COMPORTEMENT DES LEVURES APICULÉES AU COURS DE LA VINIFICATION

M[me] Simone SAPIS-DOMERCQ (*)
Station Agronomique et Œnologique de Bordeaux

INTRODUCTION

A la suite de nombreux travaux, notamment ceux consacrés à la microflore levurienne en Italie, l'étude des levures de la Gironde que nous avons conduite de 1951 à 1954 a confirmé l'importance des levures apiculées au début de la fermentation de la vendange. Lorsque les prélèvements portent sur les raisins récoltés au vignoble, par exemple, la fréquence des levures apiculées observée dans la région du Médoc est très grande : 58 p. 100 de toutes les souches isolées. Si l'on considère la succession des espèces dans la vinification en rouge, on constate que la proportion de levures apiculées passe de 79 p. 100 au début à 19 p. 100 au milieu de la fermentation; elle est nulle à la fin et on ne retrouve pas de levures apiculées lors d'examens microscopiques des lies. On peut donc se demander ce que deviennent les cellules des levures apiculées disparues.

Pour répondre à cette question un premier essai a été réalisé au laboratoire en deux expériences successives, pour suivre le comportement des levures apiculées dans des fermentations en cultures pures et en mélange avec **Saccharomyces ellipsoideus** introduit à différents moments de la fermentation. La numération des levures vivantes a été effectuée sur milieu solide, quotidiennement pendant 18 jours.

Ensuite, au cours des vendanges 1968 la fermentation a été contrôlée dans quatre propriétés de la région des Graves (Gironde) en cuves traditionnelles de bois ou de ciment et dans deux installations de vinification continue à Buzet-sur-Baïse (Lot-et-Garonne) et Limoux (Aude). Des prélèvements ont été effectués quotidiennement à plusieurs niveaux des cuves; dans ces prélèvements, nous avons procédé à la numération des levures totales et vivantes et à leur identification.

(*) Travail effectué sous la direction de E. PEYNAUD.

Une mise au point concernant la taxonomie des levures est tout d'abord nécessaire. CASTELLI a montré que dans les régions chaudes de l'Italie, les levures sporogènes prédominent sur les non-sporogènes. C'est ainsi que parmi les levures de forme apiculée, on trouve, surtout au Sud de l'Italie, **Hanseniaspora uvarum,** sporogène, tandis que dans le Nord on trouve surtout **Kloeckera apiculata,** non sporogène. Lors de notre étude en Gironde, la présence de spores n'ayant pu être décelée dans les levures apiculées sur les milieux classiques de sporulation, il nous avait paru normal que **Kloeckera apiculata** soit l'espèce apiculée qui se développe à la même latitude que le Piémont.

Cependant, récemment, Mme KREGER-VAN RIJ, qui a étudié la sporulation de nos souches de levures apiculées, a constaté que dans certaines conditions de culture elles formaient des spores et qu'elles répondaient donc à la définition de **Hanseniaspora uvarum.** C'est donc ce terme que nous emploierons dorénavant.

I. ESSAIS DE LABORATOIRE

Mode opératoire. — Deux essais ont été réalisés, sur moûts de raisins contenant 201 g. de sucre par litre pour le premier et 212 g. pour le second. Chaque expérience comportait cinq bouteilles contenant 600 ml de moût. Les bouteilles ont été ensemencées simultanément, trois avec **Hans. uvarum** à raison de 200 000 cellules par ml, la quatrième avec 200 000 cellules de **Sacch. ellipsoideus** par ml, et la cinquième à la fois avec **Hans. uvarum** et avec **Sacch. ellipsoideus** soit 300 000 cellules par ml. Parmi les trois bouteilles ensemencées avec **Hans. uvarum,** l'une a reçu au bout de 48 h. une addition de **Sacch. ellipsoideus** (200 000 par ml), une autre a reçu une addition d'alcool amenant le degré alcoolique du milieu à 12°, la dernière bouteille sert de témoin et continue à fermenter avec **Hans. uvarum** seul.

Chaque jour on compte les cellules totales au compte-globules Malassez et on prépare les dilutions et les boîtes de Pétri nécessaires pour déterminer le nombre des cellules vivantes. Les valeurs obtenues sont rassemblées dans les tableaux I et II.

