

Fermentation alcoolique et levurage indigène



Avec le participation de :

Doriane VISSE
Référénte technique
Sud-Est



Clutier Hector
Œnologue conseil
Consultant en viticulture

A. La fermentation alcoolique

1. Le métabolisme des levures
2. Les conditions du développement des levures
3. Les facteurs de sélection d'une levure

B. La biodiversité microbienne en œnologie

1. Les levures et bactéries du vin
2. Evolution des populations microbiennes au cours de la fermentation
3. Intérêt des levures non saccharomyces : le cas de la bioprotection

C. Le levurage indigène

1. Réalisation d'un pied de cuve en levures indigènes
2. La sélection de levures indigènes
3. Laboratoire Excell : présentation du protocole biodiversité pour la production de crèmes de levures

1. Le métabolisme des levures

Les levures, qu'elle soit saccharomyces ou non saccharomyces disposent de deux manière de produire de l'énergie :

Métabolisme	Equation Bilan	Condition du milieu
Respiratoire	$C_6H_{12}O_6 + 6 O_2 + 6 H_2O \longrightarrow 6 CO_2 + 12 H_2O$ (Glucose)	Aérobie stricte (avec O ₂)
Fermentaire	$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2 C_2H_5OH + 2 CO_2$ (Ethanol)	Aérobie ou anaérobie (sans O ₂)

La **fermentation alcoolique** est un processus biochimique par lequel des sucres sont transformés en alcool dans un milieu liquide privé d'air. La plupart des microorganismes qui ont la capacité de fermentation alcoolique utilisent cette réaction pour gagner temporairement de l'énergie quand l'oxygène nécessaire à la respiration cellulaire manque.

Lorsque la concentration en sucre >10g/l :

- la respiration est impossible quelle que soit la concentration d'O₂
- le métabolisme est exclusivement fermentaire
- l'ajout d'O₂ accélère la fermentation



2. Les conditions de développement des levures

Activateur de FA

- 1- Facteurs de croissance
- 2- Facteur de survie : stérols et acides gras insaturés
- 3- Facteur de support de levure
- 4- Facteur de concentration

