ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES LEVURES

M^lle S. DOMERCQ

Station agronomique et œnologique de BORDEAUX.

La fermentation du moût de raisin est assurée par les levures qui se trouvent sur la pellicule du raisin, sur les rafles, et aussi, par celles qui envahissent le matériel de vendange et de vinification dès que la récolte est commencée. L'apparition des signes de la fermentation est spontanée. La fermentation est rapide dans la majorité des cas, si elle devient trop violente et que la température s'élève dangeureusement, il faut la « canaliser », la calmer. Des accidents peuvent se produire; des arrêts de fermentation laissant des sucres non fermentés pouvant être attaqués par d'autres microorganismes, des développements de levures formant des substances nuisibles à la qualité; par la suite, il s'agit d'obtenir la stabilité du vin, en particulier, éviter les refermentations des vins doux.

L'étude de ces problèmes nécessite une étude préliminaire, celle des levures responsables de la fermentation alcoolique du jus de raisin, qui ne peut être faite que sur des cultures pures, isolées au préalable à l'aide de prélèvements soigneusement réalisés.

I. — PRELEVEMENT

Si c'est l'étude systématique de la flore de levures qui a motivé l'isolement des levures pures présentes sur le raisin ou dans le moût, des problèmes particuliers qui se sont posés à la faveur de certaines circonstances ont nécessité l'étude des levures sur différents matériels ou substances.

C'est ainsi que nous avons recherché les levures sur le matériel et les parois d'un chai, ou dans des vins qui avaient refermenté en cuves ou en bouteilles; quelques problèmes particuliers s'étant posés parfois, il a fallu passer par l'identification des levures incriminées pour trouver la solution.

La matière première conditionne le système du prélèvement.

1°) - **Sur les raisins.**

La première technique utilisée consistait à cueillir les raisins avec des ciseaux stériles en les recevant dans des poches de toile, enveloppées de plusieurs épaisseurs de papier filtre, le tout stérilisé à l'avance.

Au laboratoire, après s'être passé les mains à l'alcool, on pressait le raisin à travers les poches, le liquide étant recueilli dans un mortier passé à l'alcool et flambé. Ce liquide était ensuite mis à fermenter à 25°C.

Une autre technique employée a été le rinçage de la grappe de raisins sur pied, avec de l'eau stérile, le liquide est recueilli dans un flacon stérile et servait à ensemencer un flacon de milieu de culture stérile, qui était ensuite mis à incuber à 25°C.

2°) - **Sur les moûts.**

Ce prélèvement est très simple puisqu'il suffit de remplir un flacon stérile au robinet d'une cuve; on laisse la fermentation se poursuivre à 25°C.

3°) - **Dans les vins.**

La technique dépend de la richesse en levures. Si la refermentation est en activité, il arrive parfois que les levures soient groupées en amas ou flocons que l'on peut aspirer avec une longue pipette PASTEUR stérile pour ensemencer un tube du milieu.

S'il y a peu de cellules, une centrifugation est nécessaire (les tubes de centrifugation étant stérilisés) et l'ensemencement du milieu de culture est fait à partir du culot de centrifugation.

4°) - **Sur matériel hétérogène,**

Lies, bondes, sols, murs, tuiles, tuyauteries, vannes, etc... on recueille par rinçage avec de l'eau stérile, ou bien on gratte la surface intéressée et on introduit le produit dans un tube de milieu stérile.

Ce milieu doit être approprié à l'organisme étudié sinon il servirait de facteur limitant et aboutirait à sélectionner la microflore, en modifiant la répartition, la dénaturant. C'est pourquoi nous utilisons le moût de raisin stérilisé.

II. — ISOLEMENT

Le milieu de culture fermente sous l'action conjugée de toutes les levures présentent dans le prélèvement, un examen microscopique ne permet pas, dans la majorité des cas, de préciser les espèces présentes. Pour cela, il faut séparer les cellules. En milieu liquide, cela ne peut être obtenu qu'après une longue série de dilutions successives, et il est difficile de contrôler la pureté de la culture.