Résultats. — Comme on l'observe toujours au cours des fermentations, le nombre des cellules totales augmente constamment, alors que le nombre de cellules vivantes passe par un maximum, puis décroît à partir du quatrième jour environ.

TABLEAU I

Evolution de Hanseniaspora uvarum **au cours d'une fermentation de laboratoire**
Moût contenant 201 g de sucre par litre. Souche apiculée 30 a

Jours	Levures	Hans. uvarum	Hans. uvarum + Sacch. ellipsoideus	Hans. uvarum + Alcool	Hans. uvarum + Sacch. ellipsoideus	Sacch. ellipsoideus
2	Totales	32	26	30	**Hanseniaspora** 14 **Saccharomyces** 40	65
	Vivantes	32	25	26	40	45
4	Totales	24	**Hanseniaspora** 27 **Saccharomyces** 14	19	**Hanseniaspora** 16 **Saccharomyces** 90	74
	Vivantes	27	20	< 0,1	60	56
8	Totales	35	**Hanseniaspora** 26 **Saccharomyces** 62	25	**Hanseniaspora** 20 **Saccharomyces** 92	86
	Vivantes	8	36	< (100)	50	52
11	Totales	47	**Hanseniaspora** 20 **Saccharomyces** 86	23	**Hanseniaspora** 16 **Saccharomyces** 110	84
	Vivantes	8	30	(1)	34	38
Sucre fermenté (g)		49	188	35	198	199
Alcool formé		2°7	10°8	12°3	11°5	11°4

Les résultants sont exprimés en millions de levures par ml exceptés ceux entre parenthèses qui représentent le nombre de levures

TABLEAU II

Evolution de Hanseniaspora uvarum **au cours d'une fermentation de laboratoire**

Moût contenant 212 g. de sucre par litre. Souche apiculée 8 a

Jours	Levures	Hans. uvarum	Hans. uvarum + Sacch. ellipsoideus après 2 jours		Hans. uvarum + Alcool après 2 jours	Hans. uvarum + Sacch. ellipsoideus		Sacch. ellipsoideus
2	Totales	29		23	22	**Hanseniaspora**	10	46
						Saccharomyces	70	
	Vivantes	17		20	15		50	33
4	Totales	24	**Hanseniaspora**	20	22	**Hanseniaspora**	7	46
			Saccharomyces	5		**Saccharomyces**	68	
	Vivantes	14		15	0,04		60	25
8	Totales	28	**Hanseniaspora**	26	27	**Hanseniaspora**	7	54
			Saccharomyces	74		**Saccharomyces**	87	
	Vivantes	7		26	(10)		27	19
11	Totales	35	**Hanseniaspora**	36	28	**Hanseniaspora**	10	62
			Saccharomyces	140		**Saccharomyces**	120	
	Vivantes	5		20	(300 à 1000)		30	10
14	Totales	76	**Hanseniaspora**	30	27	**Hanseniaspora**	7	84
			Saccharomyces	144		**Saccharomyces**	94	
	Vivantes	8		45	(4)		27	13
18	Vivantes	6		22	0		29	11
Sucre fermenté (g)		74		208	34		210	207
Alcool formé		4°0		11°2	11°8		11°2	11°0

Les résultants sont exprimés en millions de levures par ml exceptés ceux entre parenthèses qui représentent le nombre de levures

Les levures **Sacch. ellipsoideus** introduites au bout de 48 h. dans une culture d'**Hans. uvarum** restent très petites, au moins au début; elles sont alors presque du même ordre de grosseur que les levures apiculées dont elles sont difficiles à distinguer. Les chiffres donnés dans ce cas n'ont qu'une valeur relative. Par contre, en cultures pures ou ensemencées en même temps que **Hans. uvarum,** les cellules de **Sacch. ellipsoideus** sont grosses et facilement reconnaissables.

