undrum. University of Minnesota. Retrieved 2008-01-14.
- Mustapha A. et Stauffer C., 1997, Bakery fats, American Soybean Association library
- Norton S., D'Amore T., 1994, Physiological effects of yeast cell immobilization, *Enzyme Microb. Technol.* 16, p. 365-375
- Oestling A., 2001, Carburants additionnés de bioéthanol Stoa, Evaluation des choix scientifiques et technologiques, <http://www.europarl.eu.int/stoa/publi/pdf>, note d'information n°07/2001 (dernière consultation 25/03/2010)
- Patil S.G. and Patil B.G., 1989, Chitin Supplement Speeds up the Ethanol Production in Cane Molasses Fermentation, *Enzyme Microb. Technol.* 11, p. 38-43
- Pennacchia C., Blaiotta G., Pepe O. et Villani F., 2008, Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains from different food matrices and their preliminary selection for a potential use as probiotics, *J. Appl. Microbiol.* ISSN 1364-5072
- Pereira. F. B., Guimarães P.M.R., Teixeira J.A. et Domingues L., 2010, Optimization of low-cost medium for very high gravity ethanol fermentations by *Saccharomyces cerevisiae* using statistical experimental designs, *Bioresour. Technol.* 101, p. 7856-7863
- Petrik M., Kappeli O. et Fiechter A., 1983, An expended concept for the glucose effect in the yeast *Saccharomyces uvarum*: involvement of short- and long-term regulation, *J. Gen. Microbiol.*, 129, p. 43-49
- Piddocke M. P., Kreisz S., Heldt-Hansen H. P., Nielsen K. F. et Olsson L., 2009, Physiological characterization of brewer's yeast in high-gravity beer fermentations with glucose or maltose syrups as adjuncts, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84, P. 453-464
- Poilpré E., 2002, Mécanisme d'adaptation rapide de en métabolisme oxydatif : implication des sucres de réserves et de la capacité respiratoire. Thèse INSA Toulouse
- Popov S., Jovana Rankovi J., Jelena Dodi J., Dodi S. et Joki A., 2010, Bioethanol Production from Raw Juice as Intermediate of Sugar Beet Processing: A Response Surface Methodology Approach, *Food Technol. Biotechnol.* 48, p. 376-383
- Poreda A., Piotr A., Tadeusz T. et Makarewicz M., 2009, Accumulation and Release of Metal Ions by Brewer's Yeast During Successive Fermentations, *J. Inst. Brew.* 115, p. 78-83

