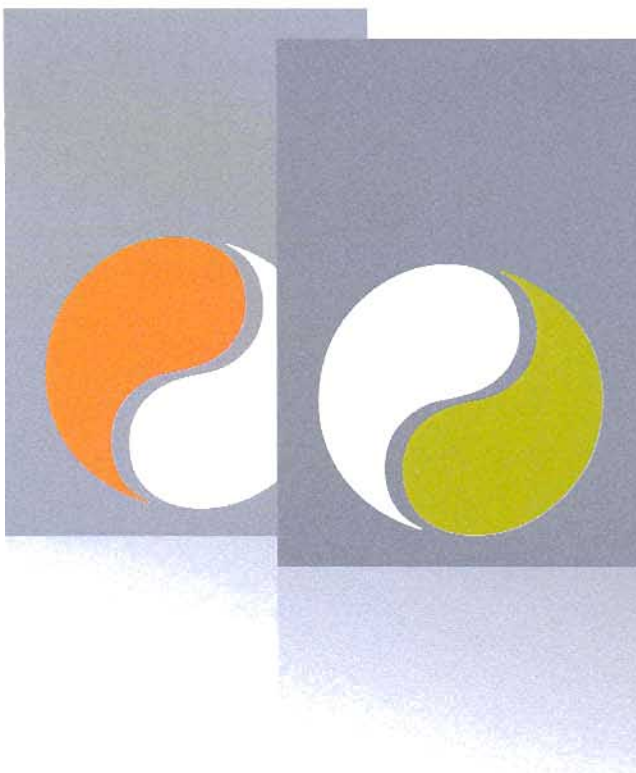


LEVEL²™

Ces 10 dernières années, un effort considérable a été entrepris pour **mieux comprendre** le rôle des levures non *Saccharomyces* dans l'expression aromatique des vins blancs. Level² TD est la première concrétisation du travail engagé par la **R&D de Lallemant** qui propose aujourd'hui **un couple de levures** (une levure non conventionnelle et une levure *Saccharomyces cerevisiae*) en inoculation séquentielle afin de favoriser **la complexité aromatique** des vins blancs peu aromatiques.



TD 

L'écologie des populations de levures présentes dans le moût en début de fermentation est complexe

La fermentation alcoolique est la phase principale durant laquelle les levures contribuent de façon sensible au profil aromatique du vin. Plusieurs mécanismes sont à l'origine de ces évolutions. Il peut s'agir de la production d'éthanol qui favorise l'extraction de composés aromatiques depuis la phase solide, de la production de métabolites secondaires (alcools, esters...), de l'autolyse des levures ou de la production par celles-ci, d'enzymes qui hydrolysent des précurseurs aromatiques en leur composé actif.

Récemment, de nombreux travaux permettent de mieux comprendre l'écologie des populations de levures au cours de la fermentation alcoolique.

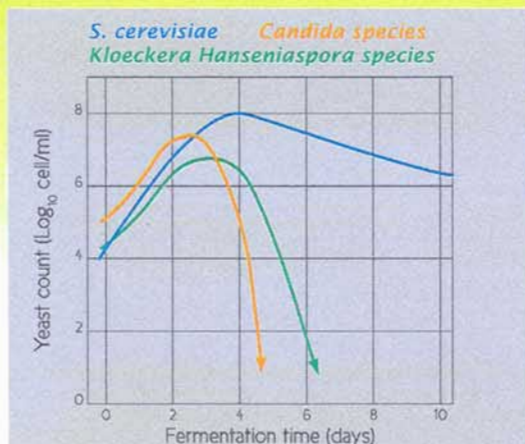


Fig. 1 Croissance des levures durant la fermentation alcoolique spontanée d'un vin (Fleet, 1990)

La diversité des levures présentes sur moût est en premier lieu le reflet de la diversité des levures qui peuvent exister sur le raisin. *Saccharomyces cerevisiae* n'est pas la levure la plus présente sur le raisin. En fait, sur raisin mûr, les levures les plus représentées appartiennent aux espèces *Hanseniaspora* ou *Metschnikowia*.

- Les levures reflètent aussi les flores présentes sur les équipements de la cave, dans l'environnement de la cave (air, insectes...) et aussi, celles du levain d'inoculation. *Saccharomyces cerevisiae* représente seulement une faible part des levures présentes en début de fermentation. On observe plutôt des levures dites non conventionnelles telles que *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia* ou *Torulaspota*. Ces levures non conventionnelles participent à la complexité aromatique en agissant comme productrices d'arômes et métabolites ou en excréant des enzymes qui permettront la production de composés aromatiques.