Par contre, dans un milieu solidifié par de la gélose, chaque cellule se multiplie indépendamment de ses voisines et forme une colonie qui devient visible au bout d'un certain temps, et peut être prélevée, si la dilution est suffisante, sans risque de contamination par les colonies voisines.

Si l'on veut connaître exactement le nombre de cellules, les dilutions sont faites dans un rapport commun, par exemple 1/100, 1/1.000, 1/10.000 etc....

S'il suffit seulement d'obtenir une réduction du nombre des cellules on peut transporter un petit volume dans une anse de fil de platine du milieu d'origine ou du milieu de culture dans un autre tube de milieu stérile, puis recommencer du premier tube à un deuxième, et au besoin, du deuxième à un troisième.

Le contenu du dernier tube, ou de chacun des deux derniers tubes, est déposé dans une boîte de Pétri stérile. On ajoute un tube de gélose stérile (dissoute dans de l'eau à raison de 25 g/l environ) liquifiée dans un bain marie mais ramenée à une température de 40°C environ. Après homogénéisation et solidification, les boîtes de Pétri sont mises à incuber à 25°C.

Au bout de quelques jours, temps variable selon les espèces, des colonies apparaissent. Si la dilution a été bien choisie, les colonies sont assez espacées pour pouvoir être prélevées une à une sans en toucher une autre. On note leur aspect : certaines se sont développées dans l'épaisseur de la gélose, d'autres près de la surface, d'autres enfin en surface, certaines sont plates, lisses ou bombées ou granuleuses, parfois légèrement colorées.

Chaque colonie est introduite grâce à un fil de platine fin, dans un tube de milieu stérile et ces tubes sont mis à incuber à 25°C. On dispose alors de cultures pures, provenant chacune d'une seule cellule. On en prélève autant qu'il est nécessaire, ou possible, pour avoir une connaissance convenable de la flore d'origine, mais il est bon de conserver en

mémoire la dilution importante qui a été nécessaire pour aboutir à ces quelques cultures pures, afin de ne pas perdre de vue que seules les espèces les plus nombreuses ont pu être isolées.

III. — ETUDE

L'isolement terminé, on dispose d'un lot plus ou moins important de cultures pures de levures. Il s'agit de découvrir leurs caractéristiques de manière à pouvoir disposer d'une description aussi complète que possible de chacune d'elles. Plusieurs séries de tests ont été mis au point par divers chercheurs; à côté des caractères culturaux qui n'ont pas une grande valeur, ils mettent en jeu des processus physiologiques, font appel à l'ensemble des enzymes que possèdent les souches et fournissent des renseignements qui semblent d'une plus grande sûreté. Néanmoins, certains caractères sont adaptatifs et peuvent dépendre des conditions de culture.

Pour différencier les souches qui ont été isolées en Gironde, nous avons utilisé les méthodes décrites par LODDER et KREGER VAN RIJ dans leur livre : THE YEASTS (1952).

1°) - **Caractères morphologiques et culturaux.**

Examen microscopique (G = 900) et caractères de la culture (aspect, mousse, dépôt, limpidité);

— sur cultures jeunes (3-6 jours à 25°C) en milieu liquide (moût de raisins) ou âgées (1 mois) ou sur milieu solide (malt gélosé) après 1 mois. On peut dessiner ou photographier les cellules.

— Colonie géante : aspect de la colonie formée à partir d'une goutte de levain déposée sur de la gélose nutritive.

2°) - **Formation de spores.**

Ce caractère est essentiel dans la différenciation des espèces, car il divise les levures en deux groupes : les **Endomycetaceae,** sporogènes, et les **Fungi imperfecti,** non sporogènes.

Mais les levures perdent parfois leur faculté de sporulation et, pour pouvoir observer des spores, il faut les placer dans un milieu convenable. En milieu liquide, il est à peu près impossible d'observer des spores, cette observation se fait sur des cultures en milieu solide, cultures en surface

dans un tube incliné (pour augmenter la surface de la culture). Encore faut-il que le milieu soit bien choisi, plusieurs formules ont été proposées, qui ne sont pas toujours favorables à toutes les espèces. On a pu utiliser un milieu au jus de carottes gélosé et le milieu de GORODKOWA (glucose 0,1 %, peptone 0,12 %, chlorure de sodium 0,5 %, gélose 3 %). Ces milieux ont en commun une quantité réduite d'hydrates de carbone et la culture a lieu en aérobiose aussi complète que possible.