- Powlson D. S., Riche A. B. et Shield I., 2005, Biofuels and other approaches for decreasing fossil fuel emissions from agriculture, *Ann. Appl. Biol.* 146, p. 193–201
- Puligundla P., Smogrovicova D., Obulam V. S. R. and Ko S., 2011, Very high gravity (VHG) ethanolic brewing and fermentation: a research update; *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, p.1133-1144
- Ranković J., Dodić J., Dodić S. et Popov S., 2009, Bioethanol production from intermediate products of sugar beet processing with different types of *Saccharomyces cerevisiae*, *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly* 15, p. 13-16
- Radojka R., Vesna V., 2012, Bioethanol production from sugar beet molasses and thick juice using *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on maize stem ground tissue, *Fuel*, vol. 92, issue 1, P. 1-8
- Ratledge C., 1991, Yeast Physiology: a micro synopsis. *Bioprocess Engineering* 6, p. 195-203
- Reddy L.V.A., Reddy O.V.S., 2006, Rapid and enhanced production of ethanol in very high gravity (VHG) sugar fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* Role of finger millet (*Eleusine coracana* L) flour, *Process Biochem.* 41, p. 726–729
- Rees M.R.E. et Stewart G.G., 1997, The effects of increased magnesium and calcium concentration on yeast fermentation performance in high gravity gravity worts, *J. Inst. Brew.*, September-October, Vol. 103, p. 287-291
- Renewable Fuels Association, 2008, Changing the climat: Ethanol industry outlook 2008, [http://www.ethanolrfa.org/objects/pdf/outlook/RFA\\_Outlook\\_2008.pdf](http://www.ethanolrfa.org/objects/pdf/outlook/RFA_Outlook_2008.pdf). Retrieved 2008-05-10. Source: F.O. Licht (dernière consultation 09/03/2010)
- Renewable Fuels Association, 2009, World Ethanol and Biofuels Report 2009, World Ethanol and Biofuels Report , vol. 7, no. 18, p. 365, Source:F.O. Licht
- Renewable Fuels Association, 2011, World ethanol production, <http://ethanolrfa.org/pages/World-Fuel-Ethanol-Production>. Source: RFA, F.O. Licht (dernière consultation 09/02/2012)
- Réseau Action Climat-France, 2006, Note sur les biocarburants, disponible en ligne [http://www.rac-f.org/DocuFixes/fiches\\_thema/note\\_RACF\\_biocarburants.pdf](http://www.rac-f.org/DocuFixes/fiches_thema/note_RACF_biocarburants.pdf)
- Rosenfeld E., Beauvoit B., Blondin B. et Salmon J.M., 2003, Oxygen Consumption by Anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* under Enological Conditions: Effect on Fermentation Kinetics, *Appl. Env. Microbiol.*, p. 113-121
- Ryan D. et Johnson R., 2001, Dialysis and ultrafiltration of molasses for fermentation enhancement, *Sep. Purif. Technol.* 22-23, p. 239–245
- Saez C., 1986, Etude de paramètres de la fermentation alcoolique. Application à l'élaboration de pétillant de raisin. Thèse INSA Toulouse
- Sajbidor, J., Z. Ciesarova et D. Smogrovicova. 1995. Influence of ethanol on the lipid content and fatty acid composition of *Saccharomyces cerevisiae*, *Folia Microbiol.* 40, p. 508-510.
- Sanchez O. J., Cardona C. A., 2008, Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks, *Bioresour. Technol.* 99, p. 5270-5295
- Schmid R.D., 2005, Atlas de poche de biotechnologie et de génie génétique, Médecine-Sciences, Flammarion
- Shapouri H., Duffield J. A. et Graboski M. S., 1995, Estimating the Net Energy Balance of Corn Ethanol, *Agricultural Economics Report No. AER721*, p. 24
- Shobayashi M., Mitsueda S.I., Ago M., Fujii T., Iwashita K. et Iefuji H., 2005, Effects of culture conditions on ergosterol biosynthesis by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 69, p. 2381-2388.
- Silva D. P., Brányik T., Dragone G., Vicente A. A., Teixeira J. A. et Almeida e Silva J. B., 2008 (a), High gravity batch and continuous processes for beer production Evaluation of fermentation performance and beer quality, *Chem. Pap.* 62, p. 34-41
- Silva J.A., de Lima Damasceno B.P.G., Honorato da Silva F.L., Suely Madruga M. et Pereira de Santana D., 2008 (b), Application of the factorial design and response surface methodology for optimization of alcoholic fermentation, *Quim. Nova*, Vol. 31, No. 5, p. 1073-1077