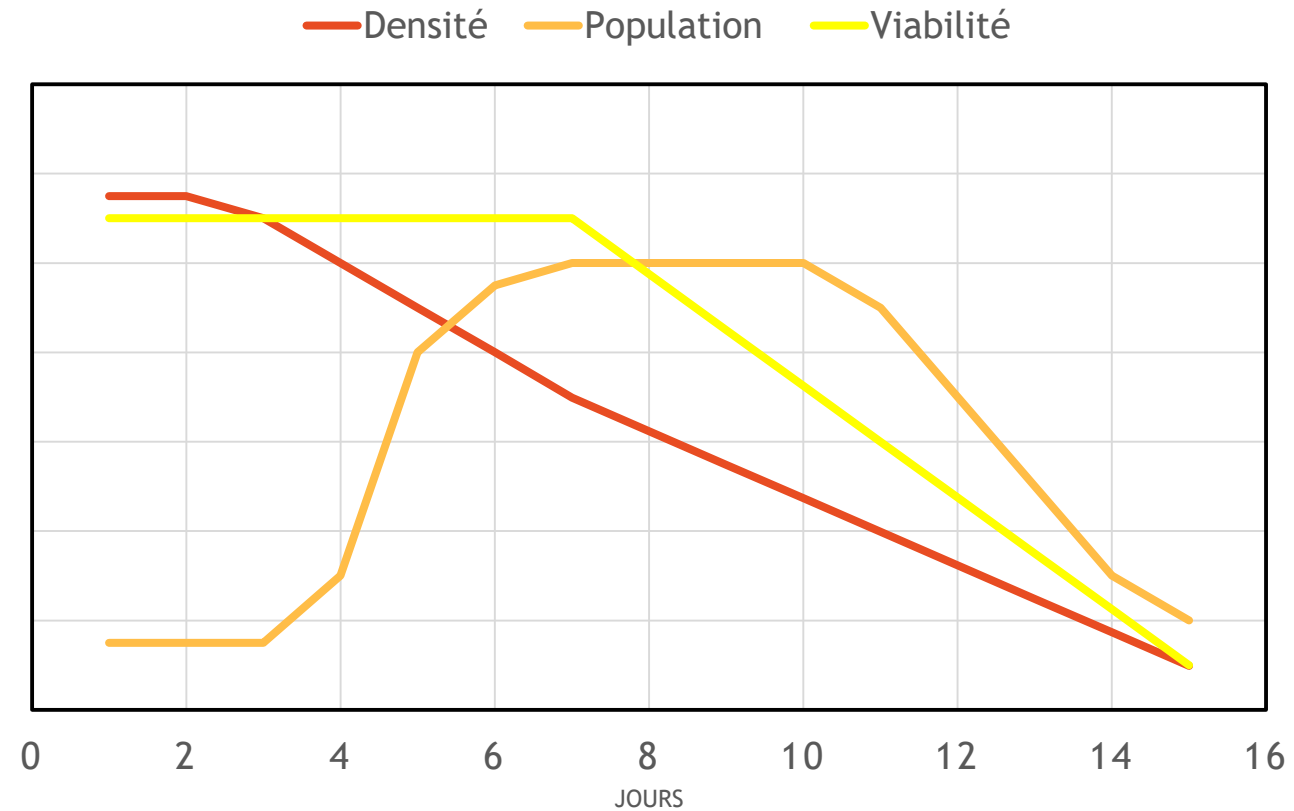
Inhibiteur de FA

- 1- Stress
- 2- Ethanol
- 3- Acides gras saturés
- 4- Divers

Facteurs Physico-chimiques

- 1- pH >3
- 2- Température
- 3- Oxygène 3
- 4- Clarification, débourbage
- 5- Remise en suspension des levures
- 6- SO₂

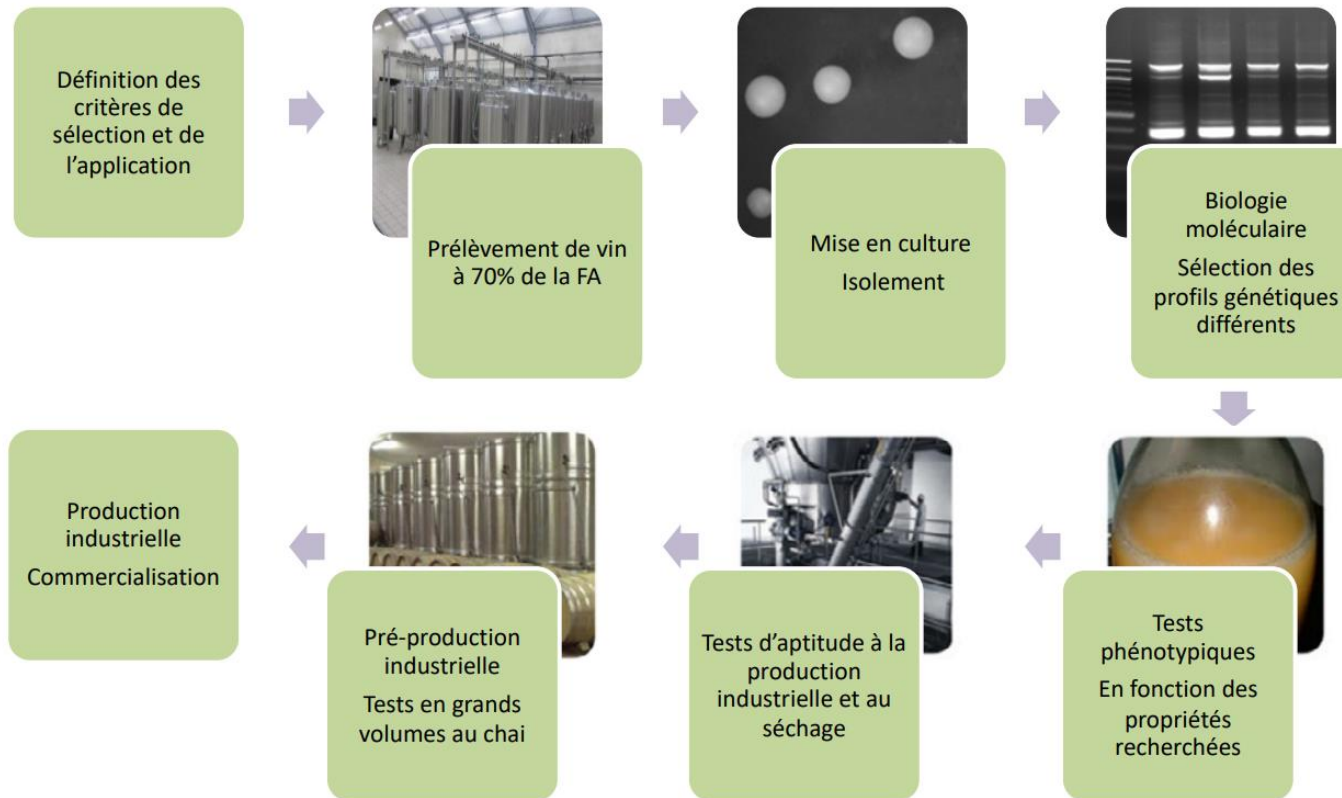
CINÉTIQUE DE FERMENTATION ALCOOLIQUE



3. Les facteurs de sélection d'une levure

Caractérisation d'une levure :

