Connaissance Vigne Vin, 1981, **15**, N° 1, 41-52.

DETERMINATION DE L'ORIGINE DES LEVURES DE VINIFICATION PAR UNE METHODE DE DIFFERENCIATION FINE DES SOUCHES

M. BOUIX *, J.Y. LEVEAU * et C. CUINIER **

* Chaire de Microbiologie Appliquée et des Industries Microbiennes
Département de Biotechnologie. E.N.S.I.A., 59509 Douai (France)
** I.T.V., 14, rue Etienne Pallu, 37033 Tours Cédex (France)

INTRODUCTION

Ce travail a pour objet d'essayer de déterminer l'origine des levures qui assurent la fermentation spontanée d'un vin, notamment pour répondre à la question de KUNKEE et AMERINE (1970) : « Quelle part de la flore est originaire des raisins et quelle part vient de l'équipement de la cave de vinification » ?

Au cours de l'élaboration d'un vin blanc de Touraine, CUINIER (1980) a isolé et identifié des levures des raisins, des moûts et du vin, et des principaux points de contamination rencontrés de la vigne au chai de vinification (fig. 1).

Il a ainsi montré que la microflore levurienne évolue au cours de l'élaboration du vin. Les levures asporogènes ou à faible pouvoir alcoogène dominent sur les raisins et jusqu'au pressurage. Elles sont ensuite rapidement supplantées par des levures sporogènes à pouvoir alcoogène élevé : les levures du genre *Saccharomyces,* et en particulier *Saccharomyces cerevisiae* qui est majoritaire dans le moût en fermentation.

De plus, cette levure, dominante à partir du pressurage, a été isolée à tous les stades de l'élaboration du vin et à tous les points de contamination.

Le tableau I résume les principaux résultats de CUINIER (1980) sur la localisation de cette espèce.

A la suite de ce travail, et ayant mis au point sur des souches de laboratoire une technique de différenciation des souches de même espèce mais de clones différents, nous avons entrepris d'essayer de différencier finement ces souches de *S. cerevisiae* afin de déterminer si les souches présentes dans le moût en fermentation appartiennent au même clone que celles présentes au vignoble ou dans le chai de vinification.

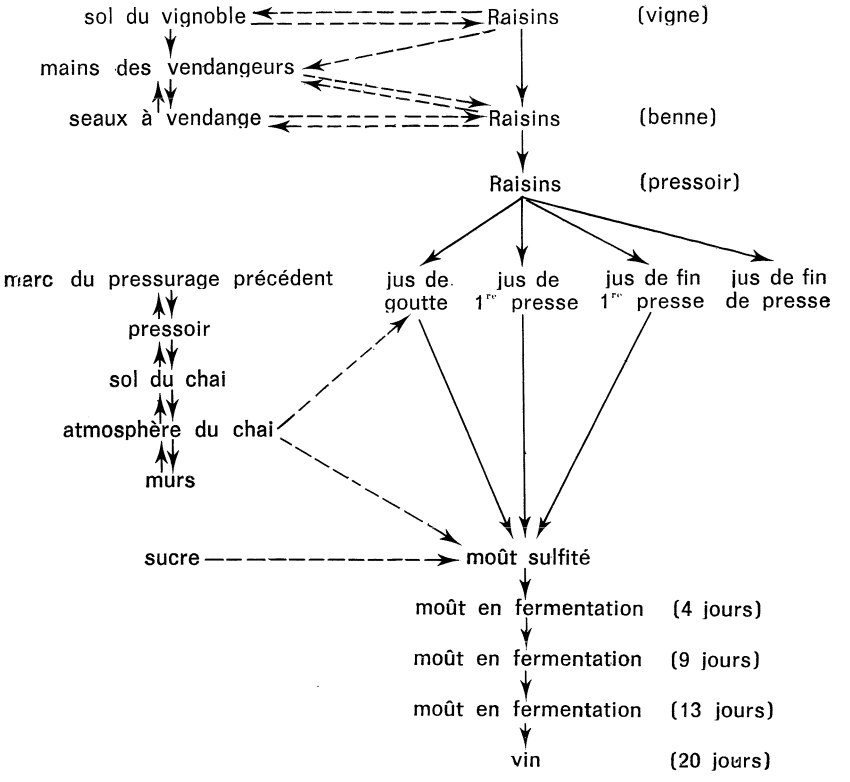


Fig. 1. — Points de prélèvement des levures
(Les flèches en pointillé indiquent les contaminations possibles)

