INFLUENCE DE DIVERS PROCÉDÉS DE THERMOVINIFICATION SUR LA MICROFLORE LEVURIENNE

S. SAPIS-DOMERCQ et E. PEYNAUD

Station Agronomique et Œnologique de Bordeaux
351, cours de la Libération, 33405 Talence (France)

A la récolte de 1972, nous avons étudié l'incidence du chauffage de la vendange rouge sur la modification de la microflore. Quatre installations de thermovinification ont été contrôlées (fig. 1, 2, 3 et 4). L'installation A chauffe le raisin entier à la vapeur d'eau ; la température des pellicules est ainsi portée vers 70 - 80 °C, celle de la pulpe vers 35 - 40 °C ; les raisins sont ensuite refroidis par une forte ventilation. Dans les trois autres installations, le chauffage est appliqué à la vendange foulée et égrappée, qui est portée aux environs de 75 °C. Avec les installations B et C, la vendange plus ou moins refroidie est envoyée dans les cuves de fermentation, parfois en mélange avec de la vendange non chauffée. Avec l'installation D, la vendange chauffée est pressurée à chaud, le moût coloré obtenu est refroidi rapidement et fermente spontanément en cuve. Les schémas indiquent également à quels moments sont effectuées les diverses prises d'échantillons.

Les buts de cette étude étaient multiples. On savait que la vendange chauffée à des températures pourtant supérieures à celles de la destruction des levures, entre facilement en fermentation et que celle-ci peut se déclencher et se poursuivre à des températures qui ne sont pas habituellement supportées par les levures. Ces faits s'expliqueraient, soit par une stérilisation incomplète de la vendange et une sélection de souches de levures thermorésistantes, soit, si la stérilisation est effective, par une contamination levurienne rapide de la vendange chauffée ; l'activation de la fermentation pourrait être due dans ce cas à une formation ou une dissolution d'activateurs. Notre expérimentation, qui comportait la numération des levures vivantes et l'identification des souches isolées, a été conduite pour vérifier ces diverses hypothèses.

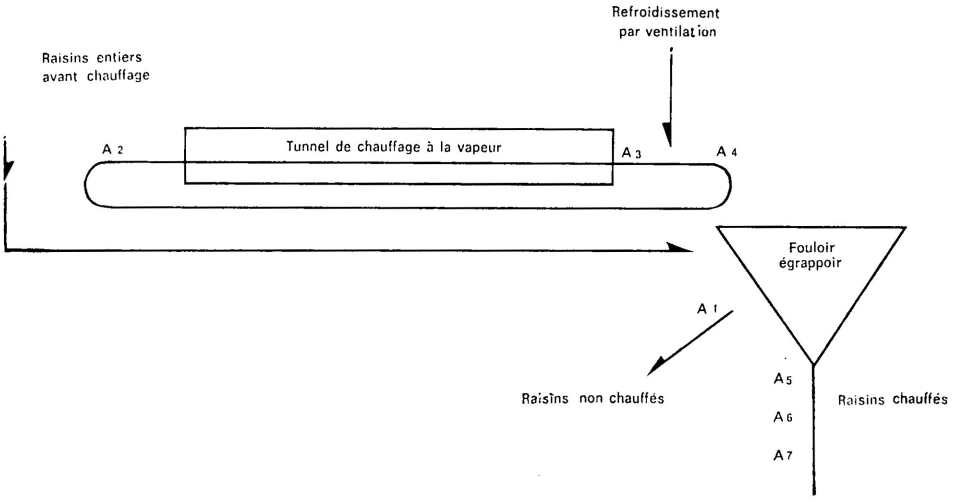


Fig. 1. — Schéma de l'installation A. Les raisins entiers sont chauffés à la vapeur d'eau, puis refroidis par ventilation; les raisins chauffés sont foulés, égrappés et vinifiés en rouge.

