NOUVELLES ETUDES DE LA MICROFLORE EN VINIFICATION

Mme S. SAPIS-DOMERCQ
Station agronomique et œnologique de Bordeaux

Notre étude sur les levures de la Gironde de 1951 à 1954 portait sur des prélèvements de raisins effectués à la vigne et de moûts en fermentation pris dans les cuves. A partir de l'échantillon recueilli de cette manière, d'autres prélèvements étaient effectués au cours de la fermentation à l'étuve à 25° C. Ce mode de prélèvement donnait une idée de la microflore levurienne responsable de la fermentation du moût. Par contre, il ne fournissait pas de précisions sur l'évolution de la microflore se développant dans les cuves mêmes pendant la durée de la fermentation.

Pour combler cette lacune, une nouvelle étude systématique a été entreprise lors des vendanges 1968 dans quatre propriétés de la région des Graves, près de Bordeaux. Une étude similaire a été conduite également dans deux installations situées à Buzet-sur-Baïse (Lot-et-Garonne) et à Limoux (Aude), permettant de comparer les microflores spontanées qui se développent dans les vinificateurs continus et dans les cuves classiques.

A. — **VINIFICATION CLASSIQUE.**

Technique des prélèvements. — Les prélèvements ont été faits quotidiennement ou tous les deux jours, à différents niveaux des cuves : soit par le robinet du bas, soit par le robinet dégustateur à mi-hauteur, soit encore à la partie supérieure dans le vin qui baigne le marc et dans la partie du marc flottant.

Les liquides ont été recueillis dans des flacons stériles (600 ml environ); le marc prélevé dans des bocaux stériles était ensuite agité énergiquement avec de l'eau stérile et le jus de rinçage transvasé dans un flacon stérile. Le marc étant plus ou moins comprimé et immergé, son aspect et son poids pouvaient être variables pour un volume à peu près

constant; en conséquence, le volume du liquide de rinçage pouvait également varier beaucoup; pour cette raison les déterminations quantitatives faites sur le marc manquent de précision.

A partir des liquides ainsi obtenus, deux séries de prélèvements ont été effectuées, l'une pour la numération des levures, l'autre pour l'identification.

Numération. — Elle a été réalisée sur milieu solide en boîtes de Pétri. Les dilutions utilisées étaient 10^{-4} à 10^{-6}, et en fin de fermentation 10^{-3} à 10^{-5}; les boîtes étant mises à incuber à 25° C, la lecture pouvait se faire au bout de 48 heures. Les résultats sont représentés par les courbes d'évolution de la population de levures. D'une façon générale, ces courbes font apparaître qu'après une première phase de multiplication rapide le nombre de levures vivantes décroît non moins rapidement. C'est au deuxième ou troisième jour qu'est atteinte la population maximale. La consistance variable du marc, l'addition d'anhydride sulfureux peuvent être des sources d'irrégularités.

Les traitements de vinification appliqués à la cuve en fermentation ont une grande importance, notamment le moment du sucrage. Dans la cuve n° 1 (fig. 1) le sucrage paraît avoir été fait trop tard, le troisième jour, car la population en levures vivantes avait déjà diminué quand le sucre a été ajouté. Il en est cependant résulté une nouvelle prolifération de levures. Lorsque le sucrage intervient le premier jour, la population maximale de levures est atteinte plus tôt (fig. 1, 2, 3 et 4). Dans la cuve n° 4 le sulfitage de la vendange a retardé le départ de la fermentation jusqu'au troisième jour. La population a ensuite commencé à augmenter, mais si brutalement qu'elle était maximale en 24 h.

D'une façon générale, c'est dans le liquide baignant le marc que se trouve le plus grand nombre de cellules vivantes (150 à 250 millions par ml). Le moût en fermentation est moins riche en levures (90 à 130 millions par ml).

Identification. — Une autre série de dilutions, non numériques, pratiquées à l'anse de platine, a été réservée aux identifications. On a choisi les colonies sur les boîtes où elles étaient peu nombreuses. En général c'est la seconde ou la troisième dilution qui a servi aux séparations car la première et parfois la seconde présentaient une trop grande concentration de colonies.