MATERIEL ET METHODES

I. — LES SOUCHES

Nous avons travaillé sur les souches de *Saccharomyces cerevisiae* préalablement isolées par CUINIER (1980) et nous avons choisi au hasard quelques souches par point de prélèvement. Les souches étudiées à chaque étape sont données tableau II.

II. — TECHNIQUE DE DIFFERENCIATION DES SOUCHES

Le principe de cette technique est rappelé ci-dessous.

Les souches sont comparées d'après les schémas électrophorétiques de leurs « fractions exocellulaires » (BOUIX, 1979).

. La « fraction exocellulaire » est constituée par l'ensemble des composés macromoléculaires excrétés et libérés dans le milieu de culture au cours de la croissance des cellules. Chaque souche est cultivée en milieu YNB glucose, puis le filtrat de culture est dialysé et lyophilisé. La poudre ainsi obtenue constitue la fraction macromoléculaire exocellulaire.

TABLEAU I

Fréquence et localisation des souches de
Saccharomyces cerevisiae
d'après CUINIER (1980)

Points et Dates de prélèvements	Fréquence (pour 100 souches identifiées)
Raisins parcelle A 20-10-77	100
Raisins parcelle B 20-10-77	100
Raisins parcelle C 20-10-77	100
Raisins vidés de la benne dans le pressoir 24-10-77	29
Mains des vendangeurs :	
Mains A (après fermentation du prélèvement)	25
Mains B	50
Mains C	75
Mains D	87
Mains E	62
Seau A (après fermentation du prélèvement)	87
Seau B	75
Seau C	12
Vendange stagnant dans le tuyau de la benne	37
Moût de goutte 24-10-77	0
Moût de première presse 24-10-77	14
Moût de fin de première presse 24-10-77	17
Moût sulfité 24-10-77	48
Moût en fermentation 28-10-77	100
Moût en fermentation 2-11-77	100
Moût en fermentation 7-11-77	49
Vin 14-11-77	61
Marc du pressurage précédent	14
Sol du chai	50
Mur proche du pressoir	38
Pressoir	24
Atmosphère	14

TABLEAU II

Nombre de souches étudiées à chaque point de prélèvement et nombre de clones distincts mis en évidence

Origine des souches	Nombre de souches étudiées	Résultats des comparaisons de fractions exocellulaires	Nombre de clones mis en évidence
Raisins A	3	$R_{A1} \equiv R_{A2} \equiv R_{A3} \equiv R_{B1} \equiv R_{B2} \equiv$	1
Raisins B	3	R_{B3}	
Raisins C	3	$R_{C1} \equiv R_{C2} \equiv R_{C3}$	1
Raisins sortis de la benne	2	$RT_1 \equiv RT_2$	1
Pressurage	2	P_A	1
		P_B	1
Sulfitage	3	M_{s1}	1
		$M_{s2} \equiv M_{s3}$	
Moût en fermentation		$F_{A1} \equiv F_{A2} \equiv F_{A3} \equiv F_{B1} \equiv F_{B2} \equiv$	1
28.10	3	$F_{B3} \equiv F_{C1} \equiv F_{C2} \equiv F_{C3} \equiv V_1 \equiv$	
2.11	3		
7.11	3	$V_2 \equiv V_3$	
Vin 14.11	3		
Mains A	2	$M_{A1} \equiv M_{A2}$	1
Mains B	2	$M_{B1} \equiv M_{C1}$	1
Mains C	3	$M_{B2} \equiv M_{C2} \equiv M_{C3} \equiv M_{D1} \equiv M_{D3} \equiv$	1
Mains D	3	$M_{E1} \equiv M_{E2} \equiv M_{E3}$	
Mains E	3	M_{D2}	1
Seau A	3	$S_{A1} \equiv S_{A2} \equiv S_{A3} \equiv S_{B1} \equiv S_{B2} \equiv$	1
Seau B	3	S_{B3}	
Seau C	1	S_C	1
Pressoir	2	$P_{r1} \equiv P_{r2}$	1
Sol et atmosphère du chai	4	$S_1 \equiv S_2 \equiv S_3 \equiv A$	1
Murs	2	$M_{r1} \equiv M_{r2}$	1
Sucre	3	S_{u1}	1
		$S_{u2} \equiv S_{u3}$	1

