ETUDE DE LA FLORE LEVURIENNE DES REGIONS VITICOLES PÉRIPHÉRIQUES EN TCHÉCOSLOVAQUIE

E. MINARIK
Institut de Recherches Viti-Vinicoles, Bratislava, Tchécoslovaquie.

I. - INTRODUCTION

De 1958 à 1964, des études détaillées ont été faites sur les problèmes d'écologie des espèces de levures et microorganismes levuriformes existant dans les différentes régions viticoles productrices en Tchécoslovaquie. Les résultats de ces études ont été donnés dans une série de publications (MINARIK, 1960, 1961, 1963, 1963 a, 1964, 1966). Il s'est avéré que les conditions climatiques de la région et de l'année influencent la répartition quantitative des espèces dominantes de levures dans la microflore du raisin, du moût et du vin. Ce sont surtout les précipitations atmosphériques et la température moyenne durant la végétation qui ont une importance significative. D'un autre côté, la nature du sol et les variétés de vigne n'ont que peu d'importance sur la composition qualitative de la microflore.

Afin de compléter nos connaissances sur la présence et l'importance des levures des habitats naturels, nous avons fait, en 1964-1969, une étude des levures dans deux régions viticoles périphériques de Tchécoslovaquie ayant des conditions climatiques extrêmes : en Bohême et dans la région de Skalica-Záhorie, en Slovaquie de l'Ouest. Nous avons choisi aussi la région de Saale-Unstrut, en République démocratique allemande (R.D.A.), à titre de comparaison. On peut considérer les régions mentionnées comme les limites de la culture de la vigne.

Par rapport aux travaux de CASTELLI (1954, 1957, 1965), de PEYNAUD et DOMERCQ (1953, 1959) et de DOMERCQ (1956), nous avons observé certaines différences quantitatives et qualitatives en ce qui concerne la composition de la flore levurienne de la fermentation spontanée de moûts.

II. - MATERIEL ET METHODES

Juste avant les vendanges, nous avons prélevé les échantillons des raisins blancs et noirs, à l'aide d'une méthode déjà décrite (MINARIK, 1966). Au total, nous avons prélevé 12 échantillons dans la région de Skalica-Záhorie, 9 échantillons en Bohême et 8 échantillons dans la région de Saale-Unstrut. Nous avons obtenu respectivement 238, 116 et 45 cultures pures de levures. C'est par la méthode de dilution d'après KOCH et selon la technique décrite précédemment (MINARIK, 1966) que nous avons isolé les levures. Des échantillons des deux premières régions nous avons obtenu 12 et 14 souches. Les souches des différents échantillons de moût ont été isolées avant la fermentation, pendant la phase tumultueuse et à la fin de la fermentation.

Nous avons effectué l'identification et la classification de ces levures d'après LODDER et KREGER VAN RIJ (1952). Certaines méthodes d'identification, par exemple les tests d'assimilation et de fermentation par chromatographie sur papier, ont été décrites dans nos travaux antérieurs (MINARIK et **al.**, 1959, 1960).

III. - CARACTERISTIQUES DES REGIONS VITICOLES

A. — REGION DE SKALICA-ZAHORIE

On la divise en trois sous-régions : la sous région de Skalica, la sous-région transcarpathienne et celle de Záhorie (Kisɔn et Hanák, 1962). Ces sous-régions se trouvent dans une microzone assez chaude, d'humidité modérée ou sèche, avec des hivers à température modérée. La température annuelle moyenne est de 8 à 9° C, la température de l'air est de 15 à 16° C pendant la période de végétation. La pluviosité annuelle dans la sous-région de Skalica varie de 600 à 800 mm et pendant la période de végétation de 400 à 450 mm dans toutes les sous-régions. La luminosité moyenne varie de 2.000 à 2.200 heures et pendant la période de végétation de 1.400 à 1.500 heures. Dans la sous-région de Skalica, les vignobles sont situés sur des sols limoneux et limoneux-sableux ; dans la sous-région trancarpathienne prédominent les sols limoneux et dans la sous-région de Záhorie les sols sont sableux, parfois aussi limoneux-sableux, limoneux et argileux.