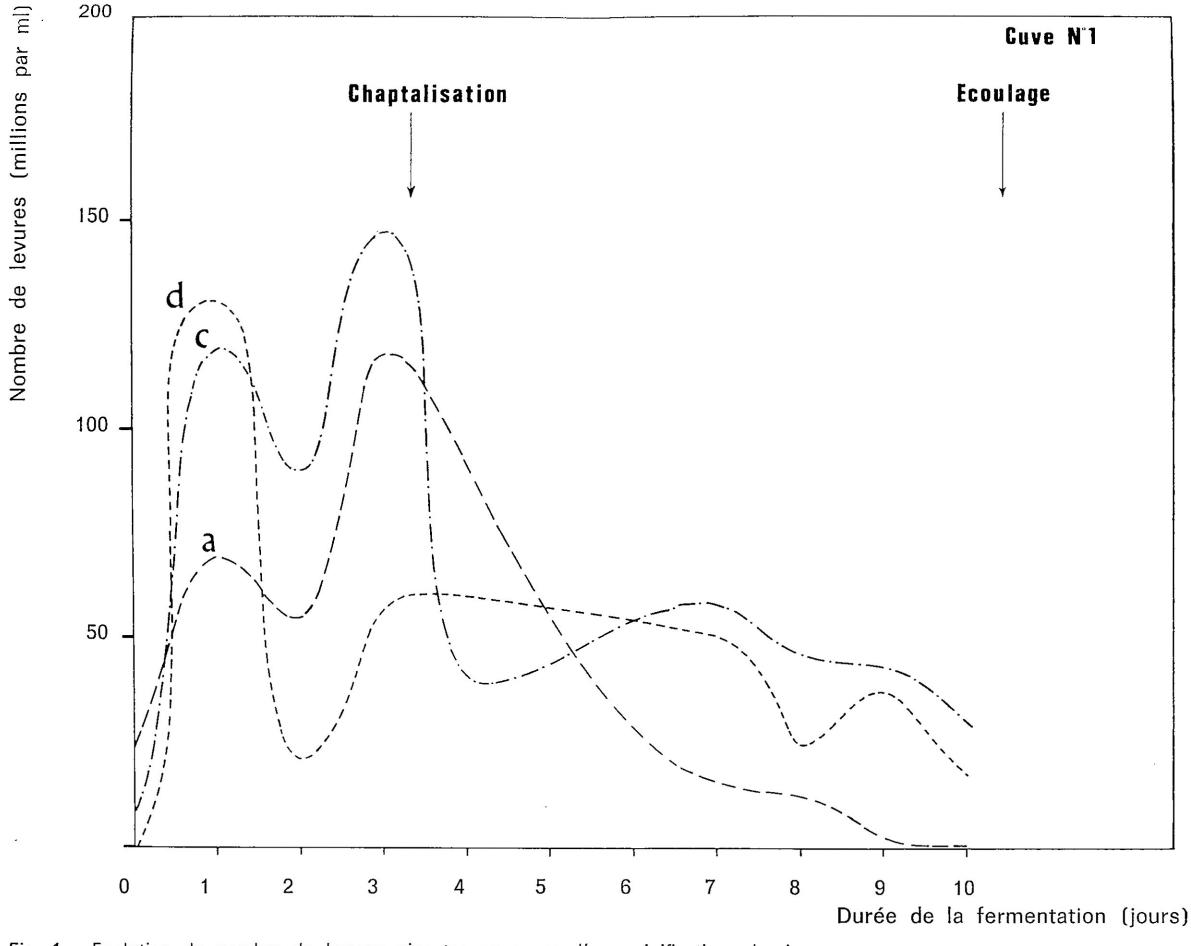


Fig. 1 - Evolution du nombre de levures vivantes au cours d'une vinification classique.
a = bas de la cuve
b = vin baignant le marc
d = marc