- Identification botanique : Genre, espèce, (variété)
- Phénotype Killer
- Production d'écume
- Déroulement de la fermentation alcoolique et production de certains composés (critère primordial dans la réussite de la vinification)
- Tolérance au SO₂
- Capacité de production de H₂S
- Détermination des besoins en azote
- Tolérance à l'alcool
- Gamme de température optimale de fermentation



Une meilleure connaissance des levures grâce à la génétique !

1. Les levures et bactéries du vin

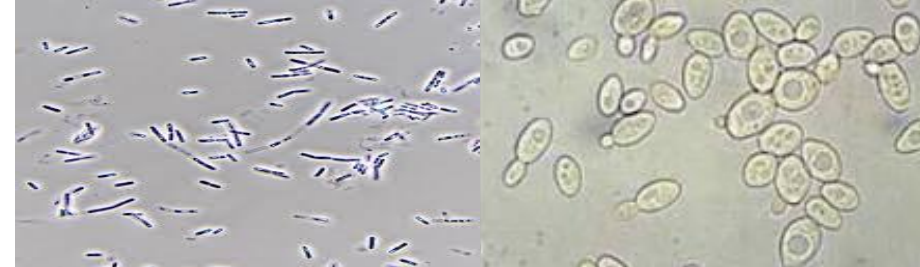
Il existe un très grand nombre de microorganismes dans l'écologie des raisins et du vin :

Levures :

- Saccharomyces (*Cerevisiae*, *Bayanus*, *Uvarum* etc.)
- Non Saccharomyces (*Hanseniaspora*, *pichia*, *Kloekera* etc.)

Bactérie:

- Bactérie Lactique (*Oenococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*)
- Bactérie Acétique (*Acetobacter*, *Gluconobacter*)