Pour la sous-région de Skalica, on recommande les cépages blancs Müller-Thurgau, Bouvier, Muscat Othonel et les cépages noirs Portugais

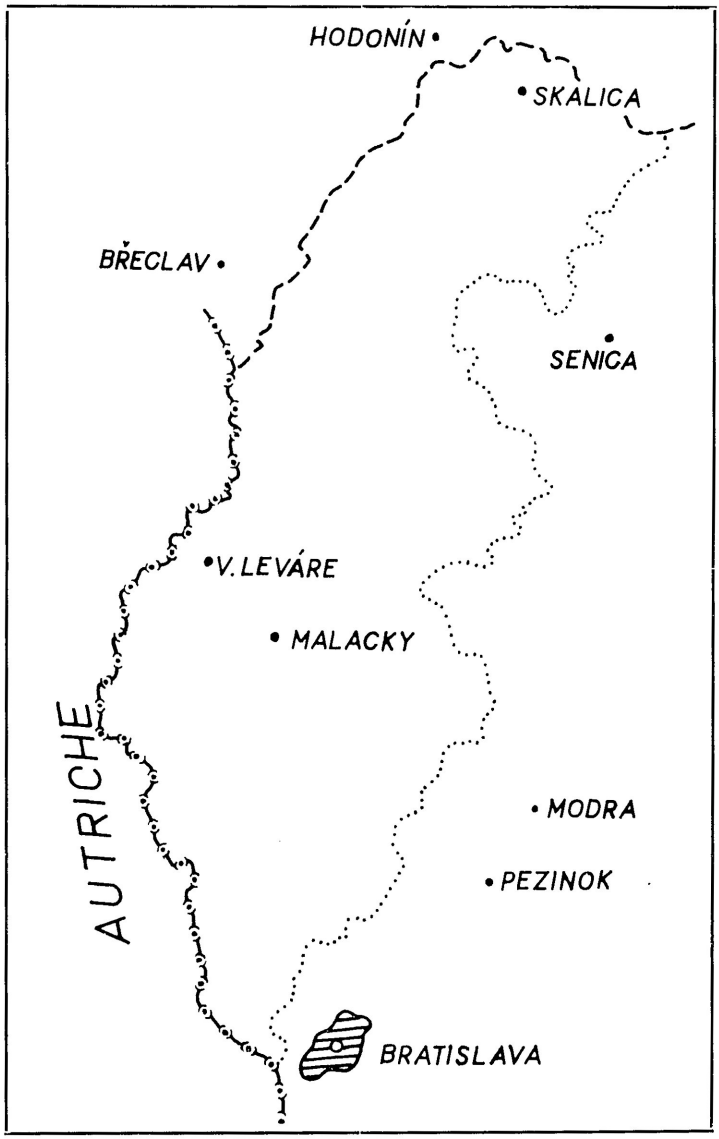


Fig. 1. - Région viticole de SKALICA - ZAHORIE.

Leroux, Saint-Laurent et Portugais bleu. Dans la sous-région transcarpathienne les variétés précoces et moyennes qui ne souffrent pas de la gelée sont convenables, par exemple pour les cépages blancs Valtelin vert, Sylvain vert, Müller-Thurgau, Bouvier, Chasselas et pour les cépages noirs Saint-Laurent et Portugais bleu. Dans la sous-région de Záhorie sont presque exclusivement répandus les producteurs directs cultivés en plaines

sur sol sableux. Il est prévu de replanter cette région en variétés résistantes aux conditions sévères de température.

B. — REGION DE BOHEME.

On y distingue deux sous-régions : la sous-région de Prague et celle de Usti, avec une température annuelle moyenne de 8° C et pendant la période de végétation de 14 à 15° C, avec une pluviosité annuelle de 500 à 550 mm et pendant la période de végétation d'à peu près 350 mm.