. Ces fractions en solution dans l'eau sont soumises à une migration électrophorétique en gel mixte de polyacrylamide agarose. Après séparation, les gels sont révélés par la coloration à l'acide Périodique-Schiff (PAS) puis séchés.

Les fractions exocellulaires contenant une forte proportion de glucides, les schémas obtenus présentent peu de bandes, généralement 2 ou 3 suivant les souches : il est donc facile de comparer les distances de migration des constituants entre plusieurs schémas électrophorétiques.

Toutefois, si des schémas électrophorétiques distincts signifient une différence dans la nature des constituants des fractions exocellulaires et donc entre les souches de levures les ayant excrétées, des schémas électrophorétiques identiques n'autorisent pas à conclure à l'identité des constituants ayant migré à la même vitesse. Chaque cas devra alors être examiné avec prudence avant de formuler une hypothèse sur l'identité ou non de 2 souches donnant des fractions exocellulaires semblables par électrophorèse.

III. — METHODES DE COMPARAISON DES SOUCHES

Pour chaque point de prélèvement, nous avons d'abord comparé les souches entre elles par électrophorèse de leurs fractions exocellulaires. Ensuite, nous avons retenu une souche représentative de chaque fraction exocellulaire différente. Puis les fractions correspondant aux souches isolées au cours de la fermentation ont été comparées par électrophorèse aux fractions exocellulaires représentatives de chaque point de prélèvement.

RESULTATS

I. — COMPARAISON DES SOUCHES ISOLEES A CHAQUE ETAPE

— **Souches de** *S. cerevisiae* **isolées des raisins**

Les 6 souches de *S. cerevisiae* isolées des raisins de la parcelle A (3 souches) et de la parcelle B (3 souches) ont donné des fractions exocellulaires semblables par électrophorèse. Par contre, celles provenant des raisins de la parcelle C présentent des diagrammes différents.

Au moins 2 clones de *S. cerevisiae* différents sont donc présents au moment de la cueillette sur les raisins participant à l'élaboration de ce vin.

— **Souches de** *S. cerevisiae* **isolées des mains des vendangeurs**

13 souches de *S. cerevisiae* isolées sur les mains de 5 vendangeurs sont comparées. Parmi ces 13 souches, l'étude électrophorétique des fractions exocellulaires a permis de distinguer 4 clones différents. L'un de ces clones est cependant majoritaire puisque 8 souches sur 13 semblent y appartenir et que les souches de ce clone ont été isolées des mains de 4 vendangeurs sur 5.

— **Souches de** *S. cerevisiae* **isolées des seaux à vendange**

2 clones ont pu être mis en évidence parmi les souches isolées de seaux à vendange : 7 souches (sur 8 souches isolées des seaux) semblent appartenir au même clone.

— **Souches isolées des raisins de la benne arrivant au pressoir**

Seulement 2 souches de *S. cerevisiae* ont été comparées par électrophorèse de leurs fractions exocellulaires. Les schémas montrent que ces 2 souches semblent appartenir au même clone.