B. La biodiversité microbienne en œnologie

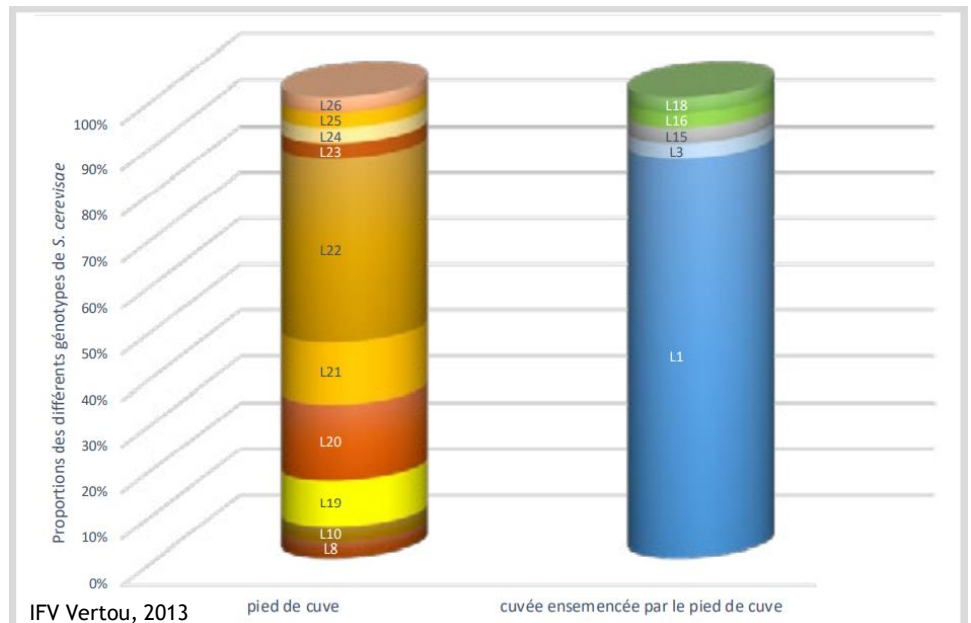
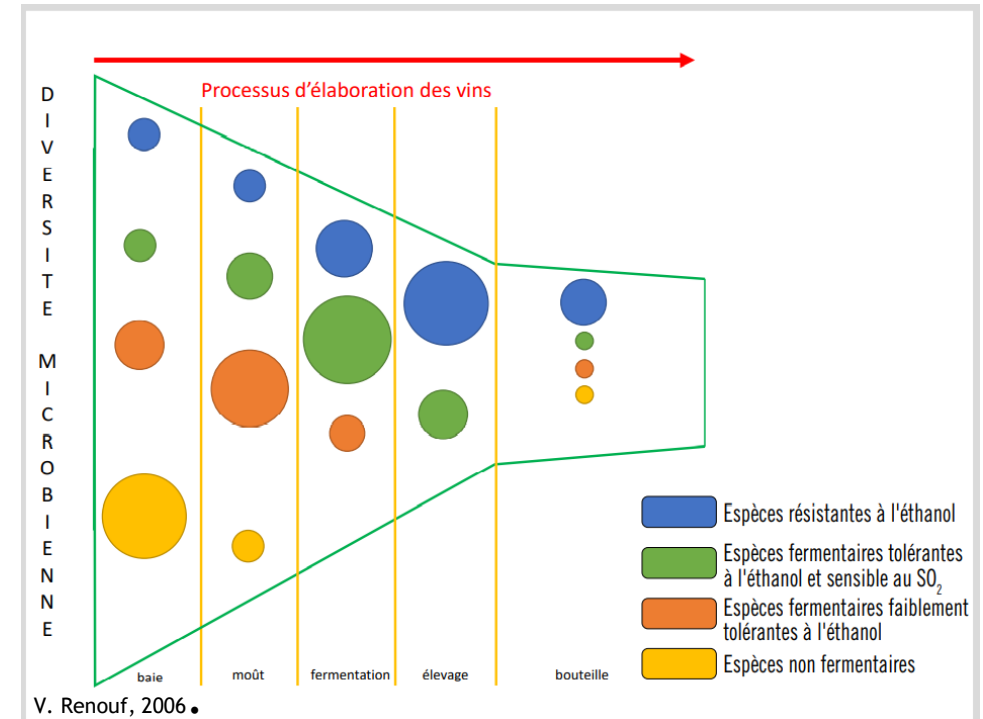
Brettanomyces	« BRETT » (animal, écurie, sueur de cheval)	Phénols volatils : Ethyl 4 phénol, Ethyl 4 gaïacol	Biotransformation des acides cinamiques pré-curseurs présents dans le raisin en molécules phénolées
	GOÛT DE SOURIS (urine souris, pop corn, voml...)	ETHP, ATHP, APY	Production à partir de l'éthanol des molécules, favorisée par la présence d'ions métalliques (Fe), un pH élevé et la présence de D-fructose
Candida	EVENT (pomme flétrie)	Acétate d'éthyl (éthanal)	Oxydation de l'éthanol en éthanal (acétaldéhyde) en présence de catalyseur (Fe ou Cu) ou sous l'action de levure ou de bactérie. / Combinaison de l'acide acétique et de l'éthanol par les bactéries lactiques avant ou après FA
	ACESCENCE (colle scotch, vernis à ongles)		
Hanseniaspora (ex <i>Kloekera apiculata</i>)	PIQÛRE acétique (vinaigre)	Acide acétique / acétate d'éthyl (éthanal)	Oxydation de l'éthanol en éthanal ou en acide acétique / combinaison acide acétique et éthanol condition ZERO SO2
Metschnikowia (certaines espèces)	ACESCENCE (colle scotch, vernis à ongles)		
SchizoSaccharomyces	REDUIT	H2S, mercaptan	Métabolisme de la levure pendant la FA
Saccharomyces (certaines espèces)	Désacidification importante		Levures démaliquantes : dégradation de l'acide malique des moûts et des vins
	ACESCENCE (colle scotch, vernis à ongles)	Acétate d'éthyl (éthanal)	Combinaison de l'acide acétique et de l'éthanol par les bactéries lactiques avant ou après FA
ZygoSaccharomyces	Refermentation	Ethanol, CO2	Refermentation des vins sucrés (VDN, édulcorés...)