- Soyuduru D., Ergun M. et Tosun A., 2009, Application of a Statistical Technique to Investigate Calcium, Sodium, and Magnesium Ion Effect in Yeast Fermentation, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 152, p. 326-333
- Srichuwong S., Fujiwara M., Wang X., Seyama T., Shiroma R., Arakane M., Mukojima N., Tokuyasu K., 2009, Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of very high gravity (VHG) potato mash for the production of ethanol, *Biomass Bioener.*, 33, p. 890-898
- Stehlik-Tomas V., Grba S., Stanzer D. et Vahcic N. et Gulan Zetic V., 2003, Uptake of iron by yeast cells and its impact on biomass production, *Acta Aliment. Hung.*, Vol. 32, p. 279-287
- Stehlik-Tomas V., Gulan Zetic V., Damir Stanzer D., Grba S. et Vahcic N., 2004, Zinc, Copper and Manganese Enrichment in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Food Technol. Biotechnol.* 42, p. 115-120
- Taherzadeh M.J. et Karimi K., 2007, Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review, *Bioresource technol.*, vol. 2, n°4, p. 707-738
- Thomas D.S., Hossack A.J. et Rose, A.H., 1978, Plasma membrane lipid composition and ethanol tolerance, *Arch. Microbiol.*, 117, p. 239-245.
- Tosun A. et Ergun M., 2007 Use of experimental design method to investigate metal ion effects in yeast fermentations, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 82, p. 11-15
- Tosun A. et Ergun M., 2008, Effect of Zeolite NaY and Ca-Montmorillonite on Ethanol Production Using Synthetic Molasses, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 144, p. 161-168
- Verachtert H. and De Mot R., 1990, *Yeast biotechnology and biocatalysis*, Marcel Dekker Inc., USA
- Volkand H.-P., Harms H., Kaufmann K., Wanner O. and Zehnder A.J.B., 2000, Repair of damaged vivianite coatings on mild steel using bacteria, *Corros. Sci.*, vol. 43, p. 2135-2146
- Walker G., 1999, *Yeast physiology and biotechnology*. John Wiley and sons Ltd., United Kingdom
- Wang J. et Chen C., 2006, Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review, *Biotechnol. Adv.* 24, p. 427-451
- Wang F.-Q., Gao C.-J., Yang C.-Y. et Xu P., 2007 (a), Optimization of an ethanol production medium in very high gravity fermentation, *Biotechnol. Lett.* 29, p. 233-236
- Wang R., Ji Y., Melikoglu M., Koutinas A. et Webb C., 2007 (b), Optimization of innovative ethanol production from wheat by response surface methodology, *Process Saf. Environ. Prot.*, Vol 85 p.404-412
- Watson T.G., 1976, Amino-acid pool composition of *Saccharomyces cerevisiae* as function of growth rate and amino-acid nitrogen source, *J. Gen. Microbiol.* 96, p. 236-268
- Xue C., Xin-Qing Zhao X.Q., Yuan W.J. et Bai F.W., 2008, Improving ethanol tolerance of a self-flocculating yeast by optimization of medium composition, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, p. 2257-2261
- Xue C., Zhao X.Q. et Bai F.W., 2010, Effect of the Size of Yeast Floccs and Zinc Supplementation on Continuous Ethanol Fermentation Performance and Metabolic Flux Distribution Under Very High Concentration Conditions, *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 105, n°5, p. 935-944
- You K.M., Rosenfield C.L. et Knipple D.C., 2003, Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Appl. and Environ. Microbiol.* 69, p.1499-1503.
- Zysset A.-C., 2002, Les origines du sucre de betterave : Merci, Napoléon 1<sup>er</sup>, *Rev. Mens. Suisse Odontostomatol.*, vol. 112 p. 5.

ANNEXE 1 : Compositions des différentes solutions servant à la réalisation des compléments utilisés pour le milieu nommé MS300.

Les tableaux présentés ci-après indiquent les compositions des différentes solutions servant à la réalisation des compléments utilisés pour le milieu nommé MS300.

**Tableau 40: Composition de la solution de facteurs de croissance en anaérobie. Après mélange des composés, la solution a été chauffée à 70°C pendant 5 minutes afin de permettre la dissolution de l'ergostérol. Solution utilisée à 1 mL.L<sup>-1</sup> de milieu final.**

Composés	Quantité par litre
Ergostérol	1,5 g
Acide oléique	0,5 mL
Tween 80	50 mL
Ethanol	50 mL

**Tableau 41: Composition de la solution mère de vitamines. Solution utilisée à 10 mL.L<sup>-1</sup> de milieu final.**

Vitamines	Concentrations (g.L <sup>-1</sup> )
Myo-Inositol	2
Pantothénate de calcium	0,15
Thiamine hydrochloryde	0,025
Acide nicotinique	0,2
Pyridoxine	0,025
Biotine	3