— **Souches isolées au cours du pressurage et du sulfitage**

Les 2 souches de *S. cerevisiae* isolées l'une du jus de première presse, l'autre du jus de fin de presse n'appartiennent apparemment pas au même clone.

Dans le moût sulfité, parmi les 3 souches comparées, 2 semblent appartenir au même clone, la 3e à un clone différent.

Enfin, la comparaison des diagrammes des fractions exocellulaires des souches isolées à chacune de ces étapes, montre que la souche de *S. cerevisiae* isolée du jus de fin de première presse est semblable à celle trouvée majoritairement (2 fois sur 3) dans le moût sulfité.

— **Souches de** *S. cerevisiae* **isolées du moût en fermentation**

Toutes les souches choisies, isolées du moût après 4 jours, 9 jours, 13 jours de fermentation et dans le vin présentent des fractions exocellulaires identiques par électrophorèse. Il semble donc que les souches de *S. cerevisiae* qui colonisent le moût en début de fermentation et la poursuivent jusqu'au vin appartiennent à un seul clone.

— **Souches de** *S. cerevisiae* **isolées des murs, du sol et de l'atmosphère du chai**

Les souches isolées à chacun de ces points de contamination produisent des fractions exocellulaires possédant des schémas électrophorétiques identiques.

— **Souches de** *S. cerevisiae* **isolées du sucre**

D'après les schémas électrophorétiques des fractions exocellulaires, il semble que 2 souches de *S. cerevisiae* de clones différents aient été isolées du sucre.

Un certain nombre de souches ont donc été différenciées à chacune des étapes de l'élaboration du vin.

Par ailleurs, il semble qu'une seule souche soit majoritaire du début de la fermentation jusqu'au vin. La comparaison de la fraction exocellulaire de cette souche qui a assuré la fermentation avec les fractions

exocellulaires des souches isolées aux autres étapes a permis d'apporter des éléments de réponse quant à l'origine de cette souche.

Ces résultats sont consignés dans le tableau II.

II. — COMPARAISON DES CLONES ISOLES A CHAQUE ETAPE AVEC LA SOUCHE MAJORITAIRE EN FERMENTATION

La fraction exocellulaire de la souche ayant assuré majoritairement la fermentation est notée : F.

La comparaison de cette fraction exocellulaire par électrophorèse aux fractions exocellulaires des souches représentatives de chaque étape a permis d'observer les résultats suivants :

— La souche de *S. cerevisiae* qui a conduit la fermentation ne semble pas faire partie des souches isolées sur les raisins à la vigne.

— Cette souche est par contre présente sur les raisins arrivant au pressoir.

— Sur les 13 souches isolées des mains des vendangeurs, 8 semblent appartenir au clone qui est ensuite présent en fermentation.

— De même, 7 souches isolées des seaux à vendange présentent le même diagramme électrophorétique que celui de la fraction F.

— Cette fraction F est également identique aux fractions exocellulaires de la souche isolée du jus de fin de première presse et des 2 souches isolées du moût sulfité.

— Par contre, aucune des souches isolées des murs, du sol et de l'atmosphère du chai, ainsi que du sucre ajouté au moût, ne présente des diagrammes électrophorétiques de fraction exocellulaire identique à F.

DISCUSSION

Comme nous l'avons déjà signalé, il est raisonnable d'admettre que des schémas électrophorétiques différents correspondent à des fractions exocellulaires différentes par au moins un constituant et que donc les levures qui les ont excrétées appartiennent à des clones distincts ; mais des schémas électrophorétiques semblables ne permettent théoriquement pas de conclure à la similitude des fractions analysées et donc à l'identité des souches les ayant produites.