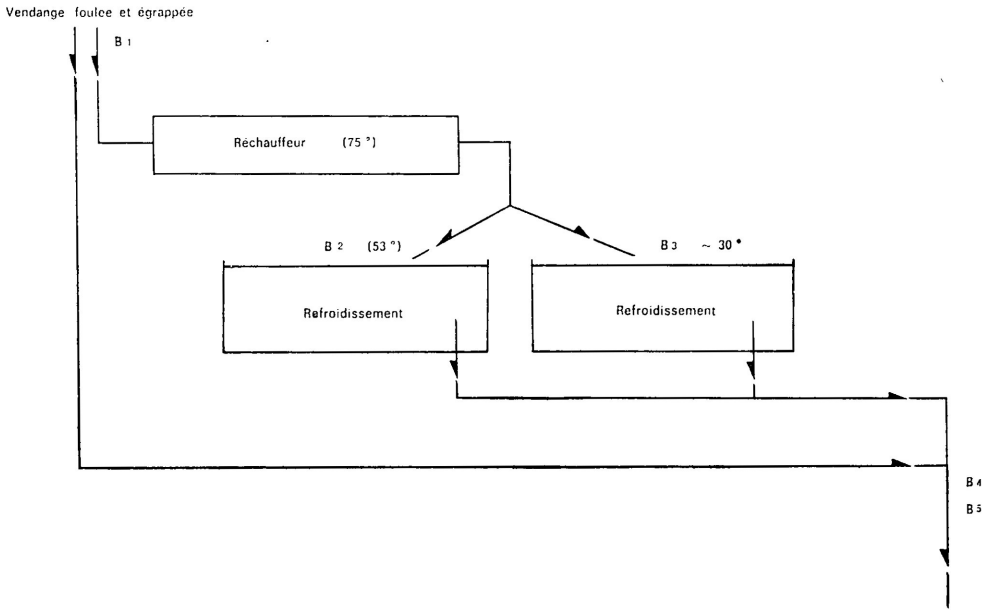


Fig. 2. — Schéma de l'installation B. La vendange foulée est égrappée et chauffée dans un échangeur; elle est refroidie dans deux bacs de stabulation. La fermentation est conduite en présence du marc, avec mélange de vendange non chauffée.

Prélèvement des échantillons. — Les essais étaient basés sur la comparaison des populations levuriennes des raisins entiers ou foulés, prélevés avant et après chauffage. Des échantillons ont donc été prélevés aseptiquement à différents moments des opérations sur les chaînes de traitement thermique. Afin d'être transportés en laboratoire, les raisins entiers étaient placés dans des sacs de toile stériles protégés par du papier filtre également stérile. Les échantillons de vendange foulée étaient recueillis dans des bocaux stérilisés.

Pour les vendanges foulées, les isolements de levures étaient effectués sur milieu solide, après un bon mélange, en prélevant du jus de raisin. Pour les raisins intacts, nous avons utilisé deux méthodes de séparation dont nous voulions comparer les résultats.

La méthode utilisée par BARNETT et **al.** (1972) consiste à prélever dans chaque sac de raisins, avec une pince stérile, 30 baies (40 à 50 g) qui sont placées dans un broyeur rotatif (mixer) en acier inoxydable, stérilisé au préalable en même temps que son couvercle et ses couteaux ; le broyage dure 30 secondes. A partir de 1 ml du jus pulpeux obtenu, on prépare une série de dilutions en tubes contenant 10 ml d'eau stérile. Puis on prélève à l'aide d'une pipette Pasteur calibrée, deux gouttes de 0,25 µl de ces dilutions successives ; chaque goutte est étalée sur la moitié de la surface d'une boîte de Pétri ; le milieu nutritif est du moût de raisin gélosé. Les boîtes retournées sont mises à incuber pendant cinq jours à 25 °C. Les dilutions couramment utilisées sont 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}. Le volume de la goutte étant 0,25 µ l, pour rapporter au ml, il faut multiplier le nombre de colonies obtenues pour une goutte par 4×10^2, 4×10^3, 4×10^4, 4×10^5.

La méthode habituelle de notre laboratoire consiste à presser les raisins entre les mains désinfectées à l'alcool, à travers le sac de toile qui a servi au transport. Le jus est recueilli dans des récipients stériles. On prélève immédiatement 1 ml de ce jus et on opère des dilutions successives en flacons de 100 ml d'eau stérile. Les dilutions choisies vont de 10^{-2} à 10^{-7}, parfois 10^{-8} pour des liquides en pleine fermentation. Pour les jus de vendange chauffée les dilutions sont moins importantes ; on opère directement sur 1 à 5 ml dans le cas des milieux stérilisés.

