CONTRIBUTION A L'ETUDE DES LEVURES DE COGNAC *

I. ETUDE ET CLASSIFICATION DES LEVURES DE COGNAC

YUN HEE PARK
Institut d'Œnologie - Université de Bordeaux II
351, cours de la Libération, 33405 Talence (France)

INTRODUCTION

L'arôme est un des éléments fondamentaux qui composent la qualité des boissons fermentées.

Dans le cas des eaux-de-vie, certes « le sol, le climat et les cépages utilisés sont considérés comme les facteurs essentiels » dit LAFON dans la préface de son livre « Le Cognac ». Mais l'auteur ajoute aussitôt : « il n'est pas possible de faire du bon cognac avec un vin défectueux » et « le temps ne fait qu'accentuer les qualités ou les défauts de l'eau-de vie. »

Pour important que soit l'art du distillateur, le devenir du cognac est déjà inscrit dans le vin dont il est issu ; les substances volatiles de celui-ci seront concentrées par la distillation et constitueront l'essentiel de l'arôme de l'eau-de-vie.

Le rôle primordial des levures sur la formation de l'arôme avait déjà été pressenti par PASTEUR dès 1876. Des travaux récents, reposant sur l'utilisation des techniques les plus modernes, le confirment. On a pu identifier quelques centaines de substances qui interviennent dans la constitution de l'arôme des boissons fermentées et nous citerons H. SUOMALAINEN : « The aroma components which are most noticeable are produced by the yeast during fermentation, and the nature of the final aroma first and foremost depends upon the kind of yeast used, and upon the fermentation condition. »

(*) Travail effectué avec le concours du Bureau national interprofessionnel du Cognac.

En ce qui concerne le cognac, à notre connaissance, aucune étude approfondie n'avait été menée jusqu'ici sur la nature de la microflore viticole de la région de Charente, ses caractéristiques, ses capacités et son influence éventuelle sur la qualité de l'eau-de-vie produite.

C'est pour combler cette lacune que nous avons entrepris cette étude. Cette recherche a été abordée par une étude écologique de la microflore de Charente : isolement, identification, répartition des levures en fonction des crus et des substrats (raisin, jus de raisin, vin). Elle s'est poursuivie par l'analyse des produits volatils formés au cours de la fermentation alcoolique par les souches levuriennes les plus caractéristiques.

Ce travail ne se prétend pas exhaustif. Mais il nous paraît que, au long de celui-ci, des observations intéressantes ont pu être effectuées qui apportent d'utiles précisions susceptibles d'éclairer d'un jour nouveau certains problèmes d'ordre fondamental et technologique.

TRAVAUX SUR L'ECOLOGIE DES LEVURES

L'étude écologique des levures d'une région viticole forme la base des connaissances indispensables à l'éventuelle utilisation rationnelle de ces microorganismes au contrôle de la qualité des vins.

Depuis 1866, où PASTEUR, dans son étude sur les vins, montrait que les levures sont les agents de la fermentation alcoolique, ces microorganismes ont été l'objet de très nombreux travaux.

Nous ne pouvons les citer tous ; nous nous limiterons à signaler les études les plus importantes concernant l'écologie des levures.

En 1904, dans la région des Charentes, DESCOFFRE étudie la population levurienne sur la vigne au cours des saisons et isole trois types de levures : torula, apiculée, elliptique, ce qui correspond probablement aux genres **Rhodotorula,** ou **Cryptococcus, Hanseniaspora** et **Saccharomyces.**

En 1909, MARTINAND, recherchant les levures sur le raisin pendant les vendanges, constate que les levures elliptiques y sont rares.

En 1913, paraît la thèse de MUSSO sur les levures en Algérie et en 1915 celle de NITESCU sur les levures de Roumanie.

Depuis 1933, en Italie, un ensemble de travaux très importants a été réalisé. Ceux de DE ROSSI (1935), portant sur les levures de la région de l'ombrie sont poursuivis jusqu'en 1954 par CASTELLI et **al.** qui couvrent les régions comprises du Centre au Sud de l'Italie.

Dès 1952, CANTARELLI et CAPRIOTTI s'attachent à l'étude des levures de l'Italie du Nord. MALAN s'intéresse à celles du Piémont et plusieurs autres chercheurs : VERONA (1936-1951), FLORENZANO (1949-1953), CATALANO (1954), GANDINI (1964), à celles de diverses autres régions de ce pays.

En France, RENAUD en 1941 étudie les levures du Val-de-Loire. Mais les recherches systématiques les plus importantes commencent avec PEYNAUD et DOMERCQ (1951), tout d'abord dans le Médoc, puis dans les différentes régions de Gironde : Libournais, Graves, Sauternes, etc. Les résultats sont résumés dans la thèse de S. DOMERCQ (1956).