Lactobacillus	PIQÛRE lactique	Acide acétique	Fermentation des sucres et production d'acide acétique
	TOURNE (perte d'acidité, hausse de la volatile, ac. lactique et odeur de choucroute)	H2S, CO2....	Dégradation de l'acide tartrique par les Lactobacillus le plus souvent
Pediococcus Lactobacillus	Amines biogènes	Amines biogènes	Biotransformation des acides aminés en amines biogènes
	AMER (forte sensation d'amertume)	Acroéline + tanins	Dégradation du glycerol par des bactéries lactiques pour former l'acroéline et combinaison avec des tanins : formation d'amertume
Pédiococcus	GRAISSE (vin d'aspect visqueux, filant / pas d'altération aromatique)	Exopolysaccharide + bactéries	Synthèse par une bactérie d'un exopolysaccharide à partir de petites quantités de sucre. Le polymère réunit les bactéries entre elles pour former de longues chaînes dans le vin. Favorisé en condition de réduction d'apport de SO2 et après FML
Lactobacillus	GOÛT DE SOURIS (urine souris, pop corn, voml...)	ETHP, ATHP, APY	Réaction favorisée par la présence d'ions métalliques (Fe), un pH élevé et la présence de D-fructose
Acetobacter aceti	PIQÛRE acétique (vinaigre)	Acide acétique	Oxydation de l'éthanol
	ACESCENCE (colle scotch, vernis à ongles)	Acétate d'éthyl (éthanal)	Combinaison de l'acide acétique et de l'éthanol par les bactéries lactiques avant ou après la FA

Au-delà de la diversité des espèces retrouvées dans le moût de raisin, il existe une très grande variété de souche au sein d'une même espèce !

2. Evolution des populations microbiennes au cours de la fermentation

- Le climat, le stade de développement de la baie de raisin, le mode de conduite et l'état sanitaire ont un impact sur la biodiversité des levures de la baie de raisin.
- *Saccharomyces cerevisiae* et *Brettanomyces bruxellensis* sont rares à la surface de la baie à maturité.
- Raisin et cave sont fortement interconnectés, le raisin ensemence le moût, la cave ensemence, en retour, le vignoble à proximité.
- *Saccharomyces* est une levure de chai.
- Le pressurage, le débourbage, la teneur en éthanol et le SO₂ modifient la diversité levurienne.
- Des espèces presque absentes sur baies sont retrouvées dans les moûts (*Metschnikowia*, *Hanseniaspora*,...).
- L'ajout de SO₂ limite le développement des levures non fermentaires et sélectionne le genre *Saccharomyces*.



3. Intérêt des non saccharomyces : le cas de la bioprotection

La bioprotection consiste à utiliser des cultures microbiennes naturelles issues de matières premières végétales ou d'aliments afin d'éviter leurs altérations et d'accroître leur qualité et/ou sécurité.



Remplacer le rôle antiseptique du SO₂ par l'implantation de microorganisme neutre afin de coloniser le milieu

3 stratégies d'inoculation :

- Non saccharomyces fermentaire
 - Non saccharomyces peu/pas fermentaire
 - Saccharomyces
- Vinification en blanc et rosé : colonisation du milieu et apport organoleptique
- Vinification rouge : colonisation rapide du milieu pour éviter l'implantation de microorganismes indésirable

Vers de nouvelles utilisations des levures non Saccharomyces avec *Lachancea thermotolerans*

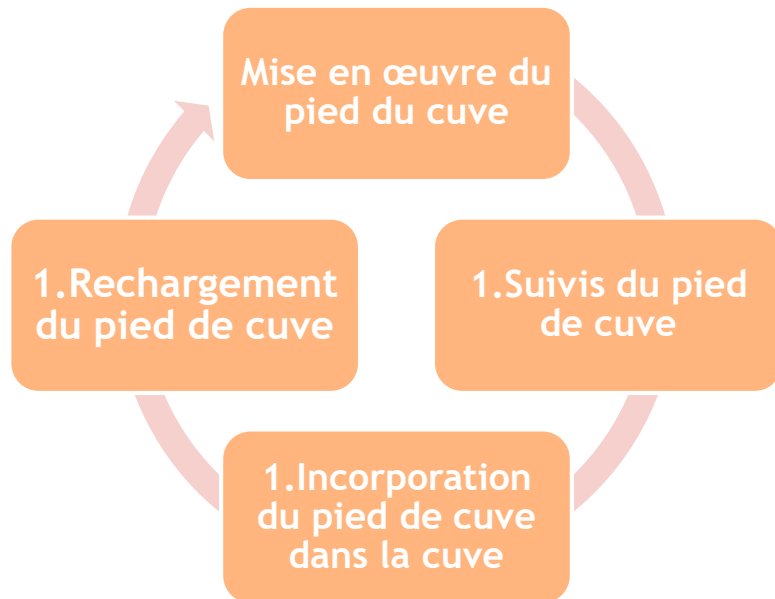


Les levures utilisées en bioprotection consomment une part plus ou moins importante d'azote du moût

1. Réalisation d'un pied de cuve en levure indigène

Les règles à respecter :