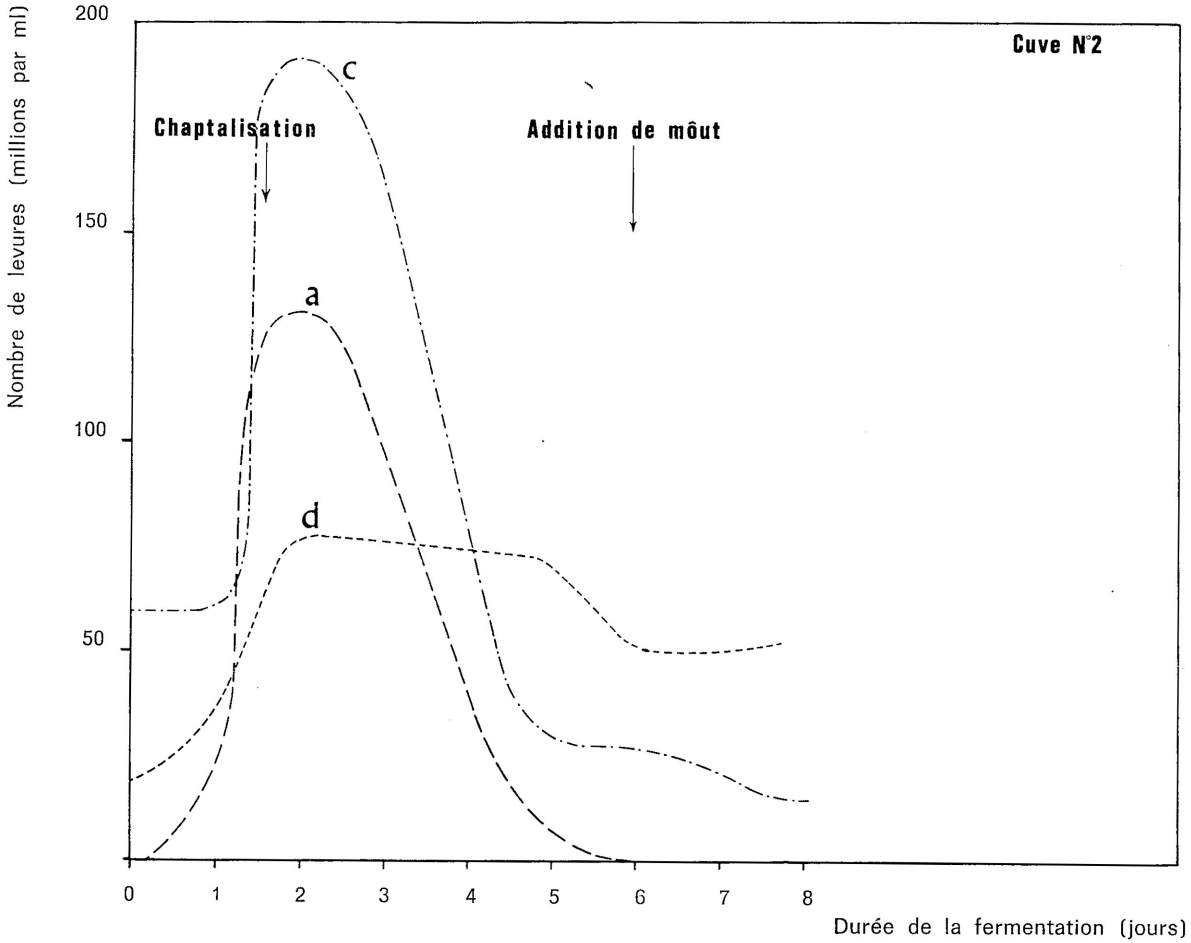


Fig. 2 - Evolution du nombre de levures vivantes au cours d'une vinification classique.
a = bas de la cuve
c = vin baignant le marc
d = marc