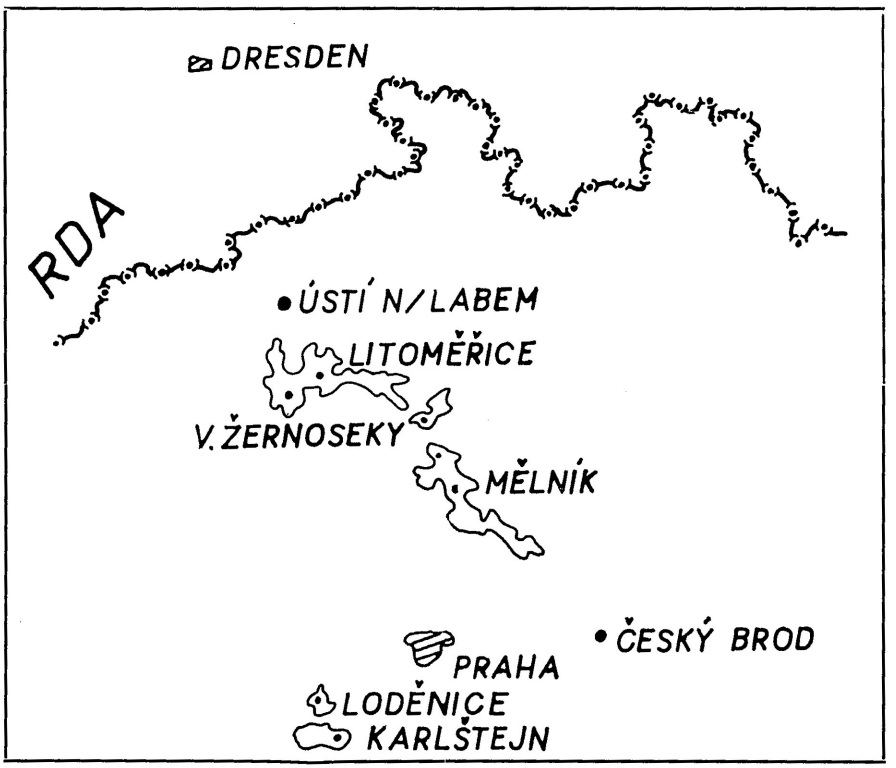


Fig. 2. - Région viticole de BOHEME.

La luminosité moyenne est de 1.600 à 1.800 heures et en période de végétation de 1.200 à 1.300 heures. Dans la sous-région de Prague on trouve des sols limoneux-sableux, argileux et caillouteux, dans celle de Usti des sols argileux et argileux-limoneux. Dans l'encépagement dominent, Müller-Thurgau, Pinot blanc, Petit Riesling, Savagnin rosé parmi les variétés blanches et Saint-Laurent, Portugais bleu et Pinot noir pour les variétés noires.

C. — REGION DE SAALE - UNSTRUT (R.D.A.)*

Sur la superficie totale de 166 hectares de vignobles situés sur les pentes raides et sèches défavorables pour une autre production, il y a 125 hectares de vignobles fertiles. En 1970, la superficie a dû être agrandie de 40 hectares. La pluviosité annuelle moyenne y est de 500 à 600 mm. Sa quantité monte vers juin, puis elle s'abaisse jusqu'au mois d'octobre.