On a conservé les échantillons de moût ou de vendange une quinzaine de jours au laboratoire, après quoi un deuxième prélèvement de colonies a été effectué ; il représente les espèces de levures fermentaires.

Les boîtes de Pétri obtenues ont servi à la fois à compter des colonies de levures et à les prélever en vue de l'identification des souches.

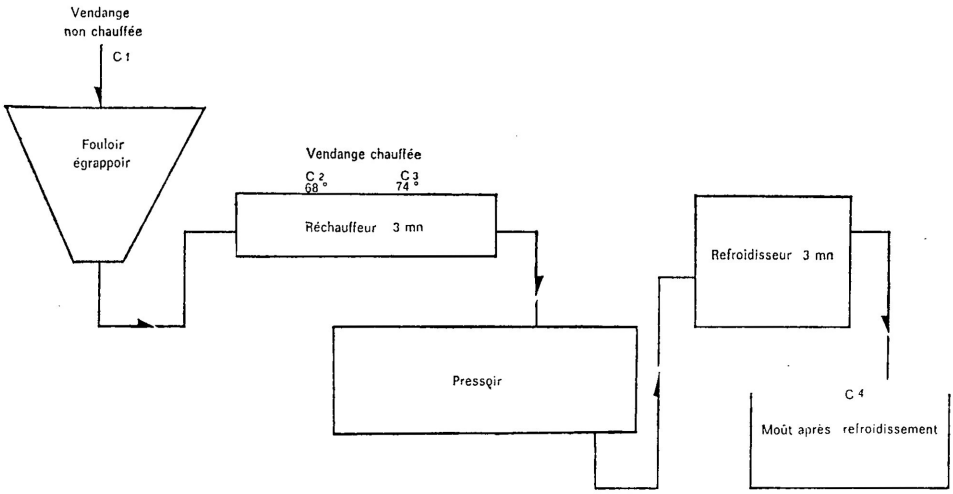


Fig. 3. — Schéma de l'installation C. La vendange foulée et égrappée est portée à 68 °C ou 74 °C en trois minutes; elle est pressée à chaud; le moût coloré fermente après refroidissement

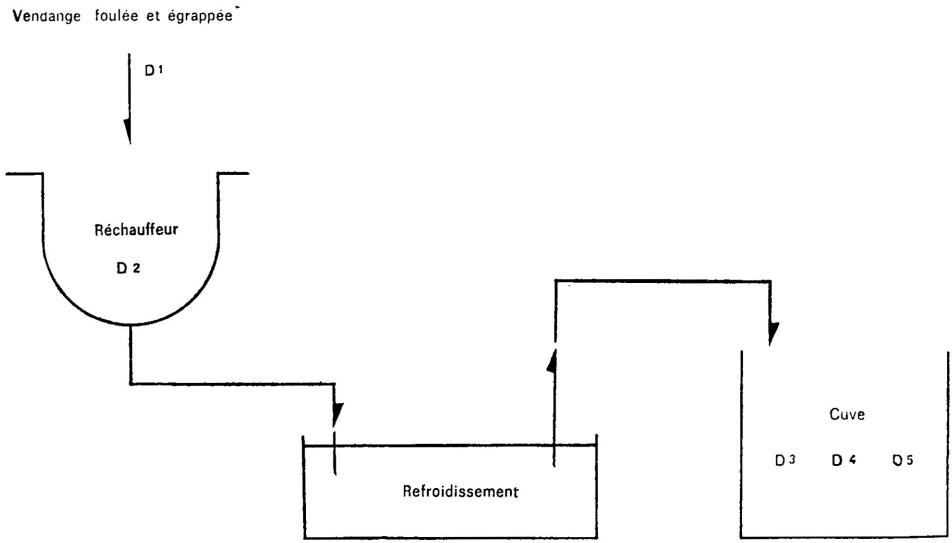


Fig. 4. — Schéma de l'installation D. La vendange foulée et égrappée est chauffée puis refroidie; elle fermente au contact du marc.