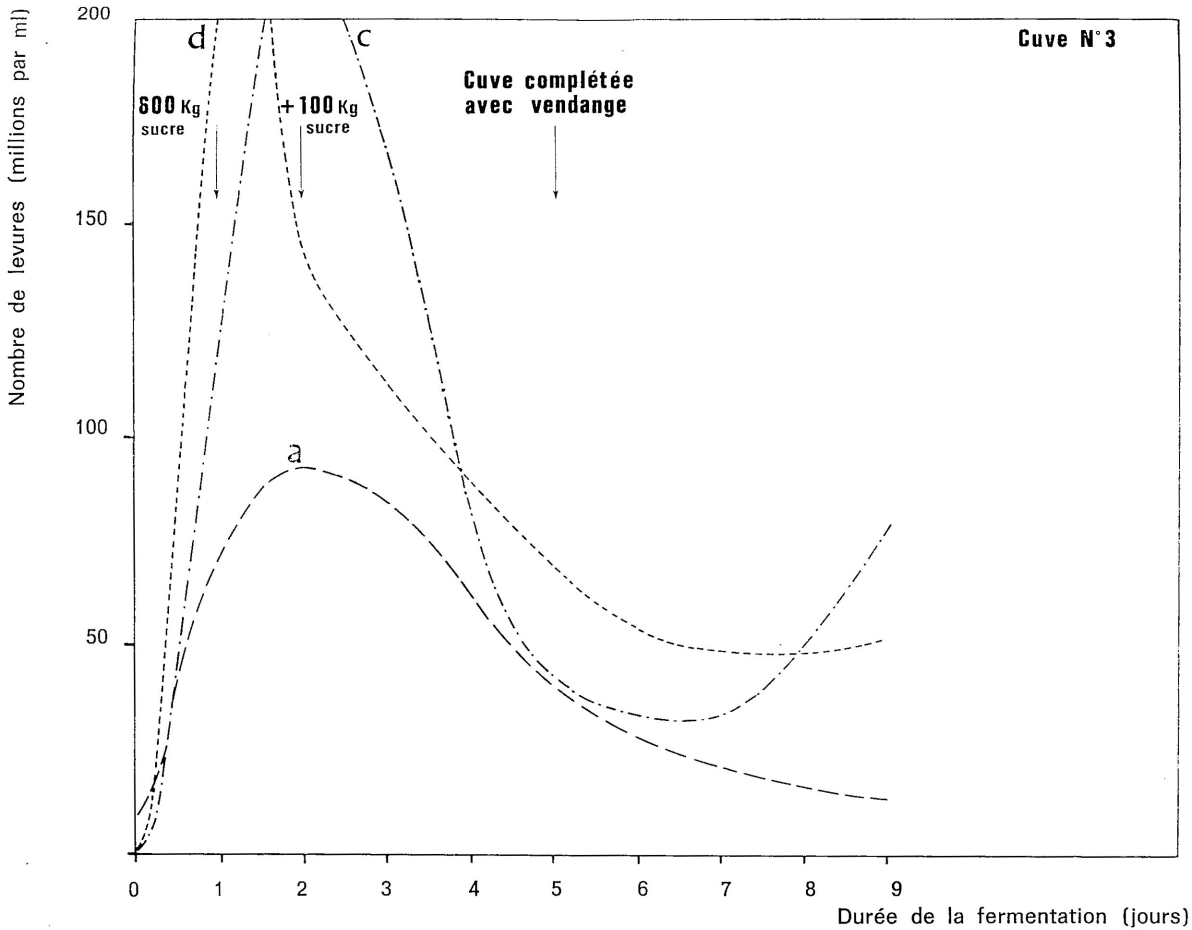


Fig. 3 - Evolution du nombre de levures vivantes au cours d'une vinification classique.
a = bas de la cuve
c = vin baignant le marc
d = marc

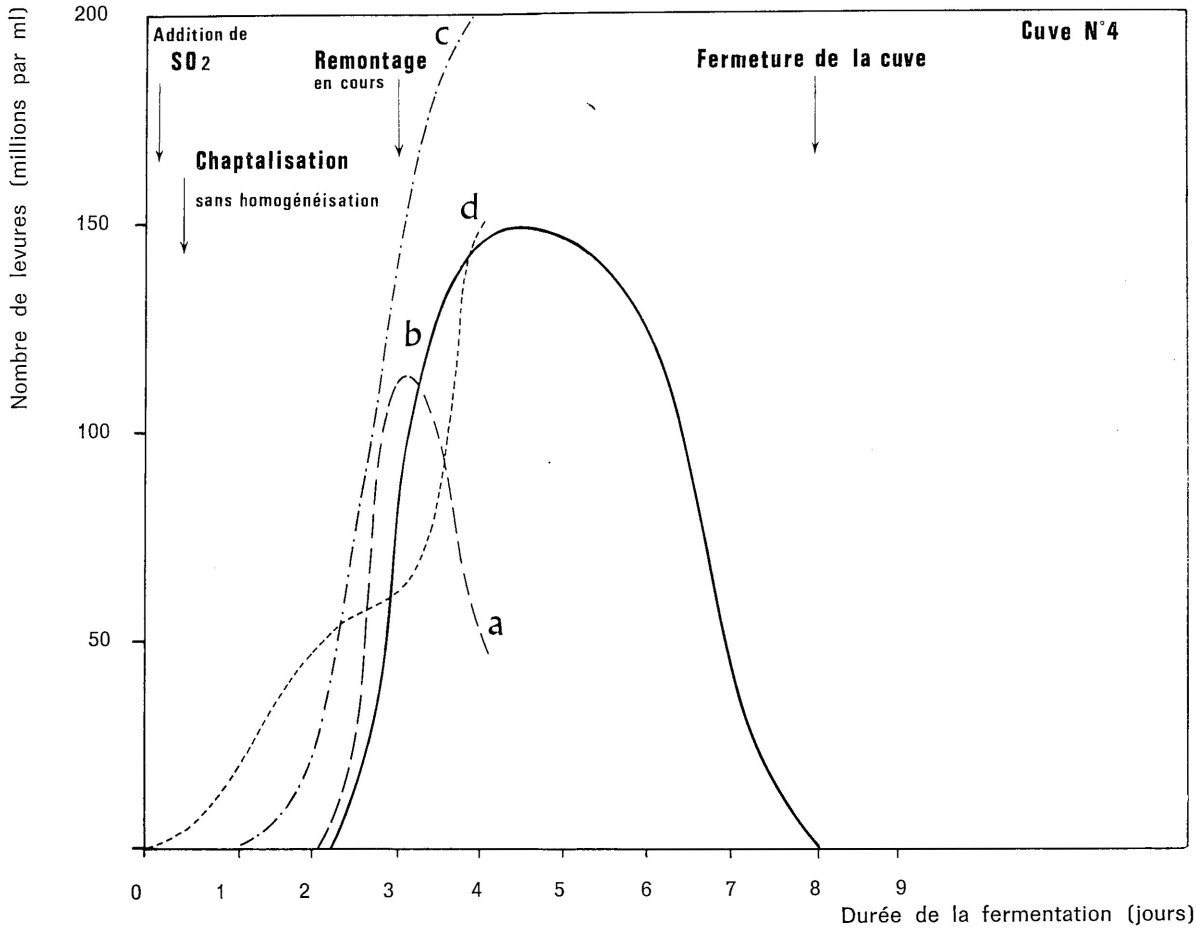


Fig. 4 - Evolution du nombre de levures vivantes au cours d'une vinification classique.
a = bas de la cuve
c = mi-hauteur
c = vin baignant le marc
d = marc

Les vinifications ont duré onze à treize jours. 293 souches de levures ont été isolées et identifiées; elles appartiennent à quatre genres et treize espèces. Ces nouveaux essais confirment la grande variété de la microflore levurienne dans les fermentations (Tableaux I, II, III, IV).

