

INCIDENCE DU LEVURAGE SUR L'ÉCOLOGIE DES SOUCHES DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* AU COURS DE LA VINIFICATION DANS DEUX CRUS DU BORDELAIS

Valérie FREZIER et D. DUBOURDIEU

Institut d'Œnologie, Université de Bordeaux II
351, cours de la Libération - 33405 Talence Cedex (France)

Résumé : *L'analyse des caryotypes par électrophorèse en champs pulsés permet l'étude de l'écologie des souches de *Saccharomyces cerevisiae* dans le cas de levurage avec des levures sèches actives, au cours de la vinification des vins rouges. Les résultats obtenus montrent que le levurage de certaines cuves modifie la microflore des cuves non levurées de la cave. De même, le levurage dans un chai avec des souches de levures différentes permet d'obtenir l'implantation souhaitée.*

INTRODUCTION

Au cours de la dernière décennie, la pratique du levurage avec des levures sèches actives s'est largement répandue en œnologie. Pour la vinification des vins rouges, s'il est bien admis que le levurage des premières cuves remplies permet des fermentations plus rapides et plus complètes, peu de travaux ont été consacrés au contrôle d'implantation des souches utilisées. VEZINHET et LACROIX (1984) ont clairement montré que le marquage génétique des levures de vinification par acquisition d'une résistance à des antibiotiques, constitue un excellent outil de contrôle du levurage. En appliquant cette technique, DELTEIL et AIZAC (1987) ont comparé l'efficacité de différents modes de levurage et ont préconisé un ensemencement rapide dès l'encuvage assurant un taux d'implantation supérieur à 90 p.cent.

D'autres travaux récents ont mis en évidence la grande diversité génétique des souches de *Saccharomyces cerevisiae* rencontrées au cours de l'élaboration des vins qui peuvent être différenciées par les profils de restrictions de leur ADN mitochondrial (DUBOURDIEU et al., 1987 ; HALLET et al., 1988) et l'analyse des caryotypes par électrophorèse en champs pulsés des chromosomes (BLONDIN et VEZINHET, 1988). Compte tenu de sa plus grande commodité, l'étude des caryotypes permet d'aborder l'écologie des souches de *Saccharomyces cerevisiae* au cours de la vinification (DUBOURDIEU et FREZIER, 1990).

Effectuée dans 2 crus du bordelais ayant pratiqué le levurage en 1989 et 1990, notre étude se propose de répondre à 2 questions :

- dans le cas où le levurage avec une souche sélectionnée n'est mis en œuvre que sur les premières cuves remplies, la microflore sauvage est-elle modifiée dans les cuves non levurées ?

- dans le cas où les cuves d'un même cru sontensemencées avec des levures différentes, peut-on obtenir l'implantation souhaitée ?

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I — PRÉLEVEMENTS

Cette étude est réalisée en 1989 et 1990 dans 2 crus du vignoble rouge Bordelais noté P et F.

On prélève stérilement sur chaque cuve de vinification 300 ml de moût au remplissage de la cuve (a), au début (b), au milieu (c) et à la fin (d) de la fermentation alcoolique. Après étalement sur moût gélosé d'une dilution convenable du prélèvement, dix colonies de chaque prélèvement prises au hasard sont isolées (sur des boîtes en contenant 70 à 150). Elles sont repiquées sur milieu solide et stockées à -20° C sur milieu de conservation liquide YPG (yeast extract Difco 10 g/l, bacto peptone Difco 20 g/l, glucose 20 g/l) additionné de 25 p. cent de glycérol. Une aliquote de l'échantillon prélevé est également stockée (à -20° C) pour un isolement ultérieur d'un plus grand nombre de colonies. Chaque colonie est identifiée par le code suivant : l'initiale du cru, le numéro de la cuve, le prélèvement (a,b,c,d), le numéro de la colonie, l'année du prélèvement.