NUMERATION DES LEVURES

Comparaison des deux méthodes de traitement des échantillons de raisins. — Dans le tableau I, nous donnons les résultats obtenus avec les deux méthodes précédemment décrites. Ils sont en fait très différents. La méthode utilisant le mixer donne des populations de levures beaucoup plus importantes et donc beaucoup plus exactes que celle qui utilise un écrasement sommaire à la main et une filtration à travers le tissu. On sait maintenant (BELIN et HENRY, 1972) que les levures adhèrent aux pellicules des raisins et on comprend que seul le broyage mécanique et l'homogénéisation au mixer permettent de mettre en suspension la totalité des levures qui se trouvent sur la surface des raisins. C'est donc cette technique que l'on doit désormais adopter lorsqu'on désire une estimation précise des microorganismes se trouvant dans un milieu hétérogène comme la vendange foulée ou encore le marc fermenté.

TABLEAU I

Comparaison de deux méthodes de traitement des raisins et de dispersion des levures

Nombre de levures vivantes par ml de jus de raisin

	Méthode de dispersion au mixer	Méthode d'écrasement à la main
A	80 000	1 400
B	180 000	5 800
C	400 000	1 800
D	12 000 000	1 600 000

Numération des levures au cours des diverses phases du chauffage des raisins ou de la vendange.

Le tableau II résume les résultats obtenus.

On voit que quel que soit le système de chauffage utilisé, à la condition de porter le milieu quelques minutes aux environs de 75 °C, on obtient la stérilisation pratiquement complète des raisins ou de la vendange foulée, même dans le cas où la vendange était déjà le siège d'un développement de levures. On atteindrait encore certainement la stérilité pour des températures moins élevées de chauffage. La fermentation spontanée de quel-

ques échantillons de vendange chauffée observée dans ces essais peut être mise sur le compte d'une contamination ultérieure.

Cette phase stérile dure tant que le raisin est chaud et l'ensemencement par contamination intervient plus ou moins rapidement selon les installations. Il semble bien que toutes les manipulations de la vendange chauffée et stérilisée : déplacement par pompage, brassage pendant la stabulation, pressurage, refroidissement, etc., s'accompagnent d'une introduction massive de levures. L'ensemencement par tout le matériel est extrêmement rapide et contrairement à ce que l'on a cru à un moment, il y a peu d'espoir avec les installations actuelles de baser sur le chauffage de la vendange un système de fermentation pure par levurage sélectionné.

TABLEAU II

Numération des levures au cours des diverses phases de la thermovinification

Nombre de levures vivantes par ml de jus de raisin

	Installation A	Installation B	Installation C	Installation D
Moûts ou raisins avant chauffage	200 000	180 000	400 000	12 000 000
Raisins entiers ou raisins foulés aussitôt après chauffage ...	<10 (fermentation spontanée)	—	1 (fermentation spontanée)	<1 (pas de fermentation spontanée)
Raisins entiers ou raisins foulés aussitôt après refroidissement	30	16 000	180 000	—
Raisins chauffés après foulage	360 000	—	—	—

Dans le cas des raisins chauffés entiers, le foulage et l'égrappage qui suivent entretiennent finalement une population de levures plus importante que celle qui existait avant le chauffage.

Il est démontré que l'apport des levures se fait également par l'air des cuviers : des bacs ouverts contenant de la vendange chauffée et servant au refroidissement spontané présentent rapidement des levures à leur surface, alors que la vendange est encore à 53 °C. Autre exemple de

l'apport de levures par l'air : le séchage et le refroidissement des raisins chauffés à la vapeur d'eau, réalisés par une forte ventilation, déposent des levures sur les raisins ; on en a compté 30 par ml de jus après écrasement.

IDENTIFICATION DES LEVURES ISOLEES

Après les numérations, les boîtes de Pétri ont été utilisées pour le prélèvement des souches dans la mesure où les colonies étaient assez grosses et suffisamment distinctes. Six colonies au minimum étaient prélevées par boîte. Au total, 301 souches ont été isolées et étudiées.

Etudes des souches isolées. — On a appliqué les tests habituels, plusieurs fois décrits (DOMERCQ, 1956 ; RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD, 1970 ; LODDER, 1970).

1°) **Examen microscopique** effectué sur les cellules jeunes de cultures âgées de deux à trois jours, sur moût de raisin, à la température de 25 °C.