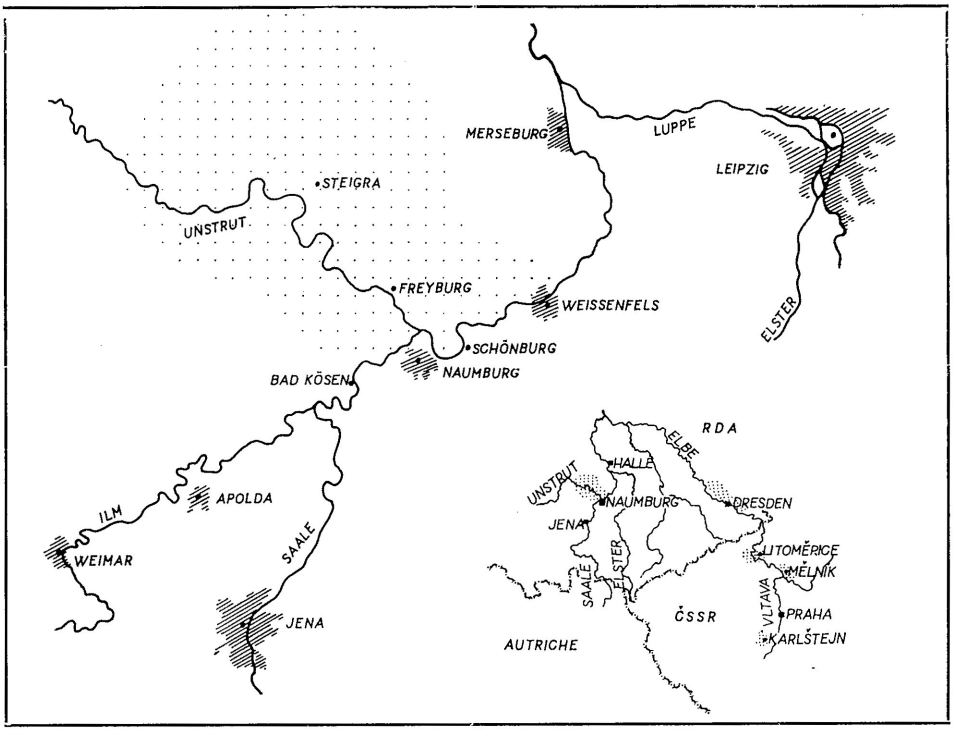


Fig. 3. - Région viticole de SAALE - UNSTRUT.

La luminosité annuelle moyenne est de 1600 heures ; la température annuelle moyenne est de 9° C. Le sol est un calcaire à fossiles et un grès varié ou le mélange de ces deux roches. Le rendement moyen de la production est à peu près de 50 quintaux de raisins à l'hectare ou de 30 hl de vin à l'hectare. Dans l'encépagement on note : Sylvain vert (40 p. 100), Müller-Thurgau (25 p. 100), Portugais bleu (10 p. 100), Pinot blanc (5 p. 100), Petit Riesling (3 p. 100) et Savagnin rosé (1 p. 100). Dans les plantations nouvelles on compte sur la participation plus grande des cépages Sylvain vert et Müller-Thurgau.

* Ces données ont été fournies par M. l'Inspecteur H. AUMULLER et M. l'Ingénieur R. PIETZ de Freyburg, nous les remercions de leur bienveillance.

IV. - RESULTATS ET DISCUSSION

A. — REGION DE SKALICA-ZAHORIE.

Les levures et les microorganismes levuriformes isolés de raisins et de moûts ont été classés en 6 genres : 4 sporogènes (**Saccharomyces, Torulopsis, Pichia** et **Hansenula)** et 2 non sporogènes (**Kloeckera** et **Candida**). De même que dans les autres régions viticoles productrices du pays, l'association des espèces **Kloeckera apiculata - Candida pulcherrima - Saccharomyces cerevisiae** - var. **ellipsoideus - Saccharomyces oviformis** - prédomine. Les deux premières espèces sont prépondérantes dans les premiers jours de la fermentation, les deux autres espèces dans la phase de la fermentation tumultueuse et à la fin de la fermentation.

TABLEAU I

Répartition des espèces de levures isolées (Skalica - Zahorie).