- Le moût utilisé doit provenir de raisins avec un état sanitaire irréprochable et une maturité suffisante
- Le matériel utilisé doit être correctement nettoyé et désinfecté
- Le moût doit être partiellement débourbé et sulfité entre 2 et 4 g/hl
- La fermentation doit être opérée entre 20 et 25°C
- Des analyses microbiologiques doivent être réalisées pour s'assurer de la bonne qualité du pied de cuve
- Le pied de cuve doit être incorporé entre 1020 et 1050 de densité
- Lors de l'incorporation, les différences de températures entre le pied de cuve et le moût à ensemencer doivent être inférieur à 5°C

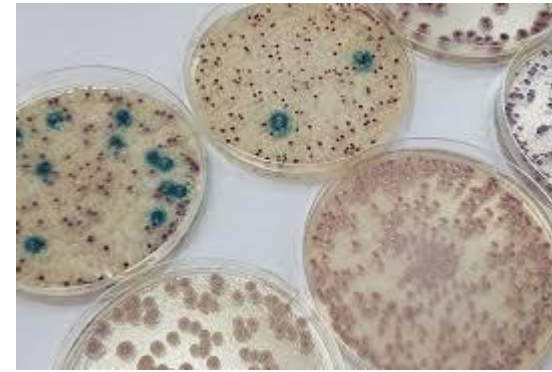
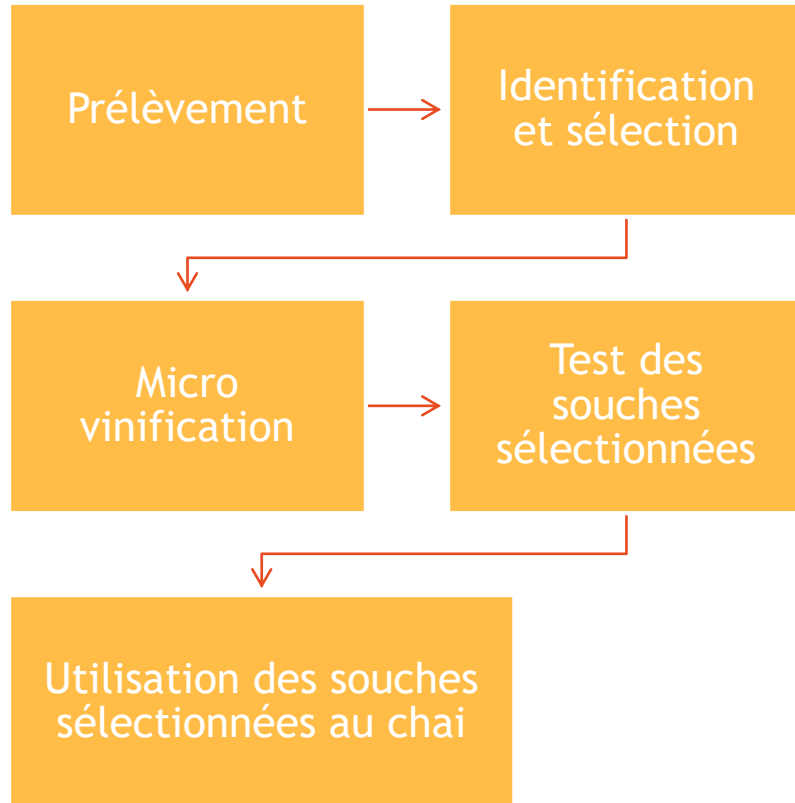


Avantages	Inconvénient
<ul style="list-style-type: none">- Pas d'achat- Diversité de souches- Souches issues de son vignoble ou chai- Démarrage rapide en fermentation	<ul style="list-style-type: none">- Mise en œuvre complexe- Population native inconnue- Possibilité de levures inutiles ou néfastes- Succès aléatoire

2. La sélection de levure indigène

Principe :

Sélectionner des levures naturellement présentes dans son chai/moût pour les utiliser comme levain. La sélection permet de maîtriser et d'assurer une fermentation alcoolique complète tout en évitant les déviations organoleptique.