Lors de l'ensemencement simultané avec **Sacch. ellipsoideus** et **Hans. uvarum** le nombre des levures elliptiques déterminé au compte-globules est beaucoup plus élevé qu'en culture pure, comme si **Sacch. ellipsoideus** bénéficiait de la présence de **Hans. uvarum.** Pour **Hans. uvarum,** on constate le contraire et le nombre est très inférieur à celui que l'on observe en culture pure : **Sacch. ellipsoideus** gêne donc le développement de **Hans. uvarum.** Par contre quand **Sacch. ellipsoideus** est ajouté après 48 h, le nombre des levures apiculées ne paraît pas affecté ; seule, la phase de démarrage est importante.

Le nombre des cellules vivantes reste élevé dans tous les cas, jusqu'au dix-huitième jour compris. Même pour **Hans. uvarum,** au onzième jour en culture pure, on observe encore un sixième des cellules vivantes, et au dix-huitième jour, il en reste encore 570 000 par ml.

Le mélange **Hans. uvarum** + **Sacch. ellipsoideus**, qu'il soit fait au début ou au bout de 48 heures, conduit à un nombre total de cellules vivantes du même ordre.

Après l'addition d'alcool, la diminution du nombre de cellules apiculées vivantes est rapide ; il faut cependant attendre le seizième jour pour qu'elles disparaissent.

La technique employée n'a pas permis de distinguer les colonies de **Hans. uvarum** et de **Sacch. ellipsoideus** dans les mélanges de ces deux espèces.

L'emploi de gélatine à la place de la gélose comme gélifiant du milieu de culture, parce qu'elle est liquéfiée par **Hans. uvarum,** aurait peut-être permis de distinguer les colonies des deux espèces de levure. Mais la température de fusion des milieux gélatinés étant 23-25° C, (celle des milieux gélosés est 40° C), leur utilisation est impossible en été, et à l'étuve. La distinction entre levures elliptiques et apiculées n'a été possible que sous le microscope, et encore difficilement dans le cas où l'ensemencement avec **Sacch. ellipsoideus** intervenait après développement de **Hans. uvarum.**

Conclusions. — Ces deux expériences de laboratoire ont donné des résultats un peu inattendus sur le comportement de **Hans. uvarum.** Comme on ne retrouve pas habituellement ces levures dans les lies de fermentation, on pouvait penser qu'elles mouraient rapidement, en raison notamment de l'élévation du degré alcoolique produite par les levures plus alcoogènes. En réalité, on a pu constater que, même si l'addition d'alcool élimine immédiatement une grande partie des cellules, la résistance de celles qui subsistent est assez grande pour qu'on puisse trouver encore des cellules vivantes, rares il est vrai, le quatorzième jour. En culture pure, il reste encore 570 000 levures vivantes par ml au dix-huitième jour. Mais il faut reconnaître que les conditions réalisées en laboratoire sur milieu stérile sont différentes des conditions de la pratique. Il se peut aussi que les remises en suspension quotidiennes accompagnées d'une forte aération du milieu de fermentation aient eu une influence favorable sur la vitalité de **Hans. uvarum.**

II. CONDITIONS DE LA VINIFICATION EN ROUGE DANS LA PRATIQUE

Lors de nos études des levures de 1951 à 1954, les prélèvements d'échantillons avaient eu lieu à la vigne, sous forme de raisins, ou dans les cuves, à un moment donné de la fermentation ; à partir de ces échantillons d'autres prélèvements avaient été faits après une incubation à 25° C en étuve. Pour compléter ce travail, les prélèvements lors des vendanges de 1968 ont été effectués quotidiennement dans la cuve, à différents niveaux. Cette étude a été conduite dans quatre vignobles de la région des Graves rouges, utilisant des cuves de bois ou de béton, afin de connaître le nombre et la nature des espèces qui interviennent au cours de la fermentation.

Mode opératoire. — Les prélèvements ont été faits périodiquement à différents niveaux des cuves en fermentation : par le robinet du bas, par le robinet dégustateur à mi-hauteur des cuves, à la partie supérieure dans le vin baignant le marc, enfin dans le marc flottant.

A partir des liquides recueillis dans des flacons stériles, deux séries de prélèvements ont été effectués, les uns pour la numération, les autres pour l'identification des levures. La technique employée ne permettant pas de distinguer les espèces dans les boîtes de Pétri réservées à la numération, il ne sera question ici que du processus d'identification, la fréquence des souches permettant de donner une idée du nombre de cellules actives.

