

12

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22 Date de dépôt : 01.08.00.

30 Priorité :

43 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 08.02.02 Bulletin 02/06.

56 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

60 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

71 Demandeur(s) : BIO-ETHANOL NORD PICARDIE —
FR.

72 Inventeur(s) : ALARD GEORGES MAURICE, ROUX
PHILIPPE JEAN, MOURIN ALAIN YVES GERARD et
BRASSEUR LUC ROBERT.

73 Titulaire(s) :

74 Mandataire(s) : CABINET FLECHNER.

54 PROCEDE DE PRODUCTION D'ETHANOL A PARTIR DE SUBSTRATS SUCRIERS AVEC REMPLACEMENT DE
LEVURES.

57 Procédé de production d'éthanol, qui consiste à met-
tre en contact avec une levure du genre *Saccharomyces*
dans un préfermenteur du jus de diffusion de sucrerie soit
pendant une durée suffisamment faible, notamment pen-
dant 5 à 6 heures, en fonction de la teneur en sucres dans
le jus de diffusion, soit par dilution, par exemple, avec de
l'eau et/ ou des vinasses qui consiste à enlever sensible-
ment toutes les levures présentes dans le préfermenteur et
à les y remplacer par des levures fraîches à des intervalles
de temps tels que la concentration en micro-organismes,
autres que la levure du genre *Saccharomyces*, dans le pré-
fermenteur reste inférieur à un seuil donné pendant l'inter-
valle suivant le remplacement des levures.

FR 2 812 657 - A1



Procédé de production d'éthanol à partir de substrats sucriers avec remplacement de levures

La présente invention se rapporte aux procédés de production
5 d'éthanol à partir de substrats sucriers. Elle s'applique particulièrement à la
production d'éthanol en tant que carburant, mais aussi pour les industries
chimiques, pharmaceutiques et cosmétiques, et après rectification de manière
à enlever les substances aromatiques, alimentaires. L'invention prend
notamment comme matière de départ un substrat sucrier tel que le jus de
10 diffusion de betteraves issu du procédé de la sucrerie.

On connaît déjà de nombreux procédés de production d'éthanol
par voie fermentaire à partir de substrats sucriers.

Le principe général de ces procédés consiste à diviser en deux
parties le substrat sucrier. On dilue la première partie par un diluant pour
15 obtenir le « moût faible » et on la met en contact dans un préfermenteur avec
une levure du genre *Saccharomyces* pour obtenir une suspension de levures.
La proportion de diluant, qui est généralement de l'eau et/ou de la vinasse, est
telle que le degré alcoolique de la suspension de levures soit inférieur à 6 %
en volume, en sorte qu'une concentration trop élevée en alcool n'empêche
20 pas les levures de se développer.

La deuxième partie du substrat sucrier est également diluée
avec un diluant qui est généralement de l'eau et/ou de la vinasse mais la
dilution est plus faible que pour la première partie de façon à obtenir une
concentration en sucres plus élevée : c'est le « moût fort ».

25 On met ensuite cette suspension de levures en contact avec le
moût fort dans un fermenteur pendant une durée suffisante pour obtenir un vin
ayant une teneur en éthanol supérieure à un seuil donné.

Deux types d'unités peuvent être distinguées selon que la biomasse est recyclée ou non.

Fermentation sans recyclage de levures :

De la biomasse est générée en permanence dans un préfermenteur aéré appelé cuve-mère. Par un temps de séjour suffisant pour que les levures se développent mais pas trop long, par exemple d'environ 5 à 6 heures, ou par dilution, par exemple, avec de l'eau et/ou des vinasses, le moût levuré titre environ 4 à 6 % en volume d'alcool. Il est utilisé comme levain et est injecté en pied de cuve pour la fermentation proprement dite. Cet apport représente environ 30 à 50 % du volume total de la cuve. Le volume restant est alors progressivement rempli par un moût fort. La teneur finale en alcool atteint 8 à 12% en volume (fonction de la teneur en sucres dans le jus de diffusion) en 20 à 30 h.