Espèce	Nombre de souches	Fréquence p. 1000 souches	Trouvées par rapport au nombre de moûts	Fréquence p. 100 moûts
Levures sporogènes	181	760,5	17	100
S. cerevisiae v. **ell.**	142	596,6	17	100
S. oviformis	12	50,4	6	35,3
S. willianus	1	4,2	1	5,9
S. uvarum	3	12,6	1	5,9
S. carlsbergensis	3	12,6	2	11,8
S. veronae	1	4,2	1	5,9
T. rosei	2	8,4	1	5,9
P. membranaefaciens	2	8,4	1	5,9
H. anomala	15	63,0	5	29,4
Levures asporogènes	57	239,5	14	82,3
Kl. apiculata	44	184,8	11	64,7
C. pulcherrima	7	29,4	3	17,6
C. mycoderma	6	25,2	2	11,8

Le trait caractéristique de la microflore au cours de la fermentation des moûts est la participation relativement considérable des levures formant un voile des espèces **Hansenula, Candida** et **Pichia. H. anomala** se présente surtout dans les premiers jours de la fermentation, **C. mycoderma** et **P. membranaefaciens** vers la fin de la fermentation (tableaux I et II).

TABLEAU II

Répartition des levures à différentes phases de la fermentation Succession des espèces au cours de la fermentation (Skalica - Zahorie).

Espèce	Souches isolées en moûts en p. 100		
	Avant la fermentation	Demi-fermentation	Avant la fin de la fermentation
Levures sporogènes	46,1	97,5	90,9
S. cerevisiae v. **ell.**	28,5	77,7	80,3
S. oviformis	1,1	7,4	7,6
S. willianus	—	1,2	—
S. uvarum	3,3	—	—
S. carlsbergensis	1,1	2,5	—
S. veronae	1,1	—	—
T. rosei	2,2	—	—
P. membranaefaciens	—	—	3,0
H. anomala	8,8	8,7	—
Levures asporogènes	53,8	2,4	9,1
Kl. apiculata	47,2	1,2	—
C. pulcherrima	6,6	1,2	—
C. mycoderma	—	—	9,1

Le genre Hansenula représenté par **H. anomala** est marqué par une grande production d'esters volatils et une faible capacité fermentaire. **C. mycoderma** et **P. membranaefaciens** possèdent un métabolisme strictement aérobie et une production minimale d'esters, mais ils ont une résistance relativement bonne aux produits du métabolisme de la fermentation.

La microflore accompagnante des moûts en fermentation présente le spectre habituel des espèces, qui est plus large au commencement de la fermentation, surtout au cours de la fermentation tumultueuse. A la fin de la fermentation prédominent les espèces résistantes du genre **Saccharomyces** (**Sacch. cerevisiae** var. **ellipsoideus, Sacch. oviformis**).

B. — REGION DE BOHEME.

Les levures ont été classées en 3 genres sporogènes : **Saccharomyces, Hansenula** et **Pichia.** Les genres non sporogènes comprennent **Candida** et **Kloeckera.** Dans cette région périphérique, nous avons aussi trouvé une représentation assez grande des levures formant un voile **H. anomala** et **P. membranaefaciens,** à côté de l'association habituelle **Kloeckera apiculata - Candida pulcherrima - Saccharomyces cerevisiae** var. **ellipsoideus** (tableaux III et IV).

TABLEAU III

Répartition des espèces de levures isolées (Bohême).

Espèce	Nombre de souches	Fréquence p. 1000 souches	Trouvées par rapport au nombre de moûts	Fréquence p. 100 moûts
Levures sporogènes	88	758,5	9	100
S. cerevisiae v. ell.	60	517,2	6	66,6
S. uvarum	1	8,6	1	11,1
H. anomala	20	172,4	4	44,4
P. membranaefaciens	7	60,3	1	11,1
Levures asporogènes	28	241,3	8	88,8
Kl. apiculata	20	172,4	6	66,6
C. pulcherrima	8	68,9	5	55,5

TABLEAU IV

Répartition des levures à différentes phases de la fermentation. Succession des espèces au cours de la fermentation (Bohême).