**Tableau 42: Composition de la solution mère d'oligo-éléments. Solution utilisée à 1 mL.L<sup>-1</sup> de milieu final.**

Eléments	Concentrations (g.L <sup>-1</sup> )
MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	4
ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	4
CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	1
KI	1
CoCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,4
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	1

**Tableau 43: Composition de la solution mère d'acides aminés. La dissolution des acides aminés a été effectuée dans de l'eau distillée à 100°C contenant 20 g.L<sup>-1</sup> de NaHCO<sub>3</sub>. Solution utilisée à 13 mL.L<sup>-1</sup> de milieu final.**

Acide aminés	Concentrations (g.L <sup>-1</sup> )
Tyrosine	1,4
Tryptophane	13,7
Isoleucine	2,5
Acide aspartique	3,4
Acide glutamique	9,2
Arginine	28,6
Leucine	3,7
Thréonine	5,8
Glycine	1,4
Glutamine	38,6
Alanine	11,1
Valine	3,4
Méthionine	2,4
Phénylalanine	2,9
Sérine	6
Histidine	2,5
Lysine	1,3
Scystéine	1
Proline	46,8

## ANNEXE 2 : Questionnaire envoyé aux ateliers de production d'éthanol



**Union Nationale des Groupements de  
Distillateurs d'Alcool Laboratoire: 174, Bd  
Caméliat- 92247 Malakoff Cedex**

**01.49.65.08.08 - fax: 01.49.65.09.52**

**Merci de bien vouloir remplir ce questionnaire et de le renvoyer soit par  
mail à [julien.riess@ensiacet.fr](mailto:julien.riess@ensiacet.fr) soit par fax au 01.49.65.09.52 avant le 6  
Février 2010**

Nom de la société:

Adresse du site:

Nom de la personne ayant répondu à ce questionnaire:

**Quel type de matière première utilisez vous pour la production d'éthanol ?**

En campagne :

EP2

pourcentage :

Mélasse

pourcentage :

mélange mélasse-EP2

pourcentage :

Jus vert

pourcentage :

Autre :

pourcentage :

---

Hors campagne :

---

Jus vert

EP2

pourcentage :

Mélasse

mélange mélasse-EP2

pourcentage :

pourcentage :

pourcentage :

Autre : sirop pur et refonte sucre pourcentage :

---

**Avec quoi diluez vous les matières premières ?**

---

Vinasses

Eau de lagune

Condensat

Pourcentage :

Pourcentage :

Pourcentage :

Autre :

Nature :

Pourcentage :

---

**Quel sont les caractéristiques de vos milieux utilisés pour la production d'éthanol ?**

---

---

---

Densité initiale :

---

Concentration en sucre :

---

Rapport sucre/non-sucre :

---

Concentration en azote :

---

Concentration en phosphates :

---

Cendres :

---

Matière sèche :

---

Brut (avant ajouts d'azote, phosphate...)

Après ajouts de compléments

---

Ces données concernent le milieu :

---

Joindre fiche analytique si disponible

---

**Ajouts aux milieux de fermentation :**

---

Source d'azote :

Produit :

---

Concentration dans le milieu :

---

Produit :

---

Concentration dans le milieu :

---

Produit :

---

Concentration dans le milieu :

---

Source de phosphore :

Produit :

---

Concentration dans le milieu :

---

Produit :

---

Concentration dans le milieu :

---

Produit :

---

Concentration dans le milieu :

---



Vitamines :

Produit :

Concentration dans le milieu :

Produit :

Concentration dans le milieu :

Autre :

Produit :

Concentration dans le milieu :

Produit :

Concentration dans le milieu :

Produit :

Concentration dans le milieu :

Produit :

Concentration dans le milieu :