Aux Etats-Unis, en 1940, MRAK et Mc CLUNG s'attachent à l'étude des levures de Californie. En 1951, R. SCHEFFER et MRAK isolent les levures de vins blancs secs et recherchent les caractères intéressants l'œnologie.

En Grèce, on peut citer KRIMBAS et DAVIDES (1950), puis VERONA et **al.** qui ont étudié le moût du Péloponnèse et de l'île de Crête (1956-1957).

En Yougoslavie, SUCEFIC-SAFAR (1955) a travaillé sur les levures de moût et des vins de dessert de diverses régions.

Au Japon, en 1955, YOKOTSUKA et GOTO constatent que la répartition des levures ressemble à ce qu'elle est en Europe.

En Espagne, en 1958, CASTELLI et INIGO LEAL étudient les levures des régions de la Mancha et de la Rioja. Ces travaux ont été poursuivis par INIGO LEAL et ses collaborateurs dans les diverses régions espagnoles en 1963, 1964 et 1969.

En Tchécoslovaquie, en 1960, MINARIK travaille dans la région de Slovaquie.

Depuis 1960 on relève de nombreux travaux dans le monde entier : en Afrique du Sud, ceux de VAN ZYL et DUPLESSIS (1961) ; en France,

ceux de BRÉCHOT et **al.** (1962), portant sur les levures du Beaujolais ; en Ukraine, ceux de TIURINA (1962) ; en Uruguay, de CANO-MAROTTA et de DE CALAMAR (1962, 1964) ; en Argentine, de RIGONE DE PRITZ (1964) ; en Allemagne du Sud, ceux de BENDA (1962, 1964) ; ceux d'OHARA (1964) au Japon ; en Nouvelle-Zélande, de PARLE et DI MENNA (1966).

Plus récemment, S. SAPIS-DOMERCQ (1970) a étudié l'évolution de la population levurienne au cours de la vinification classique et en vinification continue en Gironde, en Lot-et-Garonne et dans l'Aude.

En 1970, ROSET a étudié les levures de la région nord du Roussillon, particulièrement les souches qu'il appelle « sauvages », c'est-à-dire autres que **Saccharomyces,** tandis que depuis 1973 A. GUITTARD effectue à l'Institut d'Œnologie de Bordeaux, un travail portant sur les levures des vins doux naturels du sud du Roussillon.

En 1971, dans la région des Charentes, CASTELLI a isolé 299 souches parmi lesquelles **Sacch. ellipsoideus** est prédominante.

Citons enfin les ouvrages fondamentaux de LODDER et **al.** concernant l'identification et la classification des levures : « The Yeasts », édition 1952 et édition 1970. La comparaison de ces deux ouvrages très importants met en évidence les nouvelles orientations de la taxonomie moderne : la classification est maintenant essentiellement basée sur des critères biochimiques et les caractères morphologiques sont tenus pour secondaires.

MATERIEL, METHODES D'ISOLEMENT ET DE CLASSIFICATION

Les prélèvements ont été effectués pendant les vendanges 1971 et 1972. Au cours de la première campagne, ils ont porté sur trois régions la Grande-Champagne, la Petite-Champagne, les Borderies. En 1972, outre les prélèvements effectués dans les mêmes régions, nous en avons effectué d'autres dans la région des Fins Bois (voir figure 1).

Pour obtenir un échantillonnage plus varié et plus complet, nous avons prélevé dans chaque cas des raisins, des jus de raisins, des jus de raisins en fermentation et des vins un mois après la fermentation.

I. — TECHNIQUE DES PRELEVEMENTS.

Nous avons adopté la technique de prélèvement employée par S. DOMERCQ (1956). Au mois d'octobre, quelques jours avant le début