Espèce	Souches isolées en moûts pour cent		
	Avant la fermentation	Demi-fermentation	Avant la fin de la fermentation
Levures sporogènes	24,3	100,0	100,0
S. cerevisiae v. ell.	21,6	67,7	60,4
S. uvarum	—	2,9	—
H. anomala	2,7	20,6	25,0
P. membranaefaciens	—	8,8	14,6
Levures asporogènes	75,6	—	—
Kl. apiculata	54,0	—	—
C. pulcherrima	21,6	—	—

17 p. 100 des levures constituant la microflore des moûts en fermentation proviennent de l'espèce **H. anomala,** en opposition avec la présence minimale de ce genre dans les représentants typiques des régions périphériques. Ce trait a été confirmé dans la région étudiée de Saale - Unstrut (R.D.A.).

C. — REGION DE SAALE - UNSTRUT.

Dans la région viticole de Bohême voisine de la région de Saale -Unstrut, nous avons trouvé deux genres sporogènes **(Saccharomyces** et **Hansenula)** et deux genres non sporogènes **(Kloeckera** et **Candida).** Une attention particulière est méritée par la participation considérable de **C. pulcherrima** dans la microflore des fermentations spontanées (à peu près de 20 p. 100) et, au contraire, par la participation plus faible de **Kl. apiculata** (2,2 p. 100).

Les espèces fermentant complètement le raffinose **(Sacch. uvarum** et **Sacch. carlsbergensis)** sont présentes dans quelque 50 p. 100 des échantillons. Une représentation aussi grande des levures de bière basses a été enregistrée seulement dans la région viticole de Tokay. Dans la région de Saale - Unstrut, la représentation assez forte de **H. anomala** (6,7 p. 100) est typique. Les espèces habituelles **C. mycoderma** et **P. membranaefaciens** sont ici presque complètement absentes (tableau V).

TABLEAU V

Répartition des espèces de levures isolées (Saale - Unstrut)

Espèce	Nombre de souches	Fréquence p. 1000 souches	Trouvées par rapport au nombre de moûts	Fréquence p. 100 moûts
Levures sporogènes	34	755,9	8	100
S. cerevisiae v. **ell.**	15	333,3	6	75
S. oviformis	2	44,4	2	25
S. bayanus	1	22,2	1	12,5
S. uvarum	7	155,4	2	25
S. carlsbergensis	4	88,8	4	50
S. chevalieri	1	22,2	1	12,5
S. steineri	1	22,2	1	12,5
H. anomala	3	66,6	3	37,5
Levures asporogènes	11	244,2	3	37,5
Kl. apiculata	1	22,2	1	12,5
C. pulcherrima	9	199,8	3	37,5
C. melinii	1	22,2	1	12,5

Les particularités de la composition de la flore levurienne des moûts en fermentation dans ces régions viticoles périphériques comparées avec celles des régions viticoles de Tchécoslovaquie, reposent sur le fait qu'à

côté de l'association habituelle **Kloechera apiculata - Candida pulcherrima - Saccharomyces cerevisiae** var. **ellipsoideus,** ce sont les **H. anomala** facultativement aérobies qui prennent une part active à la fermentation spontanée. C'est dans la région de Bohême que dominent ces levures estérogènes dans les moûts en fermentation tumultueuse (17 p. 100).