- L'espèce la mieux adaptée au moût, *Saccharomyces cerevisiae* prend rapidement le dessus sur les autres espèces au bout du 2 ou 3^{ème} jour de la fermentation alcoolique.

- La sélection et l'utilisation de levures sèches actives (LSA) permet de maîtriser les déviations organoleptiques potentielles.

1st Level: Sélection et utilisation d'une levure non conventionnelle par Lallemand : La *Torulaspora delbrueckii*

Parmi les espèces levuriennes présentes dans les moûts en début de fermentation, l'espèce *Torulaspora delbrueckii* est souvent décrite dans la littérature scientifique, comme une espèce qui contribue de façon positive à la complexité aromatique des vins (Ciani, M., and G. Picciotti. 1995). A la recherche de solutions innovantes pouvant contribuer à l'amélioration de la qualité des vins, l'équipe R&D de la société Lallemand s'est intéressée à différentes souches de cette espèce isolée à partir de différents moûts de raisin. Leurs métabolismes et interactions avec différentes souches connues de *Saccharomyces cerevisiae* ont particulièrement été étudiés pour la valorisation de cépages blancs à faible potentiel aromatique. De plus, autant la connaissance de la production de souche de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* ne présente à ce jour que très peu de secret

pour le secteur agro-alimentaire, autant celle des autres espèces (non conventionnelles) était jusque là inexistante, en raison de leur physiologie très différente.

L'obtention d'une qualité élevée et régulière de cellules viables a donc dû faire l'objet d'études de procédés de production et de technologies spécifiques.

La mise à disposition aujourd'hui d'une combinaison de souches de ces 2 espèces sous forme sèche active peut donc être considérée comme une innovation pour le monde de l'œnologie.



Torulaspora delbrueckii

Cette levure que les équipes Lallemand ont réussi à reproduire a été sélectionnée pour sa capacité à produire des arômes particuliers présents que l'on retrouve souvent dans les fermentations spontanées.

1ST LEVEL



Utilisation de la *Torulaspora delbrueckii* en inoculation séquentielle avec *Saccharomyces cerevisiae*

• L'association d'une levure non conventionnelle avec une levure *Saccharomyces cerevisiae* est nécessaire pour conduire la fermentation jusqu'à son terme. Lallemand a fait le choix d'utiliser ces 2 levures de façon séquentielle dans un souci de reproduire les successions de populations des fermentations spontanées décrites précédemment. *Torulaspora delbrueckii* est introduite en début de fermentation puis, après une baisse de 10 à 15 pts de densité, la *Saccharomyces cerevisiae* est à son tour introduite entraînant naturellement la disparition rapide de la *Torulaspora delbrueckii*.

• Depuis 2004, Lallemand a réalisé des essais dans de nombreux pays (France, Italie, Espagne, USA, Allemagne, Argentine...) qui ont permis d'identifier parmi les souches de *Saccharomyces cerevisiae* LA souche complémentaire avec la *Torulaspora delbrueckii*. Ce couple de levures, **Level² TD**, apporte une complexité aromatique et une sécurité fermentaire.

• L'inoculation séquentielle permet d'apporter de la complexité aromatique de façon contrôlée en favorisant la perception de certains esters plutôt que d'autres, sans pour autant déséquilibrer le vin.

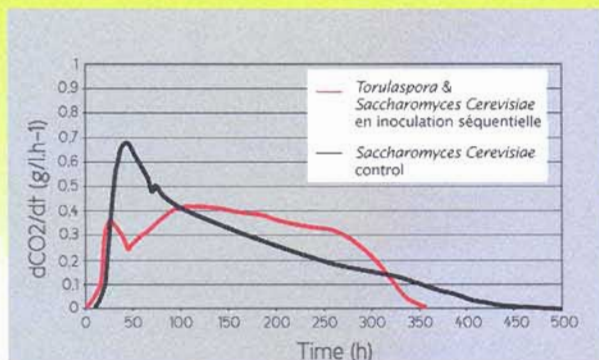


Fig. 2 : Cinétiques de fermentation en inoculation séquentielle et conventionnelle (Moût synthétique carencé en stérols, 220 g/L sucre : 13% alcool potentiel : Température de fermentation 20°C)