La productivité en éthanol d'un tel procédé est relativement faible. Elle peut être améliorée en recyclant la biomasse.

Fermentation avec recyclage de levures :

Dans le cas du recyclage de la biomasse, la levure est concentrée sous forme de crèmes de levures en fin de fermentation. Elle est réutilisée, après un lavage, nécessaire pour diluer les non-sucres, un traitement à l'acide destiné à réduire les risques d'infections bactériennes, et une rapide régénération des levures en cuve-mère aérée.

Les deux techniques évoquées ci-dessus sont applicables à une fermentation discontinue (Batch) comme à une fermentation en continu (multiétagée).

Dans l'article de Delia-Dupuy ML et al « Contamination par les levures *Brettanomyces* dans les fermentations alcooliques » M.A.N. MICROBIOLOGIE ALIMENTS NUTRITION., vol. 13, 1995, pages 349 à 359 XP002119778 Le PLESSIS-ROBINSON., FR ISSN : 0759-0644, on rappelle que la flore indigène demeure une source fréquente d'accidents de fermentation dans la fermentation alcoolique et que les contaminants les plus fréquents dans la fermentation des jus de betterave sont les levures du genre *Brettanomyces*. On étudie trois mécanismes susceptibles d'expliquer le déplacement de population des levures pour en exclure deux et retenir que le rôle de l'acide acétique ne suffit pas à expliquer l'inhibition observée sur

Saccharomyces. On propose les règles suivantes pour éviter la contamination :

- contrôler les opérations d'aération accompagnant la propagation en cuve-mère,
- 5 - suivre attentivement la qualité de la biomasse au cours des recyclages, car ces derniers pourraient permettre aux levures Brettanomyces de « dépasser » leur phase de latence.

Ces règles se sont avérées inefficaces pour lutter contre l'apparition de contaminations levuriennes dans de nombreuses unités
10 françaises de production d'éthanol à partir de substrats sucriers y compris à partir de jus de diffusion. Ces accidents de fermentation, de plus en plus fréquents, n'ont montré aucune corrélation entre les procédés de production, les substrats utilisés et l'apparition du contaminant. Si les conditions de production et la nature du moût varient énormément, on constate une certaine
15 « permanence » du contaminant. Il s'agit dans tous les cas du genre Dekkera ou de la levure Brettanomyces, forme imparfaite du genre précédemment cité. Dans tous les cas, l'accident nécessite un arrêt total de l'atelier de fermentation, suivi d'un redémarrage complet après désinfection totale de l'atelier.

20 L'invention pallie ces inconvénients en évitant l'arrêt de l'atelier et par la même une baisse de la productivité de l'installation de fermentation. Elle permet de conduire une fermentation en continu tout en s'affranchissant des contaminations levuriennes.

L'invention a pour objet un procédé de production d'éthanol, qui
25 consiste à mettre en contact avec une levure du genre Saccharomyces dans un préfermenteur du jus de diffusion de sucrerie soit pendant une durée suffisamment faible, notamment pendant 5 à 6 heures (fonction de la concentration en sucres dans le jus de diffusion), soit par dilution, par exemple, avec de l'eau et/ou des vinasses pour obtenir une suspension de
30 levures d'un degré alcoolique inférieur à 6% en volume, puis à mettre la suspension de levures en contact avec du jus de diffusion de sucrerie pendant une durée suffisante pour obtenir un vin ayant une teneur en sucres inférieure à 3g/l, de préférence inférieure à 2 g/l et mieux inférieure à 1g/l avec un degré alcoolique du vin de 8 à 12% en volume (fonction de la teneur en sucres dans
35 le jus de diffusion) et à distiller le vin pour obtenir de l'éthanol, le procédé

étant caractérisé en ce qu'il consiste à enlever sensiblement toutes les levures présentes dans le préfermenteur et à les y remplacer par des levures fraîches à des intervalles de temps tels que la concentration en micro-organismes, autres que la levure du genre *Saccharomyces*, dans le préfermenteur reste inférieure à un seuil donné pendant l'intervalle suivant le remplacement des levures.