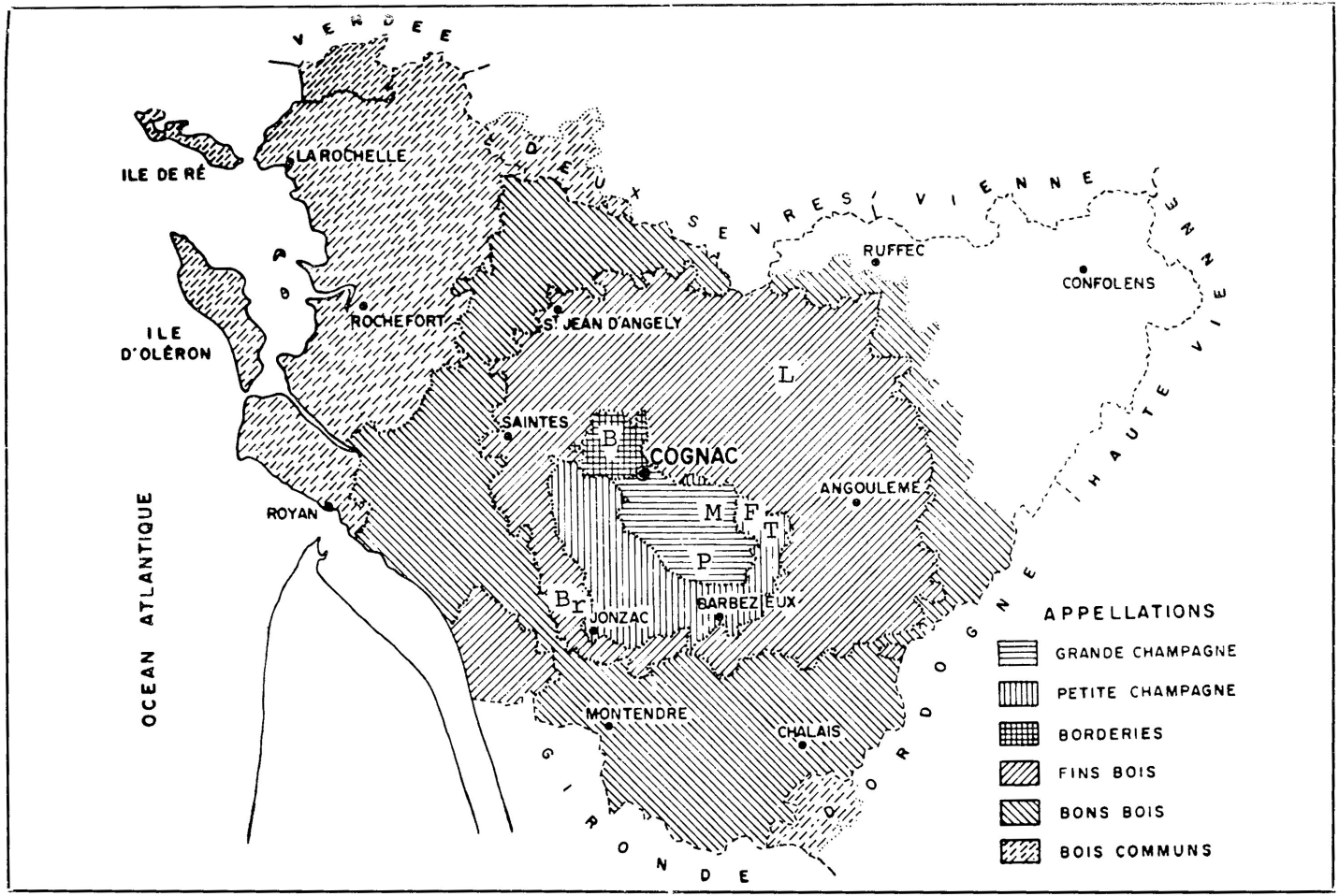


Fig. 1. — Le Vignoble des Charentes

de la vendange, dans chaque propriété choisie, on cueille, à l'aide de ciseaux stériles, 1 kg de grappes de raisin environ que l'on place dans des poches de toile stérile enveloppées de papier filtre. Quant au jus de raisin, il est recueilli dans des bouteilles de 750 ml stériles, successivement à la sortie du pressoir, au début de la fermentation, en pleine fermentation, en fin de fermentation, soit tous les huit jours environ ; début décembre, nous avons prélevé le vin gardé dans les cuves.

II. — TECHNIQUE DES ISOLEMENTS.

En 1971, nous avons employé une technique d'isolement non quantitative. Au laboratoire, les raisins sont pressés entre les mains dans la poche de toile. Le jus est recueilli dans un mortier lavé à l'alcool et flambé. Avec le jus de raisin ainsi obtenu, nous ensemençons un tube contenant 10 ml de moût de raisin stérile à l'aide d'une anse de platine. De la même façon, à partir de ce premier tube, nous effectuons deux dilutions successives. Le contenu de chaque tube est versé dans une boîte de Pétri stérile et mélangé avec 10 ml de gélose à 3 p. 100 préalablement liquéfiée. Les boîtes de Pétri sont mises à 25 °C. Au troisième jour de culture, nous choisissons six colonies dans une série de dilution. Elles sont prélevées à l'aide d'un fil de platine et introduites chacune dans un tube de moût stérile.

D'autre part, le jus de raisin recueilli dans un mortier est mis à fermenter à 25 °C dans une bouteille de 750 ml et nous lui appliquons la même technique d'isolement des levures, tous les trois jours. Les souches isolées sont conservées dans un réfrigérateur à 4 °C après quelques jours d'incubation à 25 °C.

Nous avons employé la même technique dans le jus de raisin et le vin. Mais, en ce qui concerne ce dernier, une culture de rajeunissement est préalablement nécessaire.