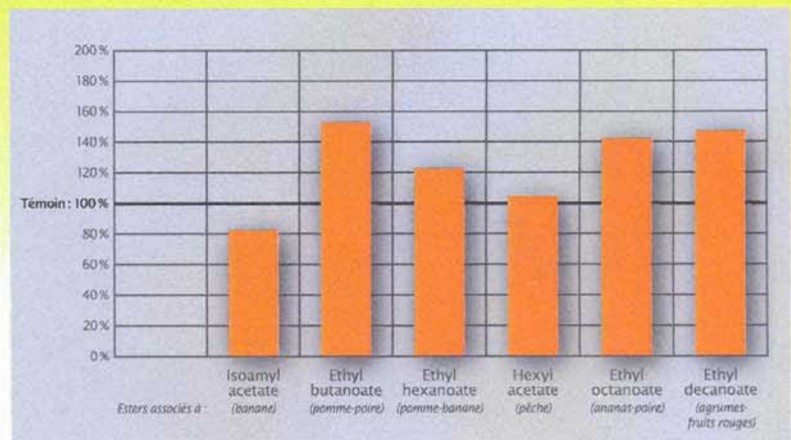
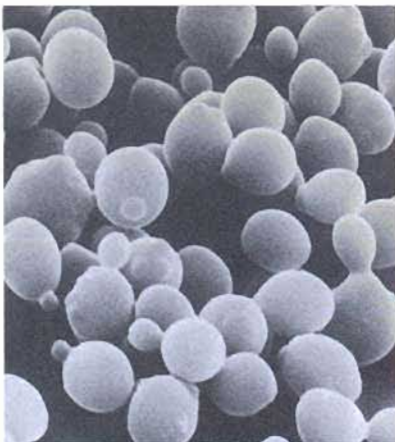


Fig. 3 : Evolution du profil en esters par rapport au vin fermenté uniquement avec *Saccharomyces cerevisiae*



Saccharomyces cerevisiae

Une levure *Saccharomyces cerevisiae* a été choisie spécifiquement pour ses capacités à interagir positivement avec la *Torulaspora delbrueckii* et à favoriser l'expression aromatique et la sécurité fermentaire.

2ND LEVEL

Profil sensoriel des vins

Les différents essais permettent de retrouver des caractéristiques communes accrues, comme les caractères sucré, floral, fruité, tandis que le caractère piquant est moins prononcé.

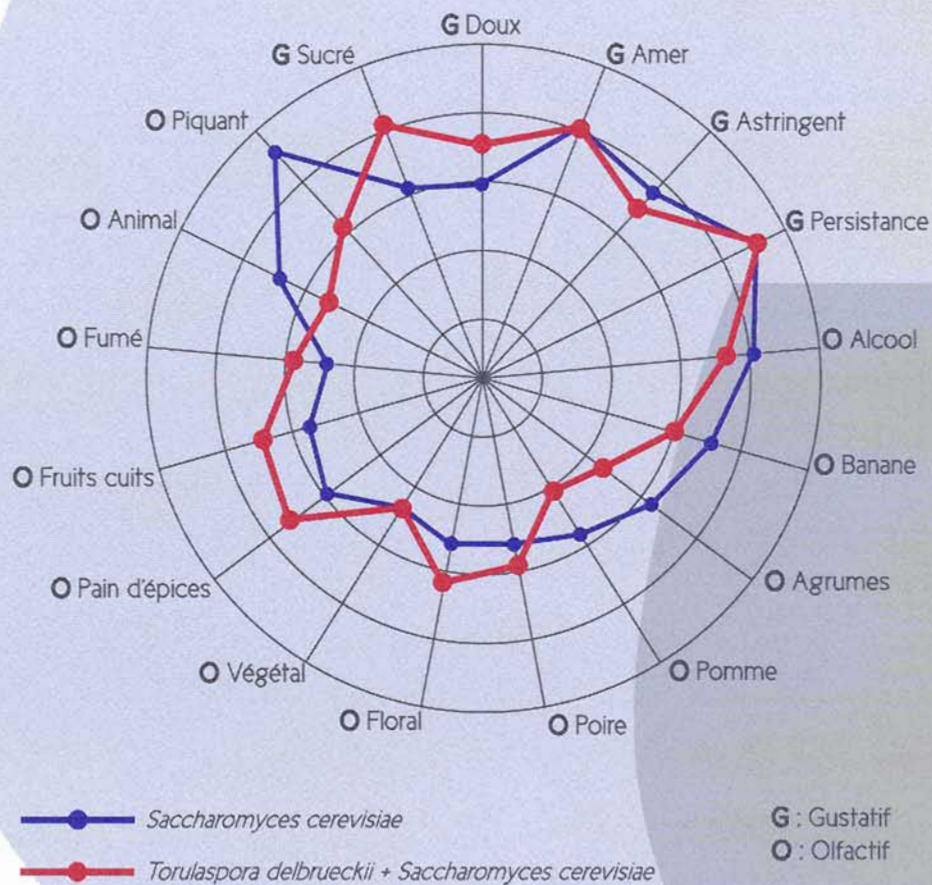


Fig. 4 : Comparaison de profils sensoriels d'un vin fermenté en inoculation séquentielle par rapport au vin fermenté avec *Saccharomyces cerevisiae*.