Les dilutions, non numériques, ont été faites à l'anse de platine; après développement les boîtes préparées sont conservées au réfrigérateur jusqu'au moment des identifications. C'est généralement la deuxième ou la troisième dilution qui a pu être utilisée, les colonies s'y trouvant à une concentration convenable pour l'isolement. Au cours des onze à treize jours de vinification, 292 souches de levures ont été ainsi isolées : elles appartiennent à quatre genres et treize espèces; sept souches dépourvues de propriétés fermentaires représentent encore deux genres différents.

Résultats. — Les souches de **Saccharomyces** constituent à elles-seules 91 p. 100 de la microflore naturelle totale, dont 60 p. 100 pour **Sacch. ellipsoideus.**

Hans uvarum ne représente que 5,5 p. 100 car cette espèce n'est plus retrouvée après le quatrième jour.

Les sept souches non fermentaires, identifiées par le Centraalbureau voor Schimmelcultures de Delft font partie des genres **Pichia** et **Debaryomyces.** Les résultats sont rassemblés dans le tableau III.

Lorsqu'on examine la succession des espèces, le seul fait apparent est la présence de **Hans. uvarum** seulement en début de vinification : cette espèce n'est plus observée après le quatrième jour alors que l'action des **Saccharomyces** se maintient pendant toute la fermentation de la cuve. (tableau IV).

Une nouvelle fois, nous avons donc pu constater que dans la pratique des fermentations de vendange fraîche en gros volumes, **Hans. uvarum** disparaît. On ne retrouve même pas ces levures au bas de la cuve où elles pourraient être entraînées avec les lies.

Non seulement on ne les observe pas à l'état de cellules vivantes, susceptibles de se reproduire, mais on ne les distingue pas davantage au microscope. Tout se passe comme si ces levures avaient été détruites et en quelque sorte solubilisées. Ces résultats sont en tous cas très différents de ce que l'on a pu observer au laboratoire. Il n'a pas été possible de reproduire dans des fermentations pures le phénomène de disparition intervenant dans la pratique.

TABLEAU III

Composition de la microflore de levures en vinification classique

Chaque colonne représente le cas d'une propriété différente de la région de Graves

	Cuve n° 1		Cuve n° 2		Cuve n° 3		Cuve n° 4		Total	
Nombre de prélèvements effectués	28		21		17		20		86	
Nombre de prélèvements productifs	24		18		10		13		65	
Nombre de souches isolées	118		79		45		50		292	
Hans. uvarum	6	p. 100 5	2	p. 100 2	2	p. 100 4	6	p. 100 12	16	p. 100 5
Saccharomyces	108	92	77	98	42	94	43	84	270	92
Pichia	1	1	0	0	0	0	1	2	2	1
Debaryomyces	3	2	0	0	1	2	1	2	5	2

TABLEAU IV

Répartition des levures en vinification classique à différents niveaux de la cuve

Vignoble	Fermentation	Bas de la cuve	Liquide baignant le marc	Marc
n° 1	Début	1 **Hans. uvarum** 11 **Sacch. ellipsoideus** 10 Autres **Saccharomyces**	1 **Hans. uvarum** 10 **Sacch. ellipsoideus** 7 Autres **Saccharomyces**	4 **Hans. uvarum** 12 **Sacch. ellipsoideus** 7 Autres **Saccharomyces**
	Fin	20 **Sacch. ellipsoideus** 3 Autres **Saccharomyces** 1 **Pichia**	9 **Sacch. ellipsoideus** 8 Autres **Saccharomyces**	5 **Sacch. ellipsoideus** 5 Autres **Saccharomyces** 3 **Debaryomyces**
n° 2	Début	1 **Hans. uvarum** 5 **Sacch. ellipsoideus** 1 Autres **Saccharomyces**	1 **Hans uvarum** 11 **Sacch. ellipsoideus** 2 Autres **Saccharomyces**	3 **Sacch. ellipsoideus** 2 Autres **Saccharomyces**
	Fin	12 **Sacch. ellipsoideus** 5 Autres **Saccharomyces**	11 **Sacch. ellipsoideus** 11 Autres **Saccharomyces**	5 **Sacch. ellipsoideus** 9 Autres **Saccharomyces**
n° 3	Début	1 **Hans. uvarum** 3 **Sacch. ellipsoideus** 1 Autres **Saccharomyces**	8 **Sacch. ellipsoideus**	1 **Hans. uvarum** 2 **Sacch. ellipsoideus** 4 Autres **Saccharomyces**
	Fin	5 **Sacch. ellipsoideus** 1 **Debaryomyces**	9 **Sacch. ellipsoideus** 3 Autres **Saccharomyces**	5 **Sacch. ellipsoideus** 2 Autres **Saccharomyces**
n° 4	Début	1 **Hans. uvarum** 11 **Sacch. ellipsoideus** 5 Autres **Saccharomyces**	3 **Hans. uvarum** 9 **Sacch. ellipsoideus** 1 Autres **Saccharomyces** 1 **Pichia**	2 **Hans. uvarum** 3 **Sacch. ellipsoideus** 5 Autres **Saccharomyces**
	Fin	7 **Sacch. ellipsoideus** 1 Autres **Saccharomyces**		1 **Sacch. ellipsoideus**