On a en effet constaté, d'une manière inattendue, que les ralentissements, notamment en installation de fermentation continue, étaient dus au fait qu'en relativement peu de temps la levure du genre *Saccharomyces* subit une dégénérescence, une mutation et/ou une contamination par un autre micro-organisme, notamment par une levure du genre *Brettanomyces* bien moins active. En remplaçant toutes les levures par des levures fraîches du genre *Saccharomyces* avant que ne se produise ce phénomène, et notamment de préférence avant qu'il n'y ait 10^7 cellules par millilitre, et mieux 10^6 cellules par millilitre, d'un microorganisme autre que la levure du genre *Saccharomyces* dans le préfermenteur, on maintient ainsi l'activité des levures de fermentation tout en s'affranchissant du risque de contamination levurienne. La fraîcheur de la suspension de levures joue un rôle primordial sur l'absence d'infection par des levures du genre *Brettanomyces*. L'apport de levures fraîches aux levures déjà contaminées ne permet pas d'éviter la contamination levurienne. Pour maintenir de manière continue l'absence des levures du genre *Brettanomyces*, il faut éliminer pratiquement toutes les levures anciennes avant d'introduire les nouvelles levures.

On peut détecter la présence de *Brettanomyces* dans le préfermenteur en prélevant un échantillon de la suspension de levures et en l'examinant au microscope. Alors que les *Saccharomyces*, et notamment *Saccharomyces cerevisiae*, ont une forme ovoïde, les *Brettanomyces* ont une forme allongée. On peut également savoir par l'expérience le délai à respecter pour l'ajout des levures fraîches et remplacer systématiquement les anciennes levures par des levures du genre *Saccharomyces* à un intervalle de temps inférieur à 4 jours.

De préférence, on apporte des levures fraîches au préfermenteur en une quantité telle que l'on obtient dans le préfermenteur une concentration au moins égale à 10^6 cellules par millilitre environ et de

préférence 10^7 cellules par millilitre. On permet ainsi d'éviter toute contamination levurienne en maintenant la concentration de la population souhaitée de levures du genre *Saccharomyces*.

- De préférence, le procédé consiste à engager de 25 à 50% du poids de jus de diffusion dans le préfermenteur pour obtenir la suspension de levures et à mettre le reste du jus de diffusion en contact avec la suspension de levures.

Préfermentation :

- La préfermentation ou propagation des levures (ex : *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pombe*...) peut être avantageusement réalisée pour obtenir une concentration au moins égale à 10^7 cellules par millilitre dans 4 préfermenteurs (volume des préfermenteurs : 45m^3 chacun) fonctionnant en parallèle.

- Le jus de diffusion ou jus de betteraves provient du résultat de l'étape de diffusion en sucrerie qui consiste à mettre en contact les cossettes (betteraves coupées en fines lamelles) avec de l'eau à une température de $65 - 80^\circ\text{C}$ afin de récupérer le sucre présent dans les cossettes par phénomène d'osmose. La durée de préfermentation est calculée en divisant le volume de remplissage de moûts dans les préfermenteurs par le débit d'alimentation de ces préfermenteurs en jus de diffusion (cette durée est naturellement fonction de la teneur en sucres dans le jus de diffusion, elle est généralement de 5 à 6h).

Le jus ainsi obtenu, généralement appelé jus de diffusion, a la composition suivante en volume :

- Teneur en matières sèches : 13 à 22% Saccharose 12 à 20%
Eau : 78 à 87 % Non-sucre 2 à 4%

- Matières minérales :
- Na + 80 à 120 mg/l
 - K + 120 à 1500 mg/l
 - Ca^{++} 30 à 70 mg/l
 - Mg^{++} 100 à 150 mg/l
 - Mn^{++} 10 à 30 mg/l

Le jus de diffusion est distribué dans les 4 préfermenteurs et sert de substrat de croissance aux micro-organismes.

La température dans les préfermenteurs est rigoureusement contrôlée et régulée par un système de plaques de refroidissement dans lequel circule un liquide de refroidissement à l'intérieur ou à l'extérieur des cuves de préfermentation.