Résultats. — Comme on l'a toujours constaté c'est **Sacch. ellipsoideus** qui occupe la place prépondérante (60 p. 100). **Hanseniaspora uvarum** ne représente que 5,5 p. 100 des colonies, car cette espèce a disparu au quatrième jour.

Parmi les **Saccharomyces** (91 p. 100 de la microflore totale), les espèces les plus représentées sont ensuite **Sacch. italicus** (17,4 p. 100) et **Sacch. chevalieri** (7,9 p. 100). **Sacch. oviformis** ne constitue que 1,7 p. 100 des souches. Il faut noter la présence de **Sacch. delbrueckii.** De même, **Sacch. carlsbergensis** se rencontre dans plusieurs cas, et **Sacch. elegans, Sacch. rosei, Sacch. rouxii, Sacch. heterogenicus** une fois chacun. L'identification de sept souches a nécessité des tests supplémentaires. Elles ne sont pas douées de pouvoir fermentaire vis-à-vis des sucres, forment des voiles et des dépôts abondants et n'assimilent pas le nitrate; elles se développent très abondamment sur le tube témoin de l'assimilation des sucres de sorte que ce test paraissait manquer de rigueur. Envoyées au **Centraalbureau voor Schimmelcultures** de Delft elles ont été identifiées par Mlle SLOOF, que nous remercions vivement de sa contribution à ce travail. Ces souches appartiennent aux espèces **Pichia membranaefaciens** Hansen (2 souches) et **Debaryomyces hansenii** Zopf (5 souches).

Au point de vue de la succession des espèces au cours de la fermentation, le seul fait apparent est la présence de **Hans. uvarum** en début de vinification : cette espèce n'est plus observée après le quatrième jour. L'action des **Saccharomyces,** au contraire, s'étale pendant toute la vinification de la cuve; dans ces vinifications, **Saccharomyces oviformis** est resté abondant, même vers la fin.

Lors des études de 1953, les prélèvements avaient porté seulement sur deux vignobles de la même région des Graves. 25 souches de levures avaient été isolées parmi lesquelles 6 **Hans. uvarum** (24 p. 100), 9 **Sacch. ellipsoideus** (36 p. 100), 2 **Sacch. italicus** (8 p. 100), 4 **Torulopsis bacillaris** (16 p. 100), un **Sacch. chevalieri,** un **Sacch. uvarum,** un **Sacch. carlsbergensis,** un **Debaryomyces hansenii.** Les proportions sont un peu différentes, car les conditions de prélèvement n'étaient pas les mêmes, mais les résultats présentent une bonne reproductibilité et on retrouve encore **Sacch. italicus** et même **Debaryomyces.** Par contre **Torulopsis bacillaris**

TABLEAU I

Répartition des espèces de levures dans une cuve en fermentation (Cuve n° 1)

Nombre de jours de fermentation	Bas de la Cuve	Liquide baignant le marc	Marc
1	1 **Hans uvarum** 3 **Sacch. ellipsoideus** 1 **Sacch. chevalieri** 3 **Sacch. italicus**	1 **Hans. uvarum** 3 **Sacch. ellipsoideus** 1 **Sacch. italicus** 1 **Sacch. delbrueckii**	1 **Hans. uvarum** 2 **Sacch. ellipsoideus** 1 **Sacch. chevalieri** 1 **Sacch. italicus**
2	3 **Sacch. ellipsoideus** 2 **Sacch. italicus** 1 **Sacch. delbrueckii**		1 **Hans uvarum** 3 **Sacch. ellipsoideus** 1 **Sacch. chevalieri** 1 **Sacch. italicus**
3	1 **Sacch. ellipsoideus** 1 **Sacch. carlsbergensis** 1 **Sacch. chevalieri** 1 **Sacch. italicus**	2 **Sacch. ellipsoideus** 2 **Sacch. chevalieri** 1 **Sacch. italicus** 1 **Sacch. delbrueckii**	1 **Hans. uvarum** 3 **Sacch. ellipsoideus** 2 **Sacch. chevalieri**
4	4 **Sacch. ellipsoideus**	5 **Sacch. ellipsoideus** 1 **Sacch. italicus**	1 **Hans. uvarum** 4 **Sacch. ellipsoideus** 1 **Sacch. italicus**

TABLEAU I (suite)