2°) **Tests de fermentation** pour les quatre sucres courants : maltose, saccharose, galactose, raffinose en utilisant les tubes de Durham. Les résultats sont notés au bout de dix jours, sauf dans le cas du raffinose qui nécessite un délai plus long et un examen supplémentaire pour vérifier s'il est fermenté totalement ou seulement pour un tiers. Cet examen a été fait par chromatographie sur papier du résidu de la fermentation, au bout d'un mois. Le solvant est un mélange : acétate d'éthyle - acide acétique - eau (6-3-2) ; la chromatographie est descendante et dure 6 heures. Le révélateur est le dichlorhydrate de naphtyl éthylène diamine (1,3 g), glycérol (2,5 ml), eau (5 ml), acétone (42 ml). Au moment de l'emploi on ajoute 5 p. 100 d'acide phosphorique pur. Le raffinose présente le Rf le plus faible (0,06) ; celui du mélibiose est 0,09, du saccharose 0,16 et du galactose 0,22.

3°) **Tests d'assimilation des sucres,** pour ceux qui ne sont pas fermentés ; l'observation est faite au bout d'un mois.

4°) **Tests d'assimilation des nitrates,** dans le cas des levures à voile, afin de différencier les **Pichia** (nitrate négatif) et les **Hansenula** (nitrate positif).

5°) **Formation de spores,** sur différents milieux de culture selon les cas : malt gélosé, moût de bière gélosé, bouillon de carottes gélosée.

6°) Pour un certain nombre de souches difficiles à classer, des essais d'assimilation ont été refaits et complétés par d'autres tests plus spécifiques : assimilation du mélibiose, utilisation de l'éthanol comme seule source de carbone, fermentation de l'amidon soluble, résistance à l'actidione, etc.

Résultats des identifications. — La liste de la totalité des levures identifiées est reproduite dans le tableau III. La première colonne correspond aux levures existant dans les vendanges chauffées ou non chauffées, avant la fermentation ; il s'agit donc des levures de raisins, mais aussi des levures de contamination existant dans les cuviers à l'époque des vendanges. La seconde colonne donne les levures retrouvées à la fin de la fermentation et qui ont donc joué un rôle actif dans celle-ci.

TABLEAU III

Répartition des espèces de levures isolées

	Avant fermentation	Après fermentation	Nombre total	Nombre total (p. 100)
Hanseniaspora uvarum	54	0	54	18
Saccharomyces ellipsoideus ...	104	86	190	63
Saccharomyces oviformis	3	4	7	2,3
Saccharomyces rosei	11	0	11	3,7
Saccharomyces chevalieri	3	5	8	2,7
Saccharomyces italicus	3	0	3	1,0
Saccharomyces heterogenicus .	1	0	1	—
Saccharomyces uvarum	1	3	4	1,3
Saccharomyces aceti	2	0	2	—
Saccharomyces pretoriensis ..	1	1	2	—
Saccharomyces inconspicuus ..	1	0	1	—
Saccharomyces hienipiensis ...	1	0	1	—
Hansenula anomala	1	9	10	3,3
Pichia ohmeri	1	0	1	—
Levures non identifiées	6	0	6	2,0

Les souches identifiées appartiennent à quatre genres : **Hanseniaspora, Hansenula, Pichia, Saccharomyces.**

Six souches voisines des **Torulopsis** ou des **Candida** n'ont pu encore être identifiées.

On voit que la microflore rencontrée dans ces essais est assez banale. La majorité des souches appartiennent au genre **Saccharomyces : Sacch. ellipsoideus** représente 82 p. 100 des **Saccharomyces** isolés ; viennent ensuite **Sacch. rosei** et **Sacch. oviformis.** On a trouvé quelques espèces peu courantes comme **Sacch. aceti, Sacch. pretoriensis, Sacch. inconspicuus, Sacch. hienipiensis.**

La technique de prélèvement (broyage au mixer ou simple écrasement à la main), si elle a une forte influence sur le nombre de levures isolées, n'a pas sensiblement modifé la répartition des espèces.

Le tableau IV donne la répartition des levures suivant les prélèvements ; il permet d'observer les modifications apportées à la microflore par le chauffage.