Toute multiplication de micro-organismes entraîne une élévation de température. Toute variation de température peut devenir inhibitrice pour la propagation des levures.

La température dans les préfermenteurs est maintenue entre 30 et 35°C.

Afin de favoriser le développement des levures, le milieu nutritif nécessaire à la multiplication de ces micro-organismes comprend :

- des sucres fermentescibles
- de l'azote apporté sous formes diverses telles que l'urée, l'ammoniac, les sels d'ammonium
- du phosphore apporté sous formes diverses telles que l'acide phosphorique, les phosphates
- du soufre apporté sous formes diverses telles que l'acide sulfurique, les sulfates
- de l'oxygène
- des minéraux essentiels si une carence quelconque est détectée.

Ces éléments nutritifs préviennent tout ralentissement de la propagation des levures.

Ces éléments nutritifs et l'oxygène sous forme d'air comprimé (ou d'eau oxygénée) sont régulièrement fournis afin de favoriser le développement des levures et non la fermentation alcoolique.

A titre d'exemple :

- Le débit d'air dans chaque préfermenteur est d'environ 30 Nm³/h.
- 5 kg de sulfate d'ammonium ayant une teneur en azote minimale de 21 % et en eau de 0,2 % maximum (HOLVOET Chimie)

Chaussée de Leuze 144, Leuzesesteenweg Belgique ; INTERFERT, 28, rue d'Armenonville, 92200 Neuilly sur Seine...) et 5 kg de phosphate diammonique d'une pureté de 95 % minimum et ayant une pureté en P_2O_5 comprise entre 52 et 55 % (RHODIA Chimie, 299, rue du Président Pompidou, BP 202, 5 59561 La Madeleine Cedex ; PRAYON France, 80-82, rue de Paris, 93804 Epinay sur Seine Cedex) sont versés toutes les heures dans chaque préfermenteur sous forme d'une solution aqueuse.

Afin d'éviter tout risque d'infection par des micro-organismes étrangers, l'installation industrielle se trouvant en plein air ; les préfermenteurs 10 sont nettoyés et désinfectés à tour de rôle par nettoyage à l'eau filtrée de rivière puis injection de vapeur durant une durée prédéterminée de 10 minutes minimum.

Cela permet par ailleurs d'éviter les infections par des levures dites "sauvages" et la dégénérescence progressive de la souche levurienne 15 prédominante.

Une identification de ces micro-organismes contaminants détectés sur le site a été réalisée : il s'agit de *Brettanomyces bruxellensis*.

Cette levure contaminante a une forme allongée caractéristique très différente de la morphologie de la *Saccharomyces cerevisiae* utilisée.

20 Des observations microscopiques quotidiennes (microscope universel à lumière transmise de marque ZEISS à grossissement X 400) des moûts levurés ont été mises en place sur le site de fabrication et permettent de détecter instantanément l'apparition de ces levures sauvages de type *Brettanomyces*.

25 Des comptages et reconnaissances morphologiques sur boîtes de Petri viennent confirmer à posteriori les observations microscopiques.

Le milieu utilisé pour le comptage sur boîtes de Petri dénommé milieu de MALT WICKERHAM est composé, pour 2 litres de préparation, de :

- extrait de malt 3 g (référence Laboratoire Merck 105391)
- 30 - peptone 5 g (référence Laboratoire Merck 7212)
- extrait de levure 3 g (référence Laboratoire Merck 103753)
- glucose 10 g
- gélose nutritive 10 g (référence Laboratoire Merck 1614)

L'échantillon du moût levuré est dilué au dixième successivement dans du sérum physiologique (solution de NaCl à 9 pour mille) jusqu'à obtenir les dilutions suivantes : 10^{-5} ; 10^{-6} ; 10^{-7} . 1 ml de ces dilutions est ensemencé en profondeur selon les techniques classiques de microbiologie avec le milieu de MALT WICKERHAM.

L'espacement de la fréquence de rajout de la souche souhaitée pour le processus fermentaire a pour conséquence une contamination prioritaire par l'organisme microbien indésirable entraînant une augmentation du temps de fermentation ainsi qu'une diminution de la productivité alcoolique.