III. CONDITIONS DE LA VINIFICATION CONTINUE

Les expériences ont été conduites dans deux installations VICO situées à Buzet-sur-Baïse et à Limoux. Une première étude sommaire effectuée en 1967 dans ces deux exploitations avait mis en évidence la présence constante de **Sacch. ellipsoideus** et de **Sacch. oviformis** pendant toute la durée de fonctionnement des appareils.

En 1968 l'étude a comporté à la fois la numération des cellules vivantes et l'identification des espèces engagées dans ce procédé de vinification.

Les appareils ont fonctionné pendant 20 jours consécutifs. Les prélèvements étaient effectués tous les matins avant le chargement de vendange fraîche, et à différents niveaux de l'appareil.

Résultats. — Ils sont rassemblés dans les tableaux V et VI. A Buzet-sur-Baïse comme à Limoux on a constaté que le pourcentage des levures vivantes ne varie guère au cours des 20 jours de fonctionnement. Le dernier jour il était encore de 72 p. 100 à Limoux, de 62 p. 100 à Buzet-sur-Baïse. C'est la différence essentielle avec les cuves de fermentation classiques dans lesquelles la population vivante maximale est observée au troisième jour et tombe déjà le cinquième jour à seulement 10 ou 30 p. 100.

82 prélèvements ont été effectués dans les deux vinificateurs; mais 65 seulement ont été utilisables. Ils ont permis d'isoler 349 souches. Parmi ces souches 18 seulement sont des **Hans. uvarum** soit 5,1 p. 100. La fermentation est conduite à 89 p. 100 par **Sacch. ellipsoideus,** les autres espèces de **Saccharomyces** ne représentant que 18 souches soit 5,1 p. 100.

A Limoux on a trouvé exclusivement des **Saccharomyces** dont 87 p. 100 de **Sacch. ellipsoideus.** A Buzet-sur-Baïse, par contre, il y avait un peu plus de variété, soit 5 genres de levures. Mais le fait caractéristique est que **Hans. uvarum** a été trouvé (18 souches, soit 6,4 p. 100) tout au long de la fermentation et à tous les niveaux de l'appareil vinificateur. Cela tient sans doute à l'apport journalier de vendange fraîche, que réalise le système de vinification continue.

Deux espèces non fermentaires ont été trouvées, **Rhodotorula** et **Candida valida,** celle-ci étant la forme imparfaite, non sporogène, de **Pichia membranaefaciens.**

TABLEAU V

Composition de la microflore des levures en vinification continue

	LIMOUX		BUZET-sur-BAISE		TOTAL	
Nombre de prélèvements effectués	20		62		82	
Nombre de prélèvements productifs	13		52		65	
Nombre de souches isolées	68		281		349	
Espèces	Nombre de souches	Nombre de souches p. 100	Nombre de souches	Nombre de souches p. 100	Nombre de souches	Nombre de souches p. 100
Hans. uvarum			18	6	18	5
Sacch. ellipsoideus	59	87	252	90	311	89
Autres **Saccharomyces**	9	13	9	3	18	5
Candida valida			1	1	1	1
Rhodotorula			1	1	1	1