II — ANALYSE DES CARYOTYPES PAR ÉLECTROPHORESE EN CHAMPS PULSÉS

a/ Préparation des échantillons

On utilise la méthode de BELLIS *et al.*, (1987). Les colonies sont multipliées en milieu liquide YPG (150 ml) pendant 18 heures à 30° C, sous agitation. Les levures en suspension dans le milieu sont centrifugées à 3000t /mn pendant 10 minutes et lavées 3 fois dans un tampon EDTA (éthyl diaminotétraacétique acide 50 mM, pH = 8,5). Le culot est repris dans le même tampon en ajustant la concentration cellulaire à 10 cellules/ml. La suspension cellulaire est additionnée à un volume équivalent d'agarose NA pour électrophorèse (Pharmacia), préparée à 1 p. cent dans le tampon EDTA. Le mélange est coulé dans une rangée de moules.

Les blocs ainsi obtenus sont placés durant 6 heures à 37°C dans un tampon de lyse (NaCl 0,5 M ; EDTA 0,25 M ; Tris-HCl 0,125 M pH = 7,5 ; β -mercaptoéthanol 0,5 M) puis durant 36 heures dans un tampon pronase (1 p.cent Lauryl Sarcosyl ; protease *Streptomyces griseus* 5 mg/l Sigma; EDTA 0,45 M ; Tris-HCl 0,065 M pH = 7,5).

Les blocs sont lavés 3 fois pendant 30 minutes dans du tampon T.E à 50°C (Tris-HCl 10 mM ; EDTA 1 mM) puis 3 fois 30 minutes dans ce même tampon à température ambiante.

b/ Conditions de l'électrophorèse

L'appareil utilisé est celui de Pharmacia-LKB (Pulsaphor) basé sur le principe C.H.E.F. (contour homogeneous electric field) (SCHWARTZ et CANTOR, 1984). Le protocole retenu est le suivant : teneur en agarose du gel, 0,8 p. cent ; température de migration, 10°C ; tampon de migration, TBE x1 (Tris-Sigma 7-9, 90 mM ; acide borique, 90 mM ; EDTA, 2 mM pH = 8) ; voltage, 165 volts ; programmation des temps de pulses, 90s -20h, 100s -12h, 120s -12h, 30s - 4h.

RÉSULTATS

I — INTERPRÉTATION D'UNE ANALYSE DE CARYOTYPES

Dans notre étude, les résultats observés pour les prélèvements a ne sont pas développés. Les caryotypes obtenus font référence à des caryotypes de souches d'espèces autres que *Saccharomyces cerevisiae*. Il s'agit des espèces *Pichia*, *Candida* et *Hanseniaspora* caractérisées par un faible nombre de bandes (< à 8 bandes) (DE JONGE et al, 1986).

La photographie n°1 donne à titre d'exemple les profils des 10 caryotypes issus du prélèvement b (début de la fermentation alcoolique) de la cuve VII du cru P en 1989. Les pistes 1,4,5,7,8 et 9 présentent les caryotypes des colonies PVIIb1,b4,b5,b6,b7,b8 identique entre eux et identique à celui de la souche 522M (piste n°6). Les profils des colonies PVIIb3 et b9 sont différents des précédents.

II — INCIDENCE DU LEVURAGE DES PREMIERES CUVES D'UN CRU SUR LA MICROFLORE DES CUVES NON ENSEMENCÉES.

Les premières analyses portent sur un le cru noté P, comportant 11 cuves de vinifications en 1989. Les cuves I à V ont étéensemencées par un mélange de 2 levures sèches (522M et EG8) à raison de 5 g/hl pour chaque souche ; les cuves VI à XI ont fermenté spontanément. Nous rapportons les résultats de la cuve I, la première remplie et levurée et de la cuve VII remplie 4 jours plus tard et non levurée.

Au prélèvement b de la cuve I (tableau I), tous les caryotypes sont caractéristiques de *Saccharomyces cerevisiae*. Huit caryotypes ont un profil identique à celui de 522M (l'une des 2 levures sèches inoculées). Les 2 autres caryotypes sont différents entre eux et différents des 2 levures sèches 522M et EG8 inoculées. Dans les 2 autres prélèvements (c et d), le caryotype identifié à 522M est toujours majoritaire. Celui de EG8 est absent de l'échantillonnage. Sur les 2 souches utilisées dans le levain mixte, seule la souche 522M s'implante et demeure majoritaire tout au long de la fermentation alcoolique.