Un retard dans la fréquence impérative de rajout de la souche souhaitée et de remplacement des levures anciennes entraîne par ailleurs la nécessité d'accélérer les adjonctions de levures afin d'éradiquer la persistance de la contamination.

15 Procédé de remplacement des levures anciennes par des nouvelles levures

Lors de la propagation de levures fraîches, par exemple un préfermenteur est choisi pour la réalisation de cette opération, les actions à mener sont les suivantes :

Le préfermenteur étant vidangé, le laver à l'eau puis le nettoyer à la vapeur (Par exemple : Pression = 3 bars absolus, température = 130°C) selon une durée prédéterminée de 10 minutes minimum.

On peut également réaliser ce nettoyage avec de l'eau formolée (formol 30,5% : CALDIC France B.P. 722 51056 REIMS) ou tout désinfectant classique tels que :

25 Les familles des composés halogènes : chlore ou iode et leurs dérivés

Les agents d'oxydation (peroxyde d'hydrogène, permanganate de potassium)

Les composés aminés (Bactanios 95 employé en solution de 0,2 à 0,5 %, Anios Pavé du Moulin 59260 Lille Hellemmes).

Les acides et alcalis forts (L'acide sulfurique concentré à 96% employé à une dilution de 5 à 10%, Tessenderlo Chemie rue du Trône 130 B Bruxelles), (La lessive de soude concentrée à 30,5 %, employée à chaud à une dilution de 1 à 2 %, CLEMENT RPC Ets LOMME Rue Pelouze, BP 117 59461 LOMME Cedex) (Agrobac employé à des dilutions de 2 à 7,5 % : MINOT APURA 88 rue de Marquillies 59044 Lille Cedex), (Agromousse

employé à des dilutions de 5 à 7%, MINOT APURA 88 rue de Marquillies 59044 Lille Cedex). (L'Aniosteril acide désinfectant employé à des doses de 1 à 1,5% Anios Pavé du Moulin 59260 Lille Hellemmes), (GALOR C7 employé à des doses de 1 à 5%, Anios Pavé du Moulin 59260 Lille Hellemmes).

Les aldéhydes et tensioactifs (Anios W4 employé à 0,5 % en pulvérisation temps de contact 5 à 10 minutes ou en circulation à 0,4 % temps de contact 20 à 30 minutes, Anios Pavé du Moulin 59260 Lille Hellemmes).

Les pourcentages indiqués ci-dessus sont exprimés en poids.

La procédure de nettoyage – désinfection peut comporter 5 phases :

- pré lavage ou pré-nettoyage : élimination mécanique des souillures grossières par jet d'eau,
- nettoyage : élimination du reste des souillures à l'aide d'une solution de nettoyage,
- rinçage : élimination de la solution de nettoyage dans laquelle les souillures ont été dispersées,
- désinfection : destruction chimique de la biocontamination de surface à l'aide d'une solution désinfectante,
- rinçage final : élimination de la solution désinfectante résiduelle.

Une combinaison des opérations citées ci-dessus permet dans tous les cas d'aboutir à une désinfection suffisante du préfermenteur destiné à recevoir les levures fraîches sans contamination avec les anciennes levures.

Le préfermenteur est rempli à un tiers environ de sa capacité avec du jus de diffusion.

On règle rigoureusement la température dans le préfermenteur (inférieure à 34°C).

Les 300 kg de levures fraîches à environ 32% en poids de matières sèches sont ajoutées dans le préfermenteur.

Un apport en sels nutritifs et en air est réalisé et régulé.

L'alimentation en jus de diffusion est poursuivie tout en contrôlant la densité et la température dans le préfermenteur.

Ce dernier, une fois rempli, est mis en communication successivement avec les autres préfermenteurs préalablement vidés, nettoyés et stérilisés à la vapeur ou chimiquement de façon à ne pas contaminer les nouvelles levures par les anciennes.

- 5 On alimente ainsi progressivement les 4 préfermenteurs avec les nouvelles levures.