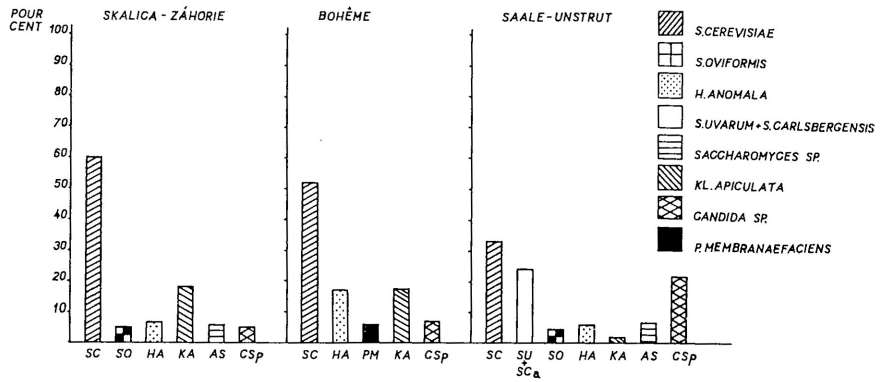


Fig. 4. - Comparaison de la flore levurienne des moûts en fermentation de trois régions viticoles.

L'autre particularité de la flore levurienne est la présence de **Sacch. uvarum** et de **Sacch. carlsbergensis** dans la première phase de la fermentation du moût, surtout dans la région de Saale - Unstrut et celle de Skalica - Záhorie.

La présence de **P. membranaefaciens** dans les moûts en fermentation est relativement rare. En Tchécoslovaquie, ces levures ont été jusqu'ici trouvées dans les vins seulement en association avec le genre Candida (**C. mycoderma** et **C. zeylanoides**). D'après RANKINE (1966) les **Pichia membranaefaciens** sont responsables de la « fleur » du vin et de l'arrière-goût désagréable des vins que cet auteur attribue aux matières provenant du métabolisme des levures, par exemple à l'acétaldéhyde, à l'acétate d'éthyle, à l'acétate d'isoamyle, etc.

Dans la région de Skalica - Záhorie, on trouve ensemble à la fin de la fermentation des moûts, **Pichia membranaefaciens** et **Candida mycoderma.** Nous pouvons signaler ces deux espèces comme agents potentiels de la « fleur » du vin des cépages producteurs directs de cette région.

Les résultats de l'étude écologique dans les régions périphériques, surtout dans celle de Skalica - Záhorie, où on cultive encore les cépages producteurs directs, ont confirmé nos connaissances antérieures, selon

lesquelles le cépage n'influence pas de manière significative la composition de la flore levurienne des moûts en fermentation. Cela est en contradiction avec les données de BENDA (1962). On peut confirmer cette observation en comparant la composition de la microflore des moûts en fermentation dans la région viticole de Skalica - Záhorie avec celle de la Bohême. La répartition des espèces sporogènes et non sporogènes dans les deux régions est à peu près la même ; cela est valable aussi pour les espèces dominantes de **Sacch. cerevisiae** var. **ellipsoideus, Kl. apiculata** et **C. pulcherrima.** Quant à l'absence de **Sacch. oviformis** dans les moûts avant la fin de la fermentation dans la région de Bohême, il faut noter que dans les vins jeunes leur présence est normale (MINARIK, 1966).

La composition de la microflore des raisins et des moûts, dans les régions périphériques ayant des conditions climatiques défavorables comparativement à celles des autres régions vinicoles, présente des différences qualitatives qui sont peut-être en relation avec un ensemble des conditions écologiques, surtout avec les conditions climatiques et météorologiques. La participation assez grande et importante des levures ayant un métabolisme strictement ou facultativement aérobie marque le danger élevé de la maladie de la « fleur » dans ces régions. C'est pourquoi un degré alcoolique élevé dans les vins, l'empêchement de l'accès de l'air et une hygiène maximale dans la production et la conservation sont les exigences primordiales de la vinification.