Avantages

- Meilleur contrôle des levains
- Souches issues de son vignoble ou du chai
- Démarrage rapide en fermentation
- Maîtrise des intérêts œnologiques des souches

Inconvénient

- Sélection difficile et aléatoire
- Couteux
- Protocole sur plusieurs années
- Aucun effet millésime



Crème de levures:

Etude & usage de la biodiversité

Doriane Visse – Référente technique Sud Est

OENOLYSE
LABORATOIRE D'ŒNOLOGIE *D.PERALDI*

excell
L'EXPERTISE ANALYTIQUE

PLAN

1. Le laboratoire Excell

2. La crème de levures

- Etude & usage de la biodiversité
- Process de fabrication
- Du laboratoire à la cave



1. Le laboratoire Excell





NOS VALEURS

AGILE

«Toujours mieux servir nos clients»

Réactivité
Pragmatisme
Flexibilité
Proactivité

INNOVANT

«Créer de la valeur»

Créativité
Esprit de progrès
Initiative
Passion

excell
L'EXPERTISE ANALYTIQUE

EXIGEANT

«Rechercher l'excellence»

Qualité
Performance
Compétence
Persévérance

COLLECTIF

«Réussir ensemble»

Savoir-être
Esprit d'équipe
Bienveillance
Confiance

excell
L'EXPERTISE ANALYTIQUE



1. Le laboratoire Excell

Qui
sommes
nous?

Que
faisons
nous?



1. Le laboratoire Excell

Qui
sommes
nous?

- Pour fédérer les acteurs créateurs de valeurs dans la filière œnologique autour d'un service analytique de pointe.



- Pour combiner science et œnologie de terrain.



- Pour s'ouvrir à de nouveaux secteurs (bière, spiritueux, food...).

excell
L'EXPERTISE ANALYTIQUE

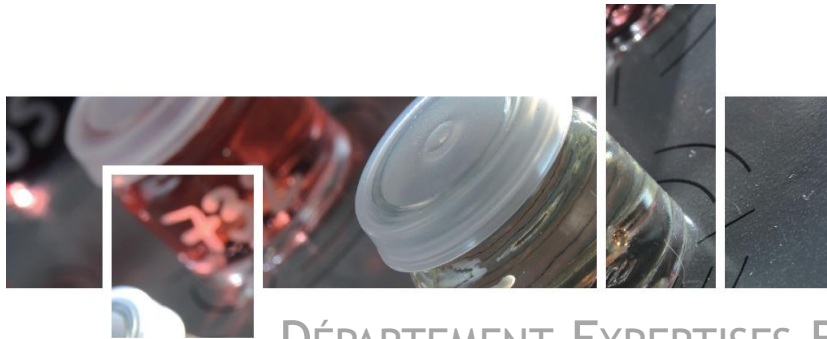


1. Le laboratoire Excell

Que
faisons
nous?



DÉPARTEMENT ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES
ŒNOLOGIQUES ET AUTRES BOISSONS



DÉPARTEMENT EXPERTISES FINES



DÉPARTEMENT MICROBIOLOGIE

Une équipe
pluridisciplinaire
repartie dans
4 secteurs:



DÉPARTEMENT RELATION
CLIENT



PLAN

1. Le laboratoire Excell

2. La crème de levures

- Etude & usage de la biodiversité
- Process de fabrication
- Du laboratoire à la cave





2. La crème de levures

Etude & usage de la biodiversité

Objectif:

- ✓ Piloter la microflore présente spontanément sur les baies de raisins.

Exploiter **la biodiversité** en réalisant des crèmes de levures issues de pied-de-cuves **dirigés et contrôlés**.

Elles sont constituées de **l'ensemble des souches de levures** présentes spontanément sur les raisins et possédant de bonnes aptitudes pour se développer dans le moût et fermenter.





2. La crème de levures

Etude & usage de la biodiversité

Notre expertise Microbiologique et Biotechnologique

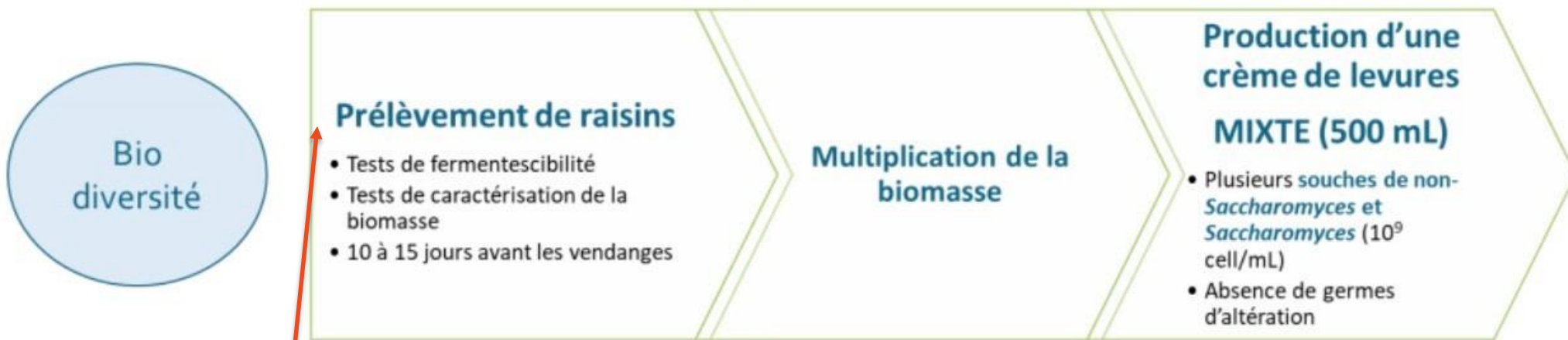
Un savoir-faire combinant :