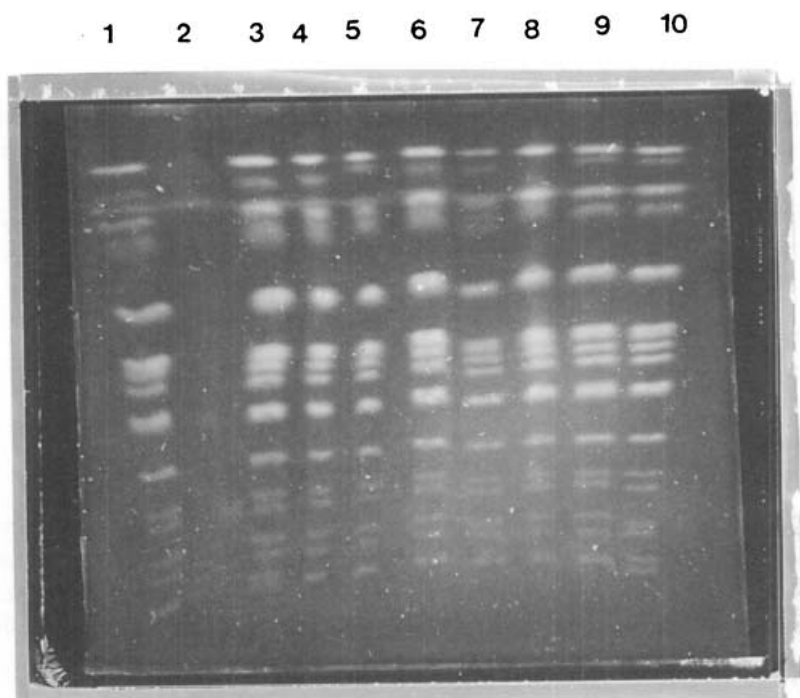


Photo 1 : Caryotypes issus du prélèvement b de la cuve VII du cru P en 1989.

Piste 1 = PVIIb1; Piste 2 = nul; Piste 3 = PVIIb3; Piste 4 = PVIIb4; Piste 5 = PVIIb5
 Piste 6 = 522M; Piste 7 = PVIIb6; Piste 8 = PVIIb7; Piste 9 = PVIIb8; Piste 10 = PVIIb9

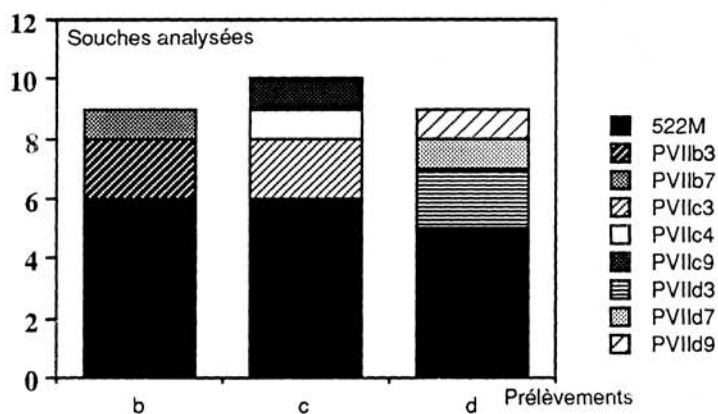


Fig. 1. : Répartition des souches dans la cuve VII (Vignoble P) à 3 stades de la fermentation alcoolique : 1989.

TABLEAU I
Répartition des souches dans la cuve I (Vignoble P)
à 3 stades de la fermentation alcoolique

Nombre de Souches isolées	Stades de la fermentation alcoolique					
	Début		Milieu		Fin	
	10		7		10	
Souches	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
522M	8	80	5	71,40	7	70
Plb1	1	10	0	0	0	0
Plb7	1	10	0	0	0	0
Plc5	0	0	1	14,30	0	0
Plc7	0	0	1	14,30	0	0
Pld3	0	0	0	0	1	10
Pld7	0	0	0	0	1	10
Pld8	0	0	0	0	1	10

Les mêmes analyses ont été effectuées sur la cuve VII non levurée (figure 1). Au prélèvement b, 6 colonies sur 9 sont identifiées à 522M. La prédominance de cette souche se retrouve dans les 2 autres prélèvements.

En 1990 dans le même cru P, les analyses portent sur 2 cuves : la cuve I, la première remplie et levurée à 7 g/hl avec 522M et la cuve II, remplie le même jour et non levurée.

Dans la cuve I, l'implantation majoritaire de 522M est effective dès le prélèvement b (figure 2).