Fermentation

- 10 L'objet de la présente invention est principalement applicable en fermentation dite continue, procédé par lequel les fermenteurs travaillent en cascade, c'est-à-dire que la fermentation n'est que partielle dans chaque fermenteur jusqu'au dernier où la fermentation est achevée.

- 15 L'alimentation des fermenteurs en moût levuré et jus de diffusion est réalisée en continu sur le ou les deux ou les trois premiers fermenteurs, appelés fermenteurs de tête, les fermenteurs suivants étant nommés fermenteurs de chute. Le nombre de fermenteurs de tête et la répartition des alimentations en moûts dépendent des volumes des fermenteurs.

La température dans les fermenteurs est maintenue entre 30 et 35°C.

- 20 La fermentation se poursuit ensuite en cascade dans chaque fermenteur jusqu'à ce que la teneur en sucre du vin obtenu soit inférieure à 3 g/l et, de préférence à 2 g/l et mieux à 1 g/l, pour un degré alcoolique du vin de 8 à 12% en volume (fonction de la teneur en sucres dans le jus de diffusion), le moût fermenté du dernier fermenteur est alors envoyé, toujours
25 en continu, dans les bacs à vin, avant d'alimenter l'atelier de distillerie.

- On détermine le degré alcoolique des vins par voie enzymatique à l'aide de l'analyseur biochimique YSI 2700 SELECT (ROUCAIRE, 2 av. du Pacifique BP 78 Les Ulis 91493 Courtaboeuf cedex). On effectue une dilution au 50^{ème} avec de l'eau déminéralisée de l'échantillon de vin. Cet échantillon
30 dilué et filtré est ensuite passé dans l'analyseur biochimique YSI 2700 SELECT qui donne automatiquement la teneur en éthanol en g/l. Pour obtenir le résultat en degré alcoolique (% volume par volume), il suffit de diviser cette valeur par 7.88 après avoir pris en compte le facteur de dilution.

- 35 On détermine la teneur en glucose restant par voie enzymatique à l'aide de l'analyseur biochimique YSI 2300 STAT PLUS (ROUCAIRE, 2 av.

du Pacifique BP 78 Les Ulis 91493 Courtaboeuf cedex). On effectue les dilutions nécessaires des échantillons selon la teneur supposée en glucose restant. On filtre l'échantillon et on le passe ensuite dans l'analyseur biochimique YSI 2300 STAT PLUS qui donne une teneur en glucose restant exprimée en mg/dl. Pour l'obtenir en g/l, il suffit de multiplier le résultat par 100 après avoir pris en compte le facteur de dilution éventuel.

Production de flegmes (alcool brut)

(La) ou les colonne(s) distillatrice(s) peuvent fonctionner en parallèle ou en série (double effet) sous vide ou sous pression, sont chauffées par de la vapeur soit en injection directe, soit par l'intermédiaire de bouilleurs, soit par thermocompression.

Cette vapeur peut également chauffer les colonnes de Lütter quand elles existent, les vinasses étant généralement recyclées dans l'étape de diffusion de la sucrerie.

Le moût fermenté ou « vin » provenant de la fermentation, après passage dans un échangeur thermique, alimente la ou les colonnes distillatrices. Les vapeurs d'alcools des colonnes sont condensées dans des échangeurs thermiques.

L'alcool ou flegme est concentré à 90-96 % volume (selon les contraintes d'investissement) dans la ou les colonnes distillatrices puis refroidi dans des échangeurs avant stockage. Une extraction des impuretés volatiles peut être réalisée sur la ou les colonnes de distillation afin d'améliorer la qualité des flegmes. Ces mauvais goûts extraits et moins valorisables sont stockés dans une cuve différente.

Exemple illustrant la présente invention

On remplace les levures anciennes à une fréquence inférieure à 4 jours par 300 kg de levures fraîches (ex : *Saccharomyces cerevisiae*) pressées à 32 % de matières sèches; chaque gramme de produit contient environ 10 milliards de cellules vivantes, ceci pour un jus de diffusion de betteraves à une concentration en sucres égale à 16%. L'utilisation de levures lyophilisées ou de crème concentrée commerciale de levures (*Saccharomyces cerevisiae* ou pombe) permet également d'aboutir au même résultat.