Nombre de jours de fermentation	Bas de la Cuve	Liquide baignant le marc	Marc
7	5 **Sacch. ellipsoideus** 1 **Sacch. delbrueckii**		3 **Sacch. ellipsoideus** 1 **Sacch. chevalieri** 1 **Sacch. italicus**
8	5 **Sacch. ellipsoideus** 1 **Sacch. chevalieri**	2 **Sacch. ellipsoideus** 2 **Sacch. italicus** 1 **Sacch. delbrueckii**	
9	5 **Sacch. ellipsoideus** 1 **Sacch. chevalieri**	2 **Sacch. ellipsoideus** 2 **Sacch. italicus** 2 **Sacch. chevalieri**	1 **Sacch. chevalieri** 1 **Sacch. italicus**
10	5 **Sacch. ellipsoideus** 1 **P. membranaefaciens**	5 **Sacch. ellipsoideus** 1 **Sacch. italicus**	2 **Sacch. ellipsoideus** 1 **Sacch. chevalieri** 1 **Sacch. italicus**
11			3 **D. hansenii**
Total	1 **Hans. uvarum** 31 **Sacch. ellipsoideus** 4 **Sacch. chevalieri** 6 **Sacch. italicus** 2 **Sacch. delbrueckii** 1 **Sacch. carlsbergensis** 1 **P. membranaefaciens**	1 **Hans. uvarum** 19 **Sacch. ellipsoideus** 4 **Sacch. chevalieri** 8 **Sacch. italicus** 3 **Sacch. delbrueckii**	4 **Hans. uvarum** 17 **Sacch. ellipsoideus** 7 **Sacch. chevalieri** 6 **Sacch. italicus** 3 **D. hansenii**

TABLEAU II

Répartition des espèces de levures dans une cuve en fermentation (Cuve n° 2)

Nombre de jours de fermentation	Bas de la Cuve	Liquide baignant le marc	Marc
0	2 **Sacch. ellipsoideus**	3 **Sacch. ellipsoideus** 1 **Sacch. rosei**	1 **Sacch. ellipsoideus**
1	1 **Hans. uvarum** 1 **Sacch. ellipsoideus** 1 **Sacch. italicus**	1 **Hans. uvarum** 4 **Sacch. ellipsoideus**	
2	2 **Sacch. ellipsoideus**	4 **Sacch. ellipsoideus** 1 **Sacch. oviformis**	2 **Sacch. ellipsoideus** 1 **Sacch. chevalieri** 1 **Sacch. italicus**
5	4 **Sacch. ellipsoideus** 1 **Sacch. chevalieri** 1 **Sacch. italicus**	6 **Sacch. ellipsoideus**	2 **Sacch. ellipsoideus** 1 **Sacch. italicus**
6	4 **Sacch. ellipsoideus** 2 **Sacch. italicus**		2 **Sacch. ellipsoideus** 2 **Sacch. chevalieri** 1 **Sacch. italicus** 1 **Sacch. delbrueckii**
8	4 **Sacch. ellipsoideus** 1 **Sacch. italicus**	4 **Sacch. italicus**	1 **Sacch. ellipsoideus** 2 **Sacch. italicus** 2 **Sacch. chevalieri**
13		5 **Sacch. ellipsoideus** 1 **Sacch. chevalieri**	
Total	1 **Hans. uvarum** 17 **Sacch. ellipsoideus** 5 **Sacch. italicus** 1 **Sacch. chevalieri**	1 **Hans. uvarum** 22 **Sacch. ellipsoideus** 10 **Sacch. italicus** 1 **Sacch. chevalieri** 1 **Sacch. oviformis** 1 **Sacch. rosei**	8 **Sacch. ellipsoideus** 5 **Sacch. italicus** 5 **Sacch. chevalieri** 5 **Sacch. delbrueckii**

TABLEAU III

Répartition des espèces de levures dans une cuve en fermentation (Cuve n° 3)

Nombre de jours de fermentation	Bas de la Cuve	Liquide baignant le marc	Marc
0			1 **Hans. uvarum**
1		6 **Sacch. ellipsoideus**	
2	1 **Hans. uvarum** 3 **Sacch. ellipsoideus** 1 **Sacch. oviformis**	2 **Sacch. ellipsoideus**	2 **Sacch. ellipsoideus** 1 **Sacch. oviformis** 3 **Sacch. italicus**
7	5 **Sacch. ellipsoideus** 1 **D. hansenii**	4 **Sacch. ellipsoideus** 1 **Sacch. oviformis** 1 **Sacch. italicus**	4 **Sacch. ellipsoideus** 1 **Sacch. oviformis** 1 **Sacch. heterogenicus**
9		5 **Sacch. ellipsoideus** 1 **Sacch. italicus**	1 **Sacch. ellipsoideus**
Total	1 **Hans. uvarum** 8 **Sacch. ellipsoideus** 1 **Sacch. oviformis** 1 **D. hansenii**	17 **Sacch. ellipsoideus** 1 **Sacch. oviformis** 2 **Sacch. italicus**	1 **Hans. uvarum** 7 **Sacch. ellipsoideus** 1 **Sacch. oviformis** 1 **Sacch. italicus** 1 **Sacch. heterogenicus**

TABLEAU IV

Répartition des espèces de levures dans une cuve en fermentation (Cuve n° 4)