Dans la cuve II, non levurée, la souche 522M s'implante aussi majoritairement tout au long de la fermentation alcoolique (figure 3) : 23 colonies sur 30 sont identifiées à 522M.

Ces observations effectuées deux années consécutives montrent donc que le levurage des premières cuves remplies influence la microflore des cuves non levurées. La souche de levure utilisée comme levain des premières cuves colonise toutes les cuves du chai.

III — ENSEMENCEMENT DES CUVES D'UN MEME CHAI AVEC DES SOUCHES DIFFÉRENTES.

Cette étude est réalisée dans le cru F.

En 1989, sur 15 cuves, 14 ont étéensemencées avec la souche F5 et la dernière cuve avec la souche 522M. Les analyses portent sur les cuves I et XV (figures 4 et 5). L'implan-

Cuve levurée avec 522M

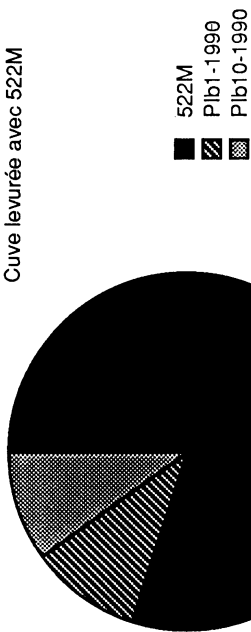


Fig. 2. : Répartition des souches dans la cuve I (Vignoble P) au début de la fermentation alcoolique : 1990.

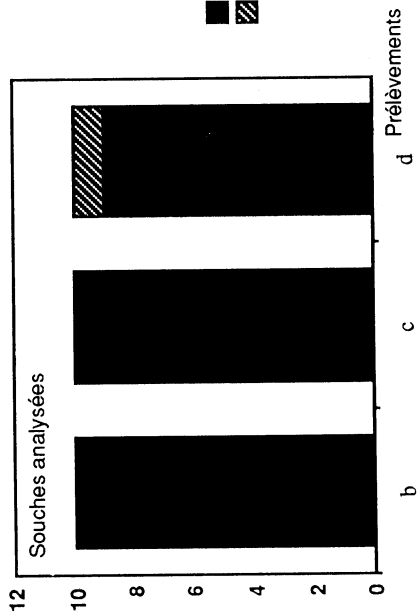


Fig. 4. : Répartition des souches dans la cuve I (Vignoble P) à 3 stades de la fermentation alcoolique : 1989.

Cuve non levurée

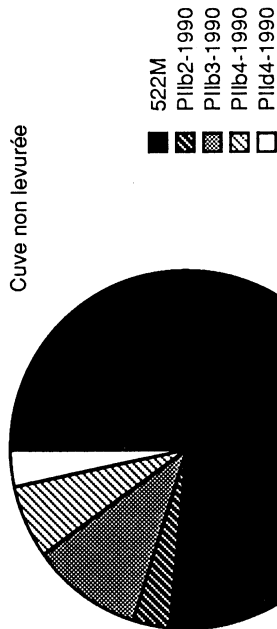


Fig. 3. : Répartition des souches dans la cuve II (Vignoble P) au cours de la fermentation alcoolique : 1990.

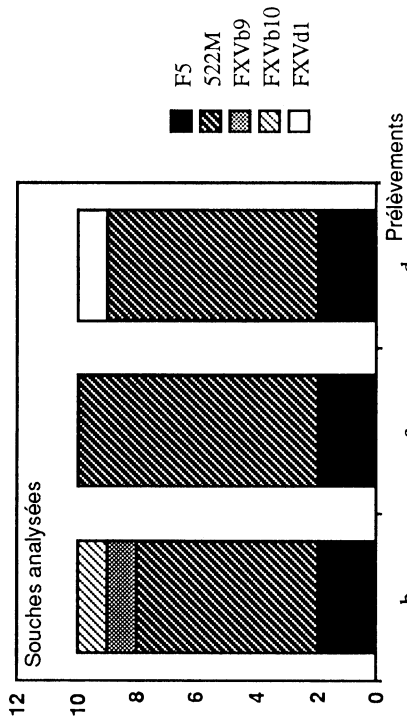


Fig. 5. : Répartition des souches dans la cuve XV (Vignoble F) à 3 stades de la fermentation alcoolique : 1989.

tation souhaitée est obtenue dans les 2 cuves. 29 colonies sur 30 sont identifiées à F5 dans la cuve I et 21 colonies sur 30 sont identifiées à 522M dans la cuve XV. Dans cette dernière cuve, il convient cependant de signaler une proportion non négligeable de la souche F5 (6 colonies sur 30).