**Quel type de traitement effectuez vous sur les milieux avant fermentation ?** Bactériostatique

Produits :

Concentrations :

 Stérilisation thermique

Durée :

min

Température :

°C

 Filtration

---

**Type de filtration**

---

 Traitement à l'acide

---

**Produits :**

---

**Quantités :**

---

**Acidité recherchée :**

---

**Produits :**

---

**Quantités :**

---

**Acidité recherchée :**

---

**Produits :**

---

**Quantités :**

---

**Acidité recherchée :**

---

---

**Quel type de procédé de fermentation utilisez vous ?**

---

 Batch (discontinu) Batch alimenté (semi-continu) Continu

---

**Quel est le volume de vos cuves de fermentation ?**

---

---

**Type 1 :** hL

---

**Type 2 :** hL

---

**Type 3 :** hL

---

**Type 4 :** hL

---

**Type 5 :** hL

---

**Type 6 :** hL

---

---

**Comment inoculez vous vos cuves ?**

---

---

Concentration cellulaire en début de fermentation :

---

Par recyclage des levures

---

Taux de recyclage : %

---

Nombre de cycles :

---

Par cuve mère

Par levure commerciales

---

Pourcentage volumique de la cuve de fermentation : %

---

Nom de la levure :

---

Fabricant :

---

Autres :

---

---

---

**Quels paramètres suivez vous durant la fermentation ?**

---

La densité du milieu

La concentration en sucre

La concentration en alcool

Le pH

L'acidité

Les germes exogènes

La température

La concentration en oxygène dissout

La concentration en ATP

La concentration cellulaire

La viabilité cellulaire

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

Autre :

---

---

---

**Comment aérez vous vos cuves en cours de fermentation ?**

---

\_\_\_\_\_  Continue  Par intermittence \_\_\_\_\_

L'aération est elle : \_\_\_\_\_

Concentration en oxygène dissout : \_\_\_\_\_

type d'aération : \_\_\_\_\_

Par crépines

Par tuyauterie percée \_\_\_\_\_

Autre : \_\_\_\_\_

Vecteur d'oxygène : \_\_\_\_\_

Air

Eau oxygéné \_\_\_\_\_

Mélange air/oxygène pur \_\_\_\_\_

Autre : \_\_\_\_\_

Nature : \_\_\_\_\_

---

**Comment agitez vous vos milieux de fermentation ?**

---

\_\_\_\_\_  Continue  Par intermittence \_\_\_\_\_

L'agitation est elle : \_\_\_\_\_

---

L'agitation est elle effectuée par:

---

Agitation mécanique à pales

Air lift

Redirculation

Autre :

---

---

**Comment contrôlez vous la température en cours de fermentation ?**

---

Avez-vous un système de refroidissement :

---

Non

Oui

Si oui :

---

Externe

Interne

Combien de sondes de température avez-vous par cuve :

---

Quelle est la température de consigne :

---

Quelle est la température maximale acceptée en fermentation :

---

Quelle est la température minimale acceptée en fermentation :

---

**Quels problèmes biologiques de conduite fermentaire rencontrez vous ?**

---

Observez vous des temps de latence entre l'inoculation et le début de fermentation :

---

Non

Oui

Si oui, quel paramètre pourrait en être la cause :

Une température trop élevée

Une température trop basse

Une viabilité cellulaire trop faible

La présence d'inhibiteurs

Une contamination de l'inoculum

Population initiale insuffisante

Autre :

Si contaminations, de quel type :

Observez vous des arrêts de la fermentation ou des baisses de rendement :

Oui

Non

Si oui, quel paramètre pourrait en être la cause :

Une température trop élevée

Une température trop basse

une viabilité cellulaire trop faible

La présence d'inhibiteurs

une contamination de l'inoculum

Des carences en nutriments

Teneur en éthanol trop élevés

Autre :

---

Si contaminations, de quel type :

---

**Quels valeurs obtenez vous en fin de fermentation ?**

---

TAV moyen : % vol

---

TAV maximum : % vol

---

TAV minimum : % vol

---

Sucre résiduel :

---

Durée de fermentation moyenne  
: h

---

Durée de fermentation  
maximum: h

---

Durée de fermentation minimum  
: h

---

**Comment séparez vous les levure du moût ?**

---

Centrifugation

Sédimentation/Floculation

Filtration

---

Autre :

---

**Le lavage des levures :**

---

-

---

Lavez vous vos levure en après séparation ?