Nbre de jours de fermentation	Bas de la Cuve	Centre de la cuve	Liquide baignant le marc	Marc
1	1 **D. hansenii**	2 **Sacch. ellipsoideus** 1 **Sacch. rouxii** 1 **Sacch. elegans**	1 **Hans uvarum** 1 **P. membranaefaciens**	
2		5 **Sacch. ellipsoideus** 1 **Sacch. carlsgerbensis**	6 **Sacch. ellipsoideus**	2 **Hans. uvarum** 2 **Sacch. ellipsoideus**
3	1 **Hans. uvarum** 1 **Sacch. ellipsoideus**	3 **Sacch. ellipsoideus** 2 **Sacch. italicus**	2 **Hans. uvarum** 3 **Sacch. ellipsoideus** 1 **Sacch. italicus**	1 **Sacch. ellipsoideus** 2 **Sacch. carlsbergensis** 3 **Sacch. italicus**
4	2 **Sacch. ellipsoideus**	5 **Sacch. ellipsoideus** 1 **Sacch. chevalieri**		
8				1 **Sacch. ellipsoideus**
Total	1 **Hans. uvarum** 3 **Sacch. ellipsoideus** 1 **D. hansenii**	15 **Sacch. ellipsoideus** 2 **Sacch. italicus** 1 **Sacch. chevalieri** 1 **Sacch. carlsbergensis** 1 **Sacch. rouxii** 1 **Sacch. elegans**	3 **Hans uvarum** 9 **Sacch. ellipsoideus** 1 **Sacch. italicus**	2 **Hans. uvarum** 4 **Sacch. ellipsoideus** 3 **Sacch. italicus** 2 **Sacch. carlsbergensis**

n'a pas été observé en 1968, sur un nombre de souches pourtant beaucoup plus élevé.

B. — VINIFICATION CONTINUE.

Une étude sommaire des levures avait été effectuée en 1967 dans deux installations utilisant ce mode de vinification. Nous avions surtout mis en évidence la présence constante de **Sacch. ellipsoideus** et de **Sacch. oviformis** pendant tout le cours du fonctionnement des appareils.

En 1968, l'étude a porté à la fois sur la numération des levures vivantes et sur l'identification des espèces. Dans la mesure où celà était possible, nous avons aussi essayé d'étudier parallèlement des cuves vinifiées de manière classique afin de disposer d'un élément de comparaison.

Technique des prélèvements. — Les appareils de vinification continue ont fonctionné pendant 20 jours. Les prélèvements ont été effectués tous les matins, avant le début du chargement de vendange fraîche, à différents niveaux de l'appareil : en bas des vinificateurs, à la sortie du vin placée à la hauteur du marc, dans le vin de presse, dans le marc lui-même.

Dans les cuves classiques, les prélèvements ont été faits de la même manière en plusieurs endroits. Les numérations ont été pratiquées sur place, tandis que l'identification, après conservation des boîtes de Pétri au réfrigérateur, a été réalisée au laboratoire de la Station.

Les résultats fournis par l'examen microscopique des cultures de 3 jours à 25° C et les tests classiques de fermentation des sucres (maltose, saccharose, galactose et raffinose) ont permis de classer la plupart des souches isolées. Pour quelques souches une étude complémentaire a été nécessaire : test d'assimilation des sucres non fermentés, examen microscopique en milieu liquide et milieu solide, et recherche des spores. En dernier ressort, les souches indéterminées ont été identifiées par le **Centraalbureau voor Schimmelcultures.**

C. — RESULTATS.

Le tableau V donne l'exemple des populations de levures dans le cas de la fermentation continue et le tableau VI dans les cas de cuves de fermentation classique. On remarque tout d'abord que dans le premier cas le nombre des levures totales et vivantes est pratiquement le double de

TABLEAU V

Exemple de l'évolution de la population des levures dans un appareil vinificateur continu (Cave coopérative de Limoux).

Nombre de jours de fonctionnement du vinificateur	Sortie du vin		Niveau du marc		Vin de presse	
	Levures		Levures		Levures	
	Totales	Vivantes	Totales	Vivantes	Totales	Vivantes
2	186	120	—	—	—	—
3	148	120	252	—	—	—
4	160	130	260	240	320	125
5	152	120	450	260	300	180
6	156	105	500	350	280	160
7	240	—	260	112	—	—
8	200	160	120	60	160	80
9	200	89	310	120	—	—
10	152	120	180	83	248	160
11	236	120	—	—	260	180
12	148	134	—	—	—	—
13	168	128	300	120	—	—
14	148	124	240	140	—	—
15	128	102	220	128	346	180
16	156	120	260	146	286	160
17	148	—	320	168	320	180
18	116	100	—	—	—	—
19	128	110	—	—	300	178
20	148	106	260	140	282	168

Les résultats sont exprimés en milliers de levures par mm^3

TABLEAU VI

Evolution de la population des levures en vinification classique (Cave coopérative de Limoux)

Nombre de jours de fermentation	Cuve 1		Cuve 2	
	Levures		Levures	
	Totales	Vivantes	Totales	Vivantes
1	16	20	12	16
2	78	85	28	25
3	94	96	92	90
4	90	40	78	60
Au moment de l'écoulage	85	10	62	22

Les résultats sont exprimés en milliers de levures par mm^3

celui constaté dans le second. On peut en conclure que la vinification continue, grâce à l'apport continu de substances nutritives, réalise les meilleures conditions pour le développement des levures.