3°) - **Caractères physiologiques.**

a) **Fermentation des différents sucres :**

La décomposition et la fermentation des divers hydrates de carbone mettent en jeu l'ensemble enzymatique de la cellule de levure. Il s'agit donc d'une propriété liée à la cellule et on comprend qu'elle puisse servir à la différenciation des espèces. Elle a été utilisée par tous les chercheurs avec des matériels parfois différents, qui sont cependant basés sur le même principe, la détection du dégagement de CO_2 produit par la fermentation : tubes de EINHORN, tubes de DURHAM. Ce sont ces derniers que nous avons utilisés, ils sont plus sensibles que les premiers.

Nos essais ont porté sur le maltose, le saccharose, le galactose et le raffinose. Nous avons jugé inutile d'essayer le glucose et le lévulose qui constituent en parties à peu près égales les sucres du moût de raisin. Ces sucres sont ajoutés à la dose de 2 % dans un milieu à l'extrait de levure, le tube de DURHAM se trouve au fond du tube de culture, il retiendra les bulles de CO_2 qui se dégageront quand la fermentation se déclarera. Pour le raffinose, la production de CO_2 n'est pas suffisante. En effet, le raffinose est un triholoside formé d'un ose, le fructose, et d'un diholoside, le mélibiose, lui-même formé de glucose et de galactose. Selon leur équipement enzymatique, les levures peuvent être incapables de toucher à aucune liaison du triholoside, ou bien elles peuvent en détacher le fructose, le raffinose est alors fermenté au tiers seulement et il reste le mélibiose; ou bien elles réussissent à détruire aussi la liaison dans le mélibiose et fermentent le glucose : le raffinose est alors fermenté aux deux tiers. Si elles fermentent aussi le galactose, la fermentation du raffinose est totale. Le volume du CO_2 dégagé ne donne pas une indication suffisante. Pour savoir si le mélibiose — sucre réducteur — est ou non attaqué, on peut traiter le résidu de fermentation par de la liqueur de Fehling. S'il y a réduction, il restait du mélibiose, s'il n'y a pas réduction, c'est qu'il ne restait plus de sucre, donc la fermentation du raffinose avait été totale. Mais, WICKERHAM et SKINNER ainsi que

BOUTHILET emploient d'autres méthodes qui consistent, avec l'aide d'autres organismes, respectivement, **Sacch. carlsbergensis** et **Sacch. ellipsoïdeus,** à préparer le travail de la levure essayée en lui fournissant du mélibiose, ou à le compléter.

b) **Assimilation des différents sucres :**

Les sucres fermentés sont tous assimilés, mais les sucres non fermentés peuvent ne pas l'être, s'ils le sont la levure oxyde le sucre pour fournir l'énergie nécessaire à son développement, mais sans production de CO_2.

LODDER et KREGER VAN RIJ utilisent la méthode auxanographique (en milieu solide) : nous avons utilisé une méthode en milieu liquide, celle de WICKERHAM : le milieu de base, auquel on ajoute les sucres est un milieu entièrement synthétique, constitué avec des cendres de levures qui fournissent les sels minéraux, par de l'acide citrique, du sulfate d'ammoniaque, de l'asparagine et les vitamines indispensables.

c) **Fermentation sélective du glucose et du fructose :**

Habituellement, dans un mélange de glucose et fructose, tel que le sucre inverti, les levures attaquent d'abord le glucose, puis ensuite le fructose; les sucres réducteurs des vins après fermentation sont représentés en majeure partie par du fructose.

Néanmoins, certaines levures s'attaquent d'abord au fructose. DUBOURG en a trouvé une dans certains vins de Sauternes, qui a été identifiée par suite comme **Sacch. elegans.** Les levures se classent ainsi en trois groupes : la grande majorité qui fermente d'abord le glucose, puis celles qui attaquent les deux sucres à peu près également, enfin un petit groupe, constitué pour l'instant de 4 espèces : **Sacch. acidifaciens, Sacch. elegans, Sacch. rouxii** et **Torulopsis bacillaris** qui fermentent le fructose plus vite que le glucose.