Les dégustations montrent que les vins fermentés en inoculation séquentielle sont significativement préférés aux vins fermentés uniquement avec *Saccharomyces cerevisiae*.



PROTOCOLE

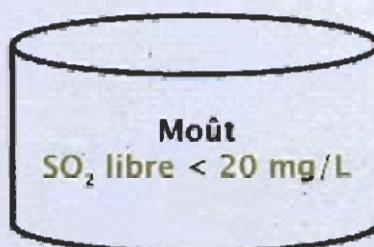
1 Préparation du moût

Au moment de l'inoculation de la *Torulaspota*, veiller à ce que la teneur en **SO₂ libre du moût ne dépasse pas 20 mg/L**.

Éviter autant que possible l'utilisation de SO₂ en privilégiant l'utilisation de gaz inerte ou de neige carbonique.

Point d'importance

SO₂ libre du moût



PROTECTION ET NUTRITION

Les recommandations pour un levain conventionnel s'appliquent de la même façon pour la *Torulaspota* et la *Saccharomyces* en fonction de la teneur en azote assimilable et du profil du vin recherché.

2 1st Level

Torulaspora delbrueckii

Inoculation
de la *Torulaspora*

Densité initiale
Inoculation
Torulaspora delbrueckii
25 g/hL

! **Point d'importance :**
- Protocole de réhydratation :
température différente
d'une levure classique (30°C)

3 2nd Level

Saccharomyces cerevisiae

Inoculation
de la *Saccharomyces*

Juste après 2nd Level
Complémenter systématiquement
en nutriment complexe
(apport de 30 mg/L d'azote assimilable)

Densité initiale - 45 points
Complémenter si nécessaire
en nutriment complexe
(selon la carence azotée initiale sur moût)

Densité initiale
- 10 / 15 points

Inoculation
Saccharomyces cerevisiae
25 g/hL

! **Point d'importance :**
- Moment d'inoculation
- Protocole de réhydratation classique (37°C)
- Protection des levures si nécessaire

Préparation

Réhydrater la levure dans 10 fois son poids d'eau à 30°C. Laisser reposer 15 minutes avant de mélanger doucement. Puis acclimater le levain à la température en y ajoutant progressivement un volume équivalent de moût. La différence de température entre la solution de réhydratation et le moût ne doit pas dépasser 10°C. La durée totale de réhydratation ne doit pas dépasser 45 minutes. Inoculer à 25 g/hL.

Préparation

Réhydrater la levure dans 10 fois son poids d'eau à 37°C. Laisser reposer 15 minutes avant de mélanger doucement. Puis acclimater le levain à la température en y ajoutant progressivement un volume équivalent de moût. La différence de température entre la solution de réhydratation et le moût ne doit pas dépasser 10°C. Après une baisse de 10 à 15 points de densité du moût par rapport à la densité de départ du moût, inoculer avec le levain de réhydratation à 25 g/hL. Au 1/3 de la fermentation alcoolique, compléter en nutriment complexe si nécessaire en couplant avec un apport d'oxygène. En fin de fermentation alcoolique, déclenchement de la fermentation malolactique selon le choix de vinification.

TÉMOIGNAGES



Œnologues : Mr. Tomaz Vieira da Cruz et Mr. Bernardo Magalhães, région d'Alentejo (Portugal), vinifications 2008, *Torulaspota delbrueckii* en utilisation séquentielle avec *Saccharomyces cerevisiae*.

Les variétés portugaises de raisin blanc ne sont pas aromatiques par nature et encore moins quand elles sont cultivées dans des régions chaudes comme l'Alentejo. La structure et le volume en bouche sont leurs points forts alors que la composante aromatique est clairement le point le plus délicat. En effet, l'utilisation radicale de certaines techniques (fermentations à très basses températures ou clarification trop importante des moûts) peut conduire à des vins maigres de corps avec des arômes "artificiels" peu cohérents et trop volatils.

En utilisant la *Torulaspota* en inoculation séquentielle, nous avons voulu reproduire le processus de fermentation qui existait avant l'utilisation de levain de *Saccharomyces* lorsque des flores plus complexes permettaient d'obtenir une palette d'arômes plus importante.