Toutefois, dans cet exemple de vinification, où toutes les levures étudiées font partie du même écosystème, et étant donné la diversité que nous avons mise en évidence au niveau des fractions exocellulaires de ces souches de *Saccharomyces cerevisiae* (BOUIX, 1979), il nous paraît hautement probable que les souches qui ont donné des fractions exocellulaires semblables, par électrophorèse, appartiennent en fait au même clone. Pour l'interprétation de nos résultats dans ce cas de vinification,

nous considérons que les souches, qui ont excrété la fraction exocellulaire que nous avons appelée F, appartiennent à un même clone.

D'après les observations réalisées au cours de cet essai, il semble qu'une seule souche de *Saccharomyces cerevisiae* se soit développée dans le moût et en ait assuré la fermentation jusqu'au vin. Cette souche s'est intensément développée après le pressurage et le sulfitage puisque nous avons vu qu'elle était présente dans le jus en fin de première presse, devient majoritaire dans le moût sulfité puis unique, comme *Saccharomyces cerevisiae,* d'après nos prélèvements, dans le moût en fermentation.

Nous n'avons pas trouvé ce clone de *Saccharomyces cerevisiae* sur les raisins à la vigne, mais, par contre, cette levure a été isolée sur les raisins arrivant au pressoir et sur les raisins ayant stagné dans la pompe de déchargement des raisins.

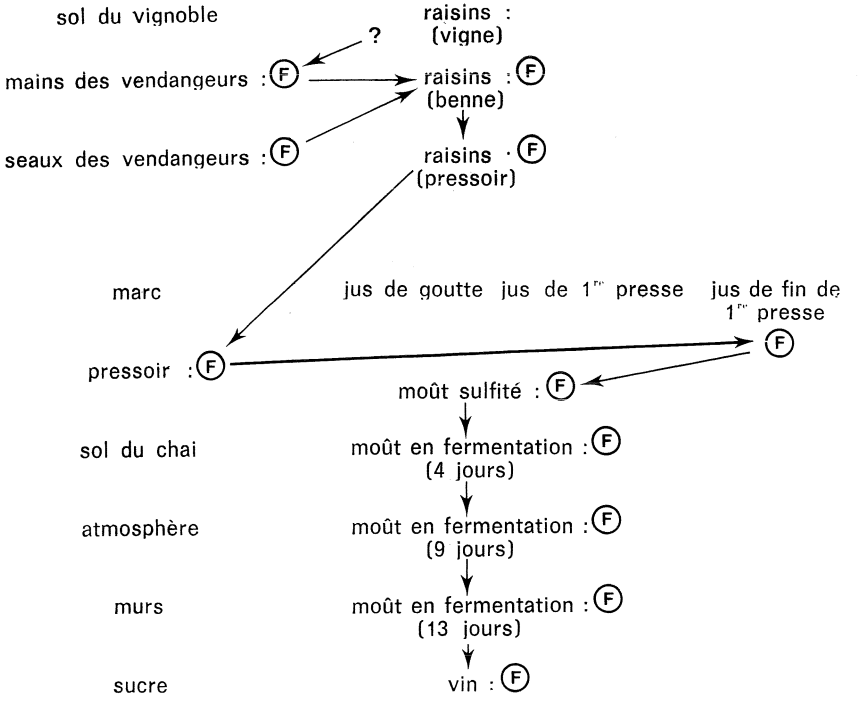


Fig. 2. — Points où la souche F a été isolée.
(Les flèches indiquent les possibilités de contamination)

Par ailleurs, cette souche a été isolée 6 fois (sur 7 souches de *Saccharomyces cerevisiae* isolées) des seaux à vendange et 8 fois (sur 13 souches isolées) des mains de vendangeurs.

Les souches isolées sur le pressoir appartiennent aussi à ce clone. Par contre, les souches isolées du marc (ayant séjourné sur le sol), des murs, du sol et de l'atmosphère du chai ne proviennent pas du même clone que la souche qui a assuré la fermentation.