On suit donc le pouvoir rotatoire d'un milieu en fermentation qui avait au départ une quantité égale de glucose et de lévulose.

d) **Courbes de fermentation - Pouvoir alcoogène :**

Ces essais, intéressants pour l'œnologue, n'ont pas de valeur systématique, mais on a pu reconnaître des formes de courbes de fermentation. L'épreuve se fait en petits flacons de 90 cm^3 contenant 60 cm^3 de moût de raisin enrichi avec du sucre jusqu'à 18-19° pour les **Saccharomyces** ou

naturel pour les autres espèces. La variable est le dégagement du CO^2 en anaérobiose, le flacon étant obturé avec un bouchon percé d'un tube effilé rempli d'un petit coton, le dégagement du CO^2 est possible, l'évaporation étant très limitée, la fermentation est suivie par pesées qui sont faites le 1er, le 3e, le 6e, le 12e et le 25e jour. En aérobiose, flacons bouchés d'un tampon d'ouate, l'évaporation s'ajoute au dégagement du CO^2, on ne peut pas effectuer de pesée, il faut doser les sucres.

Les degrés alcooliques sont obtenus par ébulliométrie à la fin de la fermentation en anaérobiose et par calcul à partir du sucre fermenté en aérobiose à raison de 17,5 g de sucre consommé pour 1° d'alcool, par convention.

e) **Assimilation de l'alcool comme seule source de carbone :**

Ce test n'a qu'une valeur très secondaire dans l'identification des levures, car cette propriété n'appartient qu'à quelques espèces disséminées parmi plusieurs genres.

f) **Assimilation des nitrates :**

Cette propriété, fidèle, est utilisée pour distinguer le genre **Hansenula,** qui assimile les nitrates, de tous les autres genres qui ne l'assimilent pas et en particulier du genre **Pichia,** qui, par ailleurs, a plusieurs propriétés communes avec **Hansenula.** L'essai réalisé en milieu liquide synthétique, analogue à celui de l'assimilation des sucres, mais avec ou sans nitrate de potassium, est toujours très net.

g) **Bilan des produits secondaires - Besoins en facteurs de croissance :**

Ces deux séries d'essais ne sont pas indiquées dans le livre de LODDER et KREGER VAN RIJ. Néanmoins, ils peuvent servir à différencier les levures. La fermentation alcoolique n'obéit pas à un schéma simple, la transformation du sucre ne conduit pas seulement à de l'alcool et du CO^2, une partie du sucre conduit, par un processus complexe, à la formation de produits secondaires tels que glycérol, acide succinique, butanediol-2,3, acétoïne, éthanal, acide acétique et autres substances qui sont présentes à des teneurs plus faibles. Les rapports de formation de ces produits secondaires, variables avec les conditions, mais aussi avec les espèces de levures, permettent d'aider à classer les levures. Les besoins en facteurs de croissance étudiés particulièrement par LAFON-LAFOURCADE font apparaître des différences qui permettent d'attribuer à certaines espèces des besoins définis et assez constants pour aider à la classification.

Les **Saccharomyces** sont autotrophes, mais certaines vitamines, et en premier lieu l'acide pantothénique, activent fortement leur croissance.

Les **Kloeckera** sont hétérotrophes et l'absence de mésoinositol interdit tout développement.

Les **Picchia** et **Hansenula** n'ont pratiquement aucun besoin en facteurs de croissance.

Les **Saccharomycodes** ne peuvent se développer s'il manque au milieu de culture à la fois thiamine et pyridoxine.

Les **Torulaspora** sont sensibles à l'absence du groupe pyridoxine-thiamine est de plus au mésoinositol. L'autotrophie n'est pas générale pour ce genre.

Les **Candida** sont autotrophes; la biotine active leur fermentation.

IV. — CLASSIFICATION

Avec l'aide de tous ces essais, les levures isolées peuvent être groupées et rangées dans la classification générale.