RESUME

L'écologie des espèces de levures naturelles de vin a été étudiée dans deux régions périphériques de la Tchécoslovaquie et dans celle de Saale - Unstrut de la R.D.A. On a prouvé qu'également dans les conditions extrêmes de la culture de la vigne, c'est l'association des espèces **Kloeckera apiculata - Candida pulcherrima - Saccharomyces cerevisiae** var. **ellipsoideus** qui est présente au cours de la fermentation spontanée. Les **Kloeckera** et **Candida** provoquent la première phase de la fermentation du moût, **Saccharomyces cerevisiae** var. **ellipsoideus** la fermentation tumultueuse et avec **Saccharomyces oviformis** la dernière phase de fermentation. A la différence d'autres régions viticoles, les moûts des régions citées sont marqués par une forte proportion d'espèces de levures aérobies. Parmi ces levures formant un voile, ce sont surtout les **Hansenula anomala** qui influencent la fermentation alcoolique ; elles ont une capacité fermentaire plus faible, mais donnent une forte production d'esters volatils. Cette proportion de levures de « fleur » dans les moûts indique

la propension de ces vins à former un voile et souligne la nécessité des mesures préventives pendant le traitement du vin. On constate donc de nouveau l'effet des conditions écologiques des régions viticoles, avant tout des relations climatiques, avec la composition qualitative de la flore levurienne des raisins et des moûts.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BENDA I., 1962. Okologische Untersuchungen über die Hefeflora im fränkischen Weinbaugebiet. **Bayer. landwirtschftl. Jahrbuch 39,** 594-614.

CASTELLI T., 1954. Les agents de la fermentation vinaire. **Archiv für Mikrobiologie, 20,** 323-342.

CASTELLI T., 1957. Climate and agents of wine fermentation. **Amer. J. Enol. Vitic., 8,** 149-156.

CASTELLI T., 1965. The geographical limits of the genus Hanseniaspora. In : **Mikroorganizmy u industrijskoj proizvodni,** 147-154, Beograd.

DOMERCQ S., 1956. **Etude et classification des levures de vins de la Gironde.** Thèse Docteur-Ingénieur. Bordeaux.

KISON A. et HANAK R., 1962. **Rajonizácia vinica v Ceskoslovensku.** SAV ed., Bratislava.

LOODER J. et KREGER VAN RIJ N.J.W., 1952. **The Yeasts, a Taxonomic Study.** North Holland Publ. Co., Amsterdam.

MINARIK E., 1960. Selekcia a klasifikácia ceskoslovenskychkmenov vinnych kvasiniek a ich aplikácia vo vinárstve. In : **Pokroky vo vinohradnîckom a vinárskom vyskume,** 283-320, SAV ed., Bratislava.

MINARIK E., 1961. Klasifikácia kvasinkovej flóry malokarpatskej vinohradníckej oblasti. **Biol. práce, 7,** 1-73, SAV ed., Bratislava.

MINARIK E., 1963. Kvasinky a kvasinkové mikroorganizmy juhomoravskej a tokajskej vinohradníckej oblasti. In : **Pokroky vo vinohradnîckom a vinarskom vyskume,** 233-255, SAV ed., Bratislava.

MINARIK E., 1963 a. Beitrag zur Mikroflora von Ausleseweinen. **Mitt. Rebe und Wein** Klosterneuburg, 13 A, 186-188.

MINARIK E., 1966. Ekológia prírodnych druhov vînnych kvasiniek v Ceskoslovensku. **Biol. práce, 12,** 1-107, SAV ed., Bratislava.

MINARIK E., LAHO L. et NAVARA A., 1959. Dôkaz skvasitelnosti diagnostickych cukrov chromatograficky. **Kvasny prumysl, 5,** 240-242.

MINARIK E., LAHO L. et NAVARA A., 1960. Beitrag zur Bestimmung der Zuckerassimilation von Weinhefen mittels Papierchromatographie **Mitt. Rebe und Wein** Klosterneuburg, **10 A,** 23-27.

PEYNAUD E. et DOMERCQ S., 1953. Etude des levures de la Gironde. **Ann. Technol. Agric., 4,** 265-300.

PEYNAUD E. et DOMERCQ S., 1959. A review of microbiological problems in wine-making in France. **Amer J. Enol. Vit., 10,** 69-77.

RANKINE B.C., 1966. **Pichia membranaefaciens,** a yeast causing film formation and off flavour in the table wines. **Amer J. Enol. Vit., 17,** 82-86.