En résumé, la levure principalement responsable de la fermentation, au cours de cette vinification, était présente au moment de la vendange sur les seaux et les mains des vendangeurs, sur les raisins arrivant au pressoir et sur le pressoir, mais nous ne l'avons pas trouvée sur les raisins à la vigne, ni dans le sol, ni dans le chai de vinification (fig. 2).

Il est donc permis de penser que les raisins pourraient être ensemencés avec cette souche, au moment de la cueillette, par les mains des vendangeurs, puis par les seaux, eux-mêmes contaminés par les mains et les divers matériels utilisés de la vigne au chai. Le fait que cette souche soit présente sur les raisins arrivant au pressoir confirme cette hypothèse.

Mais une deuxième question se pose alors : quelle est l'origine de cette levure et pourquoi se trouve-t-elle sur presque toutes les mains ? Plusieurs réponses peuvent être fournies mais ce ne sont que des hypothèses :

— les mains des vendangeurs étaient porteuses de cette souche, initialement avant la vendange : cela semble peu probable car la même souche ne se trouverait pas sur les mains de plusieurs vendangeurs ;

— les mains des vendangeurs se sont chargées en levures au contact du matériel de récolte, notamment les seaux, eux-mêmes contaminés par la vendange précédente ;

— ou enfin, cette souche de levure provient de la vigne, des raisins, des feuilles ou du sol qui, peu à peu contaminent les mains des vendangeurs. Nous n'avons pas trouvé cette levure ni sur les raisins, ni dans le sol, mais nos prélèvements n'ont peut-être pas été suffisamment nombreux et donc représentatifs pour pouvoir affirmer l'absence de cette levure en ces points.

Enfin, rappelons que nous avons trouvé cette souche sur les raisins provenant de la vendange précédente et ayant stagné dans la pompe, et sur le pressoir, contaminé aussi par la vendange précédente : or les raisins de cette vendange provenaient de la même parcelle que ceux de notre essai. Cela peut donc étayer l'hypothèse de la présence initiale de la levure sur les raisins de cette parcelle.

Par ailleurs, soulignons que toutes les souches de *Saccharomyces cerevisiae* isolées du début de la fermentation jusqu'au vin appartiennent au même clone. A notre connaissance, aucun travail ne signale ce fait ; il n'est donc pas possible de dire si ce résultat est exceptionnel ou très répandu en vinification. Toutefois, au niveau des raisins à la vigne, du jus de première presse et du moût sulfité, nous avons isolé des souches de *Saccharomyces cerevisiae* qui appartienent à d'autres clones que la souche qui a dominé la fermentation. Ces levures ont apparemment disparu, ou

sont devenues très minoritaires. Nous pouvons nous demander, pourquoi ; la souche devenue prépondérante était-elle mieux adaptée que les autres souches aux conditions de fermentation, composition du milieu ou température de la cave ? Nous avons par ailleurs vérifié que cette souche ne semblait pas secréter un facteur « killer ».

CONCLUSION

Dans ce cas de vinification d'un vin blanc de Touraine, il semble d'une part qu'une souche ait été prépondérante tout au long de la fermentation et d'autre part que cette souche provienne des raisins et du matériel de récolte plutôt que de la cave.

Cette étude sur l'origine des levures en vinification et leurs caractéristiques doit donc être poursuivie. Actuellement nous travaillons sur un autre essai du même type avec un vin de Montlouis, terroir situé à 30 km de celui du terroir précédent afin de voir si les hypothèses avancées sur les origines des levures dans le cas de l'essai du vin blanc de Touraine se vérifient.

RÉSUMÉ

Les auteurs comparent par électrophorèse de leurs fractions exocellulaires les souches de **Saccharomyces cerevisiae** isolées au cours d'une vinification, sur les raisins, dans le moût et le vin et au niveau des points de contamination. Cette technique permet la différenciation fine des souches de levures de même espèce.