TABLEAU IV

Action du chauffage sur la répartition des espèces de levures

	Avant chauffage	Vendange chaude	Vendange refroidie	Fermentation	Fin de fermentation	Dernier prélèvement
Hanseniaspora uvarum	35	0	10	9	0	0
Saccharomyces ellipsoideus	10	1	28	34	31	86
Saccharomyces oviformis	1	0	0	1	1	4
Saccharomyces rosei	1	0	8	2	0	0
Saccharomyces chevalieri	0	0	2	0	1	5
Saccharomyces italicus	0	0	3	0	0	0
Saccharomyces heterogenicus ..	0	0	0	0	1	0
Saccharomyces uvarum	1	0	0	0	0	3
Saccharomyces aceti	0	0	0	2	0	0
Saccharomyces pretoriensis	0	0	0	0	1	1
Saccharomyces inconspicuus ...	1	0	0	0	0	0
Saccharomyces hienipiensis ...	0	0	0	0	1	0
Hansenula anomala	1	0	0	0	0	0
Pichia ohmeri	1	0	0	0	0	0
Levures non identifiées	6	0	0	0	0	9

Dans la colonne « avant chauffage » on retrouve un exemple de plus de la microflore naturelle de la vendange foulée. Les **Hanseniaspora** dominent à côté de 14 souches de **Saccharomyces.**

[illegible]

De la vendange chauffée et encore chaude, on a isolé une seule souche, qui est un **Sacch. ellipsoideus.**

Dans la vendange refroidie réapparaissent des levures provenant du matériel ou de l'atmosphère. **Hanseniaspora uvarum** est présent au début de la fermentation ; par la suite la proportion des **Saccharomyces** s'accroît progressivement.

Le chauffage de la vendange ne conduit donc pas à une modification de la microflore, qui expliquerait par exemple certaines modifications des caractères organoleptiques parfois observées dans les vins. Il n'y a pas non plus sélection d'espèces et on retrouve finalement par le jeu d'un levurage de « contamination », naturel et continu, la même répartition des espèces, utiles ou occasionnelles, que la vendange soit chauffée ou non.

Activation des levures des vendanges chauffées. - Rôle des stérols. — A défaut d'une sélection d'espèces de levures différentes, il aurait pu se faire que la technique de chauffage sélectionne parmi les levures habituelles de la fermentation, certaines souches qui se révéleraient résistantes à la chaleur, mais il ne nous a pas été possible de mettre en évidence cette sélection.

En réalité les fermentations rapides à températures élevées semblent dues à la dissolution ou à la dispersion dans la vendange d'activateurs, appartenant à la catégorie des stéroïdes et se trouvant sur ou dans les pellicules. Du moût limpide chauffé ne fermente pas mieux en anaérobiose et à 45 °C que le moût non chauffé ; par contre, le moût chauffé avec des pépins de raisins fermente un peu plus rapidement que le moût témoin ; mais la fermentation du moût chauffé avec les pellicules subit une accélération considérable lorsqu'on conduit la fermentation en anaérobiose et surtout à température élevée.

Ces faits s'expliquent par la connaissance récente du rôle des stérols et des acides gras non saturés de poids moléculaire élevé dans le développement anaérobie des levures (ANDREASON et STIER, 1953 ; MAUGENET et DUPUY, 1964 ; CHAUVET et **al.**, 1966). Il a été montré que d'une part la biosynthèse des stérols des levures (ergostérol, zymostérol, etc.) à partir du squalène, et d'autre part la désaturation des acides gras à longue chaîne, ne peuvent se faire qu'en présence d'oxygène. En anaérobiose lorsqu'on fournit ces stéroïdes aux levures, la fermentation prend toutes les caractéristiques d'une fermentation aérobie : croissance des levures plus rapide, population plus abondante, fermentation du sucre accélérée, formation accrue de produits secondaires.

ISVV

Il en est de même dans la fermentation à température élevée, la synthèse des stérols étant fortement réprimée dans ces conditions (STARR et PARKS, 1962).