1°) **Au cours de l'étude systématique des levures de la Gironde :**

2 023 souches isolées dans 96 propriétés ou crus de la région bordelaise ont pu être ainsi classées en 28 espèces différentes appartenant à 11 genres : 5 genres non sporogènes représentants 723 souches et 6 genres sporogènes représentant 1 300 souches.

	Régions de Vins rouges	Régions de Vins blancs	Ensemble de la Gironde
Nombre de moûts étudiés	58	38	96
Nombre de souches isolées	1070	953	2023
Kloeckera apiculata	409	154	563
Kloeckera africana	1	0	1
Kloeckera jensenii	1	0	1
Torulopsis bacillaris	12	127	139
Torulopsis famata	5	0	5
Brettanomyces vini	4	0	4
Candida pulcherrima	6	0	6
Rhodotorula mucilaginosa	4	0	4
Total des levures non sporogènes ..	442	281	723

	Régions de Vins rouges	Régions de Vins blancs	Ensemble de la Gironde
Saccharomyces ellipsoïdeus	501	517	1018
Saccharomyces oviformis	18	76	94
Saccharomyces bayanus	3	0	3
Saccharomyces chevalieri	42	19	61
Saccharomyces fructuum	6	4	10
Saccharomyces carlsbergensis	3	8	11
Saccharomyces uvarum	6	1	7
Saccharomyces florentinus	5	1	6
Saccharomyces steineri	5	14	19
Saccharomyces heterogenicus	0	5	5
Saccharomyces acidifaciens	0	5	5
Saccharomyces elegans	0	4	4
Saccharomyces veronae	0	1	1
Saccharomyces ludwigii	0	1	1
Torulaspora rosei	22	13	35
Torulaspora delbrueckii	0	1	1
Hensenula anomala	7	1	7
Pichia fermentans	3	1	4
Pichia membranaefaciens	2	1	3
Debaryomyces hansenii	5	0	5
Total des levures sporogènes	628	672	1300

2°) **Au cours de l'étude des vins rouges ou blancs en refermentation :**

Sur 70 échantillons, 207 souches ont été isolées. Il s'est révélé que celles-ci sont des espèces de fin de fermentation, résistantes à l'alcool et, surtout dans les vins blancs, à SO_2, comme **Sacch. ludwigii** et **Sacch. acidifaciens.** Mais la plus courante est **Sacch. oviformis** présente dans 33 cas sur 70.

	Isolées de Vins rouges	Isolées de Vins blancs	TOTAUX
Nombre de vins examinés	17	53	70
Nombre de souches isolées	54	153	207
Sacch. ellipsoïdeus	17	17	34
Sacch. oviformis	15	62	77
Sacch. chevalieri	3	0	3
Sacch. carlsbergensis	1	0	1
Sacch. heterogenicus	6	1	7
Sacch. acidifaciens	5	49	54
Sacch. elegans	4	2	6
Saccharomycodes ludwigii	0	22	22
Brettanomyces schanderlii	3	0	3

3°) **Levures de chai :**

Une étude a été faite pour connaître dans les chais les sources possibles de contamination. 28 échantillons ont été prélevés : fonds extérieurs de barriques, linges de barriques, pipettes de laboratoire, eaux de lavage du matériel, terre du sol dans le chai, dans la cave, vin d'égouttage de la barrique, plaques rouges des murs, matériel, tuyauterie de la mise en bouteilles, eau de rinçage des barriques, plaques de filtres, plaques de verre des cuves. 25 de ces échantillons ont donné lieu à des fermentations, 144 souches ont été isolées. Parmi les 63 levures de fermentation il a été reconnu 12 **Sacch. ellipsoïdeus,** 20 **Sacch. oviformis,** 11 **Sacch. elegans,** 20 **Sacch. acidifaciens.** Mais il a été isolé aussi des **Pichia,** des **Brettanomyces** et 49 souches non fermentatives.

4°) **Schizosaccharomyces :**

Ce genre n'avait pas été découvert dans la région bordelaise au cours de l'étude systématique ci-dessus, mais il avait été signalé dans les produits divers, notamment dans un jus de raisin sulfité (1924) et en Pologne dans des jus de fruits et de pommes par KUDRJAWZEW (1960).