---

Oui

Non

---

---

Si oui :

---

---

Durée du lavage : min

---

---

Utilisez-vous de l'acide ?

---

Oui

Non

---

Si oui : Lequel : min

---

pH

Combien de temps :

---

---

Utilisez-vous pour laver ?

---

Vinasses

Condensat

Eau

---

Autre :

---



## ANNEXE 3 : Résultats des dosages des acides aminés dans le SBP réalisés par Invivo Labs

**Tableau 44: Concentrations en acides aminés dans le SBP. Les concentrations sont exprimées en g d'acides aminés par kg de SBP. La notation <0,2 indique que les concentrations sont inférieures au seuil de détection des acides aminés.**

Acide aminé	Concentration (g.kg <sup>-1</sup> )	Incertitude (g.kg <sup>-1</sup> )
Acide aspartique	0,6	0,3
Thréonine	<0,2	
Sérine	0,3	0,3
Acide glutamique	0,8	0,3
Proline	0,2	0,3
Glycine	0,3	0,3
Alanine	0,8	0,3
Valine	0,4	0,3
Cystéine	<0,2	
Méthionine	<0,2	
Isoleucine	0,5	0,3
Leucine	0,5	0,3
Tyrosine	0,3	0,3
Phénylalanine	<0,2	
Histidine	<0,2	
Lysine	<0,2	
Arginine	<0,2	
Tryptophane	<0,2	
Total des acides aminés quantifiés	4,9	3,0

## ANNEXE 4 : Résultats des dosages effectués sur le SBP par l'UNGDA

**Tableau 45: Résultats des dosages effectués par l'UNGDA sur le SBP. Les notations < indiquent que les concentrations des composés concernés sont inférieures au seuil de détection. Les résultats sont présentés dans ce tableau tel qu'ils ont été fournis par l'UNGDA.**

Analyses	Unité	Résultat
Matières sèches	g.kg <sup>-1</sup>	70,2
Matières minérales	g.kg <sup>-1</sup>	3,6
Azote ammoniacal	g <sub>N</sub> .kg <sup>-1</sup>	<1
Phosphore	g <sub>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub></sub> .kg <sup>-1</sup>	<0,2
Magnésium	g <sub>MgO</sub> .kg <sup>-1</sup>	<1
Potassium	g <sub>K<sub>2</sub>O</sub> .kg <sup>-1</sup>	2,4
Sodium	g <sub>Na<sub>2</sub>O</sub> .kg <sup>-1</sup>	1,1
Calcium	g <sub>CaO</sub> .kg <sup>-1</sup>	1
Acide Lactique	g.kg <sup>-1</sup>	<0,05
Acide acétique	g.kg <sup>-1</sup>	2,1
Glycérol	g.L <sup>-1</sup>	<0,05
Acétaldéhyde	mg.L <sup>-1</sup>	15
Acétal	mg.L <sup>-1</sup>	<5
Acétate d'éthyle	mg.L <sup>-1</sup>	<10
Méthanol	mg.L <sup>-1</sup>	12
Propanol-1	mg.L <sup>-1</sup>	<5
Isobutanol	mg.L <sup>-1</sup>	<5
Butanol-1	mg.L <sup>-1</sup>	<5
Butanol-2	mg.L <sup>-1</sup>	<5
Méthyl-2 butanol-1	mg.L <sup>-1</sup>	<5
Méthyl-3 butanol-1	mg.L <sup>-1</sup>	<5