D'autre part, BRECHOT et **al.** (1966, 1971) ont montré l'efficacité des extraits de pruine de raisin et en particulier de l'acide oléanolique, qui en est le constituant principal. Malgré sa quasi insolubilité, l'acide oléanolique de la pruine, seul ou associé à l'acide oléique, favorise la croissance anaérobie des levures. Ces faits expliquent les propriétés stimulantes de la pruine lorsque la vendange est placée dans des conditions anaérobies, qui sont généralement celles des divers modes de vinification. Selon nous, ils expliquent, mieux que les arguments jusqu'à maintenant avancés, la rapidité des fermentations et leur évolution surprenante à température élevée dans les procédés de vinification faisant appel au traitement thermique des raisins. Ce dernier, en effet, provoque la solubilisation de la pruine (les raisins chauffés changent superficiellement d'aspect) et sa dispersion dans la masse de la vendange foulée.

CONCLUSIONS

Cette étude sur les modifications possibles de la microflore levurienne par les procédés de thermovinification a abouti à un certain nombre de conclusions qui, à notre avis, éclairent mieux quelques-uns des phénomènes impliqués dans ces nouveaux systèmes de vinification.

1°) La première conclusion se rapporte aux techniques microbiologiques : à cause de leur adhérence à la pellicule, la dispersion des levures de la vendange en vue de leur numération ou de leur identification doit se faire par broyage et homogénéisation mécaniques, à l'aide d'un mixer, selon la technique décrite par BARNETT et **al.** (1972).

2°) On peut admettre que le chauffage des raisins ou de la vendange foulée à 75 °C, et vraisemblablement d'ailleurs à une température inférieure, s'accompagne d'une stérilisation complète.

3°) Au cours des manipulations qu'elle subit (macération, brassage, pressurage, refroidissement) la vendange chauffée est très rapidement ensemencée par les levures des cuviers, qui sont précisément celles qui ensemencent habituellement les vendanges non chauffées, de telle façon qu'il n'y a pas de différence sensible, en nombre ou en espèces, dans la microflore de ces deux systèmes de vinification.

4°) La soudaineté des fermentations des vendanges chauffées, déclenchées parfois à des températures très élevées, s'explique par la dissolution ou la dispersion des constituants de la pruine, stérols et acides gras ; on sait en effet que ces substances, parce que les levures ne peuvent les synthétiser dans ces conditions, sont des facteurs essentiels de leur croissance en anaérobiose ou à température élevée.

Manuscrit reçu le 3 septembre 1973.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANDREASON A.A. et STIER T.J.B., 1953. Anaerobic nutrition of Saccharomyces cerevisiae. I. Ergosterol requirement for growth in a definided medium. **J. Cell. Comp. Physiol., 41,** 23.

BARNETT J.A., DELANEY M.A., JONES E., WAGSON A.B. and WINCH, 1972. The numbers of yeasts associated with wine grapes of Bordeaux. **Archiv. Mikrobiol., 83,** 52.

BELIN J.M. et HENRY P., 1972. Contribution à l'étude écologique des levures dans le vignoble. Répartition des levures à la surface du pédicelle et de la baie de raisin. **C.R. Acad. Sci., 274,** 2318.

BRECHOT P., CHAUVET J., CROSON M. et IRRMANN R., 1966. Extrait de pruine de raisin, facteur de croissance anaérobie de la levure cultivée sur moût de raisin. **C.R. Acad. Sci., 263,** 1004.

BRECHOT P., CHAUVET J., DUPUY P., CROSON M. et RABATU A., 1971. Acide oléanolique, facteur de croissance anaérobie de la levure de vin. **Ann. Technol. agric., 20,** 103. **C.R. Acad. Sci., 272,** 890.

CHAUVET J., BRECHOT P., CROSON M. et IRRMANN R., 1966. Etude de la croissance anaérobie des levures au cours de vinification par macération de raisins entiers. **Ann. Technol. agric., 15.** 99.

DOMERCQ S., 1956. **Etude et classification des levures de vin de la Gironde.** Thèse Doct. Ing., Bordeaux.

LODDER J., 1970. **The Yeasts.** North-Holland Pub.Co, Amsterdam.

MAUGENET J. et DUPUY P., 1964. Synthèse des stérols par la levure. **Ann. Technol. agric., 13.** 229.

RIBÉREAU-GAYON J. et PEYNAUD E., 1960. **Traité d'Œnologie.** Tome I. Béranger, Paris.

STARR P.R. et PARKS L.W., 1962. Effect of temperature on sterol metabolism in yeast. **J. Cell. Comp. Physiol., 59,** 107.