TABLEAU VI

Répartition des levures en vinification continue à différents niveaux du vinificateur (cave coopérative de Buzet-sur-Baïse)

Nombre de jours de fonctionnement du vinificateur	Bas du vinificateur	Sortie du vinificateur	Haut du vinificateur	Niveau du marc	Vin de presse
3	6 **Sacch. ellipsoideus**				
4	1 **Hans. uvarum** 5 **Sacch. ellipsoideus**				
5		6 **Sacch. ellipsoideus**			
6					2 **Hans. uvarum** 5 **Sacch. ellipsoideus**
7 - 10	1 **Rhodotorula** 17 **Sacch. ellipsoideus**	24 **Sacch. ellipsoideus**		16 **Sacch. ellipsoideus**	17 **Sacch. ellipsoideus** 1 Autre **Saccharomyces**
11		4 **Sacch ellipsoideus** 2 Autres **Saccharomyces**		6 **Sacch. ellipsoideus**	2 **Hans. uvarum** 4 **Sacch. ellipsoideus**
12		5 **Sacch. ellipsoideus** 1 Autre **Saccharomyces**		1 **Hans. uvarum** 5 **Sacch. ellipsoideus**	3 **Sacch. ellipsoideus**

TABLEAU VI (suite)

Nombre de jours de fonctionnement du vinificateur	Bas du vinificateur	Sortie du vinificateur	Haut du vinificateur	Niveau du marc	Vin de presse
13			3 **Hans. uvarum** 1 **Sacch. ellipsoideus**	3 **Sacch. ellipsoideus**	
14	5 **Sacch. ellipsoideus** 1 **C. valida**				
15	5 **Sacch. ellipsoideus**	6 **Sacch. ellipsoideus**		5 **Sacch. ellipsoideus** 1 Autre **Saccharomyces**	1 **Hans. uvarum.** 5 **Sacch. ellipsoideus**
16	3 **Sacch. ellipsoideus**	5 **Sacch. ellipsoideus**		5 **Sacch. ellipsoideus**	5 **Sacch. ellipsoideus**
17	1 **Hans. uvarum** 5 **Sacch. ellipsoideus**		2 **Hans. uvarum** 3 **Sacch. ellipsoideus**	4 **Sacch. ellipsoideus**	6 **Sacch. ellipsoideus**
18	2 **Hans. uvarum** 3 **Sacch. ellipsoideus**	4 **Sacch. ellipsoideus**	1 **Hans. uvarum** 3 **Sacch. ellipsoideus**	6 **Sacch. ellipsoideus**	3 **Sacch. ellipsoideus** 1 Autre **Saccharomyces**
19	5 **Sacch. ellipsoideus**	1 **Hans. uvarum** 4 **Sacch. ellipsoideus**	6 **Sacch. ellipsoideus**	6 **Sacch. ellipsoideus**	2 **Sacch. ellipsoideus** 2 Autres **Saccharomyces**
20	1 **Hans. uvarum** 5 **Sacch. ellipsoideus**	6 **Sacch. ellipsoideus**	4 **Sacch. ellipsoideus** 1 Autre **Saccharomyces**	6 **Sacch. ellipsoideus**	

CONCLUSION

Les résultats obtenus au cours de ces diverses études ne nous ont pas livré la clé de l'énigme que pose la disparition des levures apiculées dans les cuves de fermentation, car précisément cette disparition n'a pu être reproduite au laboratoire en travaillant avec du moût stérile. Alors qu'au cours de la vinification, la vie de **Hans. uvarum** est courte et ne dépasse pas le quatrième jour, en cultures pures avec **Sacch. ellipsoideus,** elle se prolonge jusqu'au dix-huitième jour, même si l'on enrichit le milieu en alcool. D'autre part, dans ces dernières conditions on retrouve à l'examen microscopique les cellules des levures apiculées dans le fond des récipients, alors que les lies de vin ne présentent pas ces levures. D'autres études seraient nécessaires pour éclairer le comportement des levures apiculées et expliquer leur « dissolution » dans les conditions de la pratique.