Trois cépages typiques de l'Alentejo ont été choisis, provenant de vignes de plus de trente ans, le **Roupeiro**, le **Rabo de Ovelha** et le **Perrum**. Pouvant recevoir les raisins séparément, mais ne pouvant mener la vinification que conjointe, nous avons décidé de réaliser une macération pré-fermentaire avec le Roupeiro et le Perrum et de préserver l'élégance primaire du Rabo de Ovelha. Après un pressurage léger des baies entières, le moût du Rabo de Ovelha est ajouté au moût issu de la macération pré-fermentative. Nous avons ensuite mené à bien 18 heures de débouillage jusqu'à obtenir la turbidité désirée : un moût de tonalité claire, à tendance verte, aromatique et sans ombre d'oxydation.

Ce moût a ensuite été divisé en deux parties : La première partie du moût a été introduite dans une cuve de 9500 litres où il a été vinifié selon la stratégie définie par l'équipe d'œnologues de la cave, à savoir, l'utilisation de *Torulaspota delbrueckii* puis du levain habituellement utilisé

par la cave et compatible avec *Torulaspota*, 2 mois d'élevage sur lies, bâtonnage couplé à une utilisation de Lallzyme MMX® et d'additions d'oxygène à dose chirurgicale.

Ce vin destiné à être commercialisé, lorsque l'on prélève un échantillon après 2 jours sans bâtonnage, présente de manière curieuse une exubérance aromatique énorme, avec des arômes tels qu'ananas et agrumes mûrs. De manière surprenante, le volume en bouche de ce vin est une chose fantastique.

La seconde partie a été fractionnée dans deux cuves de 100 litres et la vinification a été menée en suivant rigoureusement le protocole fourni par Lallemant. Dans l'une des cuves, l'inoculation séquentielle a été réalisée tandis que l'autre a été inoculée uniquement avec *Saccharomyces* comme cuve témoin.

Ces petites cuves sont stables, une addition de dioxyde de soufre et de CO₂ a été réalisée. Les lies ont été séparées et additionnées aux lies de la grande cuve. Ces vins sont en attente de collage avant embouteillage.

Organoleptiquement, une grande différence est à noter pour la finesse, l'élégance d'arôme du vin de l'essai obtenu par l'inoculation séquentielle en comparaison avec l'essai réalisé uniquement avec *Saccharomyces*. Il se détache de cet essai des arômes d'ananas, qui avec le temps vont en s'améliorant. Il y a deux mois cette note n'était pas claire, il y a un mois elle était subtile, (fin novembre 2008) en ce moment c'est marquant. En bouche, cet arôme aide à améliorer la fraîcheur du vin, en donnant une note d'allégresse au volume en bouche.

Nous remercions la cave Encostas de Estremoz qui nous a permis de faire ces essais.

BIBLIOGRAPHIE

Heard, G. M., and G. H. Fleet. 1985. Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. *Applied and Environ. Microbiol.* 50:727-728.

Fleet, G. H. 1990. Growth of yeast during wine fermentations. *Journal of Wine Research.* 3:211-223.

Martinez, J., F. Toledano, C. Millan, and J.M. Ortega. 1990. Development of alcoholic fermentation in non-sterile musts from "Pedro Ximénez" grapes inoculated with pure cultures of selected yeasts. *Food microbiology.* 7:217-225.

Mora, J., J. L. Barbas, and A. Mulet. 1990. Growth of yeast species during the fermentation of musts inoculated with *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Am. J. Enol. Vitic.* 41:156-159.

Mauricio, J. C, S. Guijo, and J. M. Ortega. 1991. Relationship between phospholipids and sterol contents in *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulasporea delbrueckii* and their fermentation activity in grape musts. *Am. J. Enol. Vitic.* 42:(4)301-308.

Etievant, P. 1991. Wine. In *Volatile compounds in food and beverages*, Maarse, H. (ed). Marcel Dekker Inc., New York, USA. 483-546.

Ciani, M., and G. Picciotti. 1995. The growth kinetics and fermentation behaviour of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *Biotechnol. Letters.* 17:1247-1250.

Ciani, M., L. Ferraro, and F. Fatichenti. 1996. Enhanced glycerol content in wines made with immobilized *Candida stellata* cells. *Appl. Env. Microbiol.* Jan. 1996 62:128-132.

Ciani, M. 1997. Role, enological properties and potential use of non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Recent Res. Dev. Microbiol.* 1:317-331.

Ciani, M., and F. Maccarelli. 1998. *Oenological properties of non-Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14:199-203.

Ciani, M., and L. Ferraro. 1998. Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines. *J. Appl. Microbiol.* 85:247-254.

Ferraro, L., F. Fatichenti, and M. Ciani. 2000. Pilot scale vinification process using immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Bioch.* 35(2000):1125-1129.

Fleet, G. H. 2003. Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. of Food Microbiology* 86:11-22.