Il apparaît que plusieurs clones de **S. cerevisiae** sont présents pendant la récolte et jusqu'au pressurage tant sur les produits que sur les mains des vendangeurs et le matériel de résolte alors qu'en fermentation un seul clone a été isolé. Ce clone a été mis en évidence dès les premières étapes de la vinification mais n'a pas été isolé dans le chai.

SUMMARY

The authors compare the cultures of **Saccharomyces cerevisiae** by electrophoresis of their endocellular parts. The cultures were isolated during winemaking, on the products involved from the vine to the wine, and at different points of contamination. This technic allows to finely differentiate yeast cultures of the same species.

It appears that several clones of **S. cerevisiae** are present from harvest until pressing, as much on the products as on the harvesters'hands and the harvesting materials, while during fermentation, only one clone was isolated. The presence of this clone was found from the first stages of vinification, but has not been isolated in the winery.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Verfassern vergleichen die Klone von **Saccharomyces cerevisiae,** die im Laufreines Weinbereitung, über den Trauben, im Most und Wein und an den Ansteckungplätze isoliert sind, mit Electrophorese. Diese Technik erlaubt die gute Unterscheidung der Hefenklone der Selben Spezies.

Es ist offensichtlich, dass mehrere Klone von **S. cerevisiae** im Laufe der Zeit der Weinlese und biszum Keltern, auf den Hände der Weinleser, auf dem Gerät und auf den Produkten anwesend sind, währendnur einer Klon im Laufe der Weinbereitung isoliert wurde. Dieser Klon wurde Schen an den ersten Abschnitten der Weinbereitung hervorgehoben aber wurde nicht in dem Weinlager isoliert.

RESUMEN

Los autores comparan por electroforesis la fraccíon exocelular de las cepas de **Saccharomyces cerevisiae** aisladas durante una vinificacíon, de todos los productos que van desde la vid al vino y a nivel de los puntos de contaminacíon. Esta tecnica permite la diferenciacíon entre cepas de levaduras de la misma especie.

Aparece que varios clones de **S. cerevisiae** son estan presentes durante la cosecha y hasta el prensado tanto sobre los productos como sobre las manos de los vendimíadores y el material de cosecha mientras que en fermentacíon un solo clon se ha aislado. Este clon ha sido puesto en evidencia en las primeras etapas de la vinificacíon, pero no ha sido aislado en la bodega.

RIASSUNTO

Gli autori paragonano con ellettroforesi delle loro frazioni esocellulari le specie di **Saccharomyces cerevisiae** isolati nel corso della vinificazione sui prodotti dalla vite al vino ed al livello dei punti di contaminazione. Questa tecnica permette la differenziazione sottile dei lieviti di stesse specie.

Sembra che parrecchi cloni di **Saccharomyces cerevisiae** sono presenti durante il raccolto e fino alla torchiatura, altrettanto sui prodotti che sui mani dei vendemmiatori e l'attrezzatura di raccolto, invece durante la fermentazione un solo clono è stato isolato. Questo clono è stato messo in evidenza fin dalle prime tape della vinificazione ma non è stato isolato nella cantina.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BOUIX M., 1979. L'électrophorèse, l'immunoélectrophorèse et l'immunofluorescence appliquées à la différenciation fine et rapide des levures. Applications à l'œnologie et à la brasserie. *Thèse de Docteur-Ingénieur Sciences et Techniques de l'Industries Alimentaires.* E.N.S.I.A., Douai, 259 pages.

CUINIER C., 1980. Origine des levures assurant l'élaboration d'un vin blanc de Touraine. Identification des espèces. *Connaissance Vigne Vin,* **14**, n° 2, 111-126.

KUNKEE R.E. et AMERINE M.A., ,1970. Yeast in wine making p 19 in ROSE A.H. and Harrisson J.S. The Yeasts, Vol. 3, *Yeast Technology,* 590 pages. Academic Press. London and New-York.

Ce travail fait partie d'une étude qui a bénéficié de l'aide financière de contrats D.G.R.S.T. n^{os} 77 7 18 17 et 77 7 18 18.