En 1990, les analyses portent sur 4 cuves. Les cuves I,II et III sont respectivement ensemencées avec les souches F5, F10 et 522M. La cuve IV n'est pas levurée. Dès le début de la fermentation alcoolique ,(prélèvement b), l'implantation souhaitée est obtenue dans chaque cuve levurée (tableau II). Dans la cuve non levurée , les colonies analysées au prélèvement b, sont identifiées aux souches F5 et F10 utilisées dans ce même chai comme levains. Cette dernière observation confirme que le levurage de certaines cuves dans un chai détermine la microflore des cuves non levurées.

TABLEAU II
Répartition des souches isolées au prélèvement b
dans les cuves I, II, III et IV (Vignoble F) : 1990

Souches isolées au prélèvement b (début de la fermentation)	Cuve I levurée avec F5	Cuve II levurée avec F10	Cuve III levurée avec 522M	Cuve IV fermentation spontanée
F5	80	0	0	60
F10	0	100	0	40
522M	0	0	90	0
F1b4	10	0	0	0
F1b9	10	0	0	0
F11b8	0	0	10	0

CONCLUSION

L'analyse des caryotypes de *Saccharomyces cerevisiae* permet d'effectuer certaines observations pratiques sur le comportement des souches de levures sélectionnées pendant la vinification. Il est clair que la technologie de la vinification en rouge (remontage quotidien) mettant en œuvre un même dispositif de tuyauterie et de pompage sur différentes cuves, favorise l'implantation des souches de levures d'une cuve à l'autre. Dans ce cas , les souches sauvages peuvent devenir minoritaires même dans les cuves non levurées. Cependant, l'inoculation précoce de la vendange permet d'implanter avec succès certaines souches de levures sèches actives dans plusieurs cuves d'un même chai. La sélection de nouvelles souches sauvages peut alors s'avérer difficile dans une cuverie où le levurage est systématiquement pratiqué depuis plusieurs années.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BELLIS M., PAGES M. et ROZES G., 1987 - A simple and rapid method for preparing yeast chromosomes for pulse field gel electrophoresis, *Nuclear Acids Research*, Vol **15**, 6749.
- BLONDIN B. et VEZINHET F., 1988 - Identification de souches de levures œnologiques par leurs caryotypes obtenus en électrophorèse en champs pulsés, *Revue.Fr.Œnol.*, n°115.
- DE JONGE P., DEJONGH F., MEIJERS R., STEENSMA Y.H et SCHEFFERS W.A., 1986 - Orthogonal field alternative gel electrophoresis banding patterns of DNA from yeasts, *Yeast*, **2**, 193-204.
- DELTEIL D et AIZAC T, 1987- Comparaison de différentes techniques de levurage par suivi de l'implantation d'une souche de levure œnologique marquée., *Revue.Fr.Œnol.*, **28**, (113), 11-18.
- DUBOURDIEU D., SOKOL A., ZUCCA J., THALOUARN P., DATTEE A. et AIGLE M., 1987 - Identification des souches de levures isolées de vins par analyse de leur ADN mitochondrial, *Conn.Vigne Vin*, **21**, 267-278
- DUBOURDIEU D et FREZIER V, 1990-. Application de l'électrophorèse en champs pulsés à l'étude de l'écologie des levures en fermentation spontanée, *Revue Fr.Œnol.*, **30**, n°125, 37-40.
- HALLET J.N., CRANEGUY BV., ZUCCA J. et POULARD A., 1988 - Caractérisation de différentes souches industrielles de levures œnologiques par les profils de restriction de leur ADN mitochondrial, *Prog Agric. Vitic.*, **105**, 328-333.
- SCHWARTZ D.C. et CANTOR C., 1984 - Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis, *Cell.*, **37**, 67-75.
- VEZINHET F et LACROIX S., 1984 - Marquage génétique de levures: outil de contrôle des fermentations en souche pure. *Bull O.I.V.*, 643-644.