Dans les vinificateurs on atteint 160 millions de levures par ml dans le vin, 350 millions dans le marc ou dans le vin de presse. Le pourcentage des levures vivantes par rapport à la population totale reste relativement constant. Par contre, il ne cesse de diminuer dans la fermentation en cuve (Tableau IV). La population maximale y est atteinte au troisième jour. Au moment de l'écoulage, il y a 5 à 10 fois plus de levures dans le vin sortant du vinificateur que dans celui sortant des cuves habituelles.

Les identifications ont porté sur 87 prélèvements effectués dans deux caves coopératives; 22 proviennent de cuves classiques, 65 de vinificateurs continus. 452 souches ont été ainsi isolées, 108 à Limoux et 344 à Buzet-sur-Baïse. Elles se répartissent en 6 genres et 10 espèces. Le tableau VII récapitule la classification de toutes les souches étudiées.

Le genre **Saccharomyces** est le plus représenté avec 5 espèces et 422 souches, soit 93,5 p. 100 des souches. Dans ce genre, c'est, selon

l'habitude, **Sacch. ellipsoideus** (86,5 p. 100) qui est prépondérant. Le rôle de **Hans. uvarum** est très réduit : il se limite à 23 souches, (5 p. 100). On note la présence de **Torulopsis bacillaris.** Deux genres non fermentaires ont été identifiés à **Rhodotorula** et **Candida.**

TABLEAU VII

Récapitulation des espèces de levures identifiées en 1968.

Espèces identifiées	Vinification classique	Vinification continue	
	Graves	Limoux	Buzet-sur-Baïse
Hanseniaspora uvarum	16	0	23
Sacch. ellipsoideus	177	89	302
Sacch. oviformis	5	7	13
Sacch. chevalieri	23	2	2
Sacch. italicus	51	5	0
Sacch. delbruecki	6	0	0
Sacch. carlsbergensis	4	0	0
Sacch. elegans	1	0	0
Sacch. rosei	1	2	0
Sacch. heterogenicus	1	0	0
Sacch. rouxii	1	0	0
Torulopsis bacillaris	0	1	2
Debaryomyces	5	1	1
Rhodotorula	0	0	1
Candida valida	0	1	0
Pichia membranaefaciens	2	0	0
Nombre total de souches	293	108	344

Plusieurs remarques peuvent être faites : **Hans. uvarum** n'est pas représenté à Limoux, ni dans les cuves, ni dans le vinificateur. Ce résultat est surprenant. Il amène à penser que la microflore naturelle des régions vinicoles du Midi est totalement inconnue et qu'elle est différente de celle du Sud-Ouest. On peut regretter que l'étude des levures se soit limitée en France à la seule région de Bordeaux.

A Buzet-sur-Baïse on a toujours trouvé **Hans. uvarum** : même dans le vinificateur, tout au long de la durée de son fonctionnement et à tous les niveaux de l'appareil. Par contre dans les cuves classiques on en trouve normalement jusqu'au deuxième jour puis cette espèce disparaît selon le processus étudié précédemment. Le pourcentage de **Sacch. ellipsoideus** est toujours nettement plus élevé dans les vinificateurs : 90.5 p. 100 au lieu de 79,5 p. 100 à Buzet-sur-Baïse, 88 p. 100 au lieu de 77 p. 100 à Limoux. La fermentation continue tend à sélectionner les levures les plus résistantes et les plus alcoogènes.

D. — **CONCLUSION.**

L'expérimentation conduite lors des vendanges de 1968 en Gironde, en Lot-et-Garonne et dans l'Aude a apporté d'intéressantes précisions sur l'évolution quantitative de la microflore responsable de la fermentation dans la pratique et sur la répartition des levures dans les cuves. C'est dans le marc, aussi bien dans la partie flottante que dans la partie immergée, que la concentration en levures est la plus grande. C'est d'autre part en vinification continue que l'on atteint les populations levuriennes les plus fortes. Dans la fermentation en cuve, le nombre des levures vivantes diminue rapidement et le vin écoulé en contient peu. Dans la vinification continue la proportion des levures vivantes est élevée et reste constante; le vin écoulé est très riche en levures actives.

L'identification des levures a confirmé dans les grandes lignes les observations faites de 1951 à 1954 c'est-à-dire la grande variété des espèces, la prédominance des **Saccharomyces** et plus particulièrement de **Sacch. ellipsoideus,** la disparition des **Hans. uvarum** après quelques jours de fermentation. La microflore des vinificateurs continus est différente; malgré un apport journalier des levures des raisins, il se développe surtout une microflore alcoogène, sélectionnée par les conditions de la fermentation.