- Le remplacement régulier des anciennes levures a permis de s'affranchir totalement des contaminations par des organismes indésirables et d'éviter ainsi un arrêt complet de l'installation, comme cela était le cas précédemment et comme cela arrive fréquemment sur d'autres unités de
- 5 fabrication.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de production d'éthanol, qui consiste à mettre en contact avec une levure du genre *Saccharomyces* dans un préfermenteur du
5 jus de diffusion de sucrerie soit pendant une durée suffisamment faible, notamment pendant 5 à 6 heures en fonction de la teneur en sucres dans le jus de diffusion, soit par dilution, par exemple, avec de l'eau et/ou des vinasses pour obtenir une suspension de levures d'un degré alcoolique inférieur à 6% en volume, puis à mettre la suspension de levure en contact
10 avec du jus de diffusion de sucrerie pendant une durée suffisante pour obtenir un vin ayant une teneur en sucres inférieure à 3g/l, de préférence inférieure à 2g/l et mieux inférieure à 1g/l avec un degré alcoolique du vin de 8 à 12% en volume (fonction de la teneur en sucres dans le jus de diffusion) et à distiller le vin pour obtenir de l'éthanol, caractérisé en ce qu'il consiste à enlever
15 sensiblement toutes les levures présentes dans le préfermenteur et à les y remplacer par des levures fraîches à des intervalles de temps tels que la concentration en micro-organismes, autres que la levure du genre *Saccharomyces*, dans le préfermenteur reste inférieure à un seuil donné pendant l'intervalle suivant le remplacement des levures.
- 20 2. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que le seuil est inférieur à 10^7 cellules par millilitre.
3. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que le seuil est inférieur à 10^6 cellules par millilitre.
- 25 4. Procédé suivant l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il consiste à remplacer toutes les levures dans le préfermenteur par des levures fraîches dès qu'il apparaît au microscope un micro-organisme de forme allongée.
5. Procédé suivant l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il consiste à remplacer toutes les levures du

préfermenteur par des levures fraîches en une quantité telle que l'on obtient dans le préfermenteur une concentration au moins égale à 10^6 cellules par millilitre et, de préférence, à 10^7 cellules par millilitre.

- 5 6. Procédé suivant l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il consiste à engager de 25 à 50% du poids de jus de diffusion dans le préfermenteur pour obtenir la suspension de levures et à mettre le reste du jus de diffusion en contact avec la suspension de levures.

- 10 7. Procédé suivant l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il consiste à mettre le jus de diffusion en contact avec une levure du genre *Saccharomyces* à une température de 30 à 35°C.

8. Procédé suivant l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est effectué en continu.

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2812657
N° d'enregistrement
national

FA 590606
FR 0010113

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
Y	CH 554 414 A (MUELLER HANS MAENNEDORF) 30 septembre 1974 (1974-09-30) * le document en entier *	1-8	C12P7/14
Y	US 4 419 448 A (KRETZ ROLF H) 6 décembre 1983 (1983-12-06) * colonne 1, ligne 27 - ligne 37 *	1-8	
Y,D	DELIA-DUPUY M L ET AL: "Contamination par les levures Brettanomyces dans les fermentations alcooliques" M.A.N. MICROBIOLOGIE ALIMENTS NUTRITION, LE PLESSIS-ROBINSON, FR, vol. 13, 1995, pages 349-359, XP002119778 ISSN: 0759-0644 * le document en entier *	1-8	
E	FR 2 789 400 A (BIO ETHANOL NORD PICARDIE) 11 août 2000 (2000-08-11) * le document en entier *	1-8	
A	FR 2 697 266 A (UNGDA) 29 avril 1994 (1994-04-29)		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
A	US 4 743 451 A (KALINA VLADIMIR) 10 mai 1988 (1988-05-10) * revendications *	1	C12P
A	GB 1 309 338 A (BRAUEREI IND AG FUER) 7 mars 1973 (1973-03-07) * revendications *	1	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
14 juin 2001		Coucke, A	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			