Cette espèce s'était révélée intéressante par des possibilités qui pouvaient être utiles en vinification; en effet, elle a la propriété de fermenter

l'acide malique et de le transformer en alcool et CO_2. On voyait dans cette espèce de levure un moyen d'obtenir un chute d'acidité totale, dans des vins restés acides, avec une réussite plus facile sans doute qu'avec des bactéries malolactiques. Mais ces levures ne sont cependant pas très faciles à utiliser, il convient d'éviter le développement des levures indigènes.

Dans un vin d'une cave coopérative provenant d'un muté à 50 g/hl de SO_2 ayant fermenté, dans lequel la fermentation malolactique était dite terminée, puisqu'il n'y avait plus d'acide malique, nous n'avons pas trouvé de bactéries mais l'isolement des levures a permis de mettre en évidence des **Schizosaccharomyces,** qui s'étaient développées en présence de SO_2, en culture pure et avaient consommé tout l'acide malique du moût.

5°) **Jus de raisin :**

La conservation des jus de raisin non sulfités en cuves métalliques émaillées et stérilisées, maintenues à température basse et constante (— 1° C) est contrôlée par des numérations de levures vivantes sur boîtes de Pétri. Normalement, au bout d'un délai constant et court, les colonies de levures apparaissent et peuvent être comptées. En 1959, sont apparues dans une importante installation industrielle, des colonies très petites paraissant contaminer les boîtes de contrôle et qui obligeaient à prolonger la durée de l'incubation à cause de la lenteur de leur développement. Dans la pratique, cela pouvait se traduire par une perte de limpidité dans le jus de raisin et la formation d'un dépôt fin, adhérant aux parois supérieures des cuves.

A la suite de l'étude de cette souche de levures, il s'est avéré qu'elle n'avait jamais été observée au cours du travail sur les levures de la Gironde. Elle a donc été soumise à Mme KREGER VAN RIJ, du C.B.S. de Delft, qui l'a identifiée comme **Candida vanriji** Capriotti, par comparaison avec un souche récemment découverte (1958) par CAPRIOTTI dans des sols de Suède. Les caractères morphologiques sont un peu différents, mais les propriétés physiologiques, notamment les tests de fermentation des sucres, les bilans de produits secondaires, les besoins en facteurs de croissance sont analogues.

VI. — CONCLUSION

L'étude des levures isolées en Gironde a été le point de départ qui a permis de reconnaître la complexité de la flore responsable de l'élaboration du vin. Par la suite, des problèmes variés ont été abordés, qui ont permis de mettre en valeur les divers aspects que peuvent présenter les

fermentations selon les conditions dans lesquelles elles se produisent : certaines sont nuisibles, d'autres sont souhaitables et parmi celles-ci, quelques-unes sont difficiles à obtenir malgré tout l'intérêt qu'elles pourraient présenter en vinification.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

DOMERCQ S. — **Etude et classification des levures de vin de la Gironde.** Thèse BORDEAUX, 1956.

LODDER J. and N.J.W. KREGER VAN RIJ. — **The Yeasts - A Taxonomic study** - AMSTERDAM N.H. Pub. Co., 1952.

PEYNAUD E., DOMERCQ S., BOIDRON A.M., LAFON - LAFOURCADE S. et GUIMBERTEAU G. — Etude des levures **Schizosaccharomyces** métabolisant l'acide L. malique. **Archiv. für Mikrobiologie,** 1964, **48,** 150-165.

PEYNAUD E. et DOMERCQ S. — **Candida vanriji** dans des jus de raisin conservés à basse température. **Archiv. für Mikrobiologie,** 1964, **47,** 219-224.

PEYNAUD E. et DOMERCQ S. — Sur les espèces fermentant sélectivement le fructose. **Ann. Institut Pasteur,** 1955, **89,** 346.

RIBEREAU-GAYON J. et PEYNAUD E. — **Traité d'œnologie,** t. 1, PARIS. Béranger, 1960.