- ✓ Des techniques classiques de microbiologie : étalement sur **boîtes de culture spécifiques**.
- ✓ Des techniques innovantes de **biologie moléculaire** : PCR associée aux séquences delta, PCR-Q, Cytométrie en flux.

2. La crème de levures

Etude & usage de la biodiversité

Process de fabrication:



Pack Microflore (focus Brett)



2. La crème de levures

Etude & usage de la biodiversité

Du laboratoire à la cave:



Protocole
d'utilisation
Bon de livraison

Flacon pour
Réaliser le
contrôle
d'implantatio
n
Vers 1070 de
densité

Thermos
contenant la
crème de levures



 L'EXPERTISE ANALYTIQUE	CERTIFICAT DE CRÈME DE LEVURES
--	---

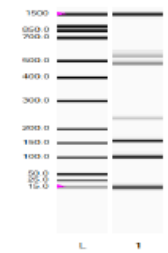
<u>Adresse de livraison</u> BL N° : 200525LE	<u>Contact client</u> Nom : Mail :
---	--

Spécificités du produit :

- Origine : baies de raisin rouge, parcelle.....,
- Volume de crème : 500mL
- Population totale/concentration : 1E+10 cellules
- Pureté : conforme
Absence de bactéries
Absence de particules exogènes
- Couleur : conforme
- Odeur : conforme


Caractéristiques microbiologiques :

- Profil génétique et confirmation de la production de *Saccharomyces cerevisiae* par amplification des zones inter-delta par PCR

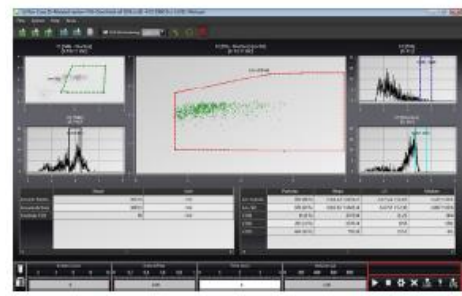


<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	OUI
---------------------------------	-----

Les résultats ne sont reproductibles que sous certaines conditions. Ils ne concernent que les échantillons soumis à l'essai.

 L'EXPERTISE ANALYTIQUE	CERTIFICAT DE CRÈME DE LEVURES
--	---

- Niveau d'activité : Cytométrie en flux



Levures totales	9.9 E+08 cell/mL
Levures actives	9.8 E+08 cell/mL

Caractéristiques fermentaires

- Tolérance à l'alcool : jusqu'à%vol
- Production d'AV
- Durée de fermentation

- ✓ PCRq non-*Saccharomyces*
- ✓ PCRq *Brettanomyces*

Les résultats ne sont reproductibles que sous certaines conditions. Ils ne concernent que les échantillons soumis à l'essai.

Merci de votre attention !



Avec le participation de :

Doriane VISSE
Réfêrente technique
Sud-Est



Clutier Hector
œnologue conseil
Consultant en viticulture

Bibliographie/Webographie :

- Traité d'œnologie Tome 1 p69 « le métabolisme des levures »
- IFV, itinéraire N° 30, Levures et bactéries en œnologie Valorisation des biodiversités
- V.Renouf Description et caractérisation de la diversité microbienne durant l'élaboration du vin : interactions et équilibres, relations avec la qualité du vin
- <https://www.vignevin-occitanie.com/fiches-pratiques/levures-indigenes-et-maitrise-des-fermentations-spontanees/>
- M. Lollier, 2003, Diversité, évolution et transferts de la vigne au vin des flores levuriennes indigènes d'intérêt œnologique en Alsace
- Mathias Eder and al, Explorer et exploiter la biodiversité des levures œnologiques : comment optimiser la qualité organoleptique des vins
- Valerie Pladeau and al Bioprotection et gestion des fermentations alcooliques en bio
- Marie-Charlotte COLOSIO Améliorer la qualité des vins biologiques obtenus par l'utilisation de la flore levurienne indigène projet casdar « levins bio »