En 1972, nous avons modifié la méthode d'isolement pour obtenir des résultats se prêtant mieux à une interprétation quantitative. La méthode est basée sur les travaux de BUHAGIAR et BARNETT (1971). Les raisins sont broyés dans un mixer stérilisé. A l'aide d'une pipette stérile, on prélève ce jus et on procède à plusieurs dilutions successives. Dans chaque tube de dilution différente, nous prélevons 0,1 ml de liquide qui est étalé progressivement à la surface d'une boîte de Pétri contenant 10 ml de milieu YM agar dont voici la composition : 3 g d'ex-

trait de levure, 3 g d'extrait de malt, 5 g de peptone et 10 g du glucose pour 1 litre. On y ajoute 2 p. 100 de gélose. Au bout de trois jours de culture à 25 °C, nous comptons les colonies. Nous choisissons pour cela une boîte de Pétri dans laquelle se trouve la répartition la plus convenable et nous les isolons toutes. Pour l'isolement des levures dans le moût et le vin nous avons employé la même technique.

BUHAGIAR et BERNETT (1971) ont observé que la culture en boîte de Pétri à 25 °C empêche le développement de certaines levures, en particulier, le genre **Cryptococcus.** Nous avons cependant conservé 25° C comme température de culture, puisqu'elle est la température optimale de croissance des levures de vinification dont l'étude est le but de nos travaux.

III. — IDENTIFICATION DE LEVURES ISOLEES.

La méthode d'identification et de classification des souches est celle décrite par LODDER dans la nouvelle édition de son livre « **The Yeasts** » (1970).

Lorsqu'on étudie un grand nombre de souches, il est pratiquement impossible d'effectuer tous les tests indiqués par les auteurs. Puisque tous les critères n'ont pas la même importance taxonomique, nous avons choisi de tester quatre caractères principaux : 1. L'observation des cellules végétatives ; 2. La formation des spores ; 3. La fermentation des sucres ; 4. L'utilisation oxydative des substances carbonées et l'assimilation des substances azotées. D'autres caractères morphologiques ont été observés dans le courant de l'étude, mais ils sont de peu d'intérêt du point de vue taxonomique, car ils varient souvent selon les conditions de culture. Pour différencier les espèces du genre **Saccharomyces,** nous avons fait le test de résistance à l'actidione.

A. — ETUDE DES CARACTERES MORPHOLOGIQUES.

a) Observation des cellules végétatives.

Au bout de trois jours de culture à 25 °C dans le milieu liquide, nous faisons l'examen microscopique, qui permet d'observer la forme, la dimension des cellules et le mode de bourgeonnement. On distingue facilement les levures apiculées et d'autres levures rondes, elliptiques ou cylindriques.

On note de même le mode de groupement de cellules dans le milieu liquide : seules, en paires, en chaînes ou en amas.

b) **Caractères culturaux.**

Dans chaque cas, on observe en milieu liquide la formation de voile, d'anneau, de mousse, la facilité de sédimentation ; en milieu solide, apparence lisse ou rugeuse des cultures, couleur des colonies, etc.

Comme milieu liquide, nous utilisons le jus de raisin pasteurisé. Après filtration, le jus est réparti dans des tubes stériles à raison de 10 ml par tube, lesquels sont ensuite stérilisés à l'autoclave en les portant jusqu'à la température de 120 °C. Nous avons aussi utilisé ce milieu comme milieu de conservation des souches.

Comme milieu solide, nous utilisons le malt gélosé dont la préparation sera indiquée dans le paragraphe suivant.

B. — FORMATION DES ASCOSPORES.

C'est un des caractères taxonomiques essentiels qui permet de distinguer deux groupes de levures : les levures sporogènes et les levures non sporogènes. Les levures sporogènes que l'on trouve sur les raisins, dans le moût et dans le vin appartiennent aux Ascomycètes, à la famille des **Saccharomycetaceae** sauf une seule espèce **Metschnikovia pulcherrima.** Les levures non sporogènes sont classées dans les **« Fungi imperfecti »,** famille des **Cryptococcaceae.**

On ensemence avec ces souches des milieux de sporulation qu'on porte à incubation à 25 °C. On observe au microscope après une semaine, deux semaines et un mois.

L'étude du caractère sporulatif est parfois difficile car les facteurs qui contrôlent la formation des ascospores sont mal connus (KREGER VAN RIJ, 1970) et certaines souches sporogènes peuvent perdre leur capacité de former des spores.

Les milieux utilisés sont les suivants :

Malt gélosé. C'est le moût de bière naturel pasteurisé, dilué à 15° Balling. On ajuste à pH 5,4 et on y ajoute 3 p. 100 de gélose. On dis-

tribue à raison de 6 ml par tube dans les tubes à essais stériles. On chauffe l'autoclave pendant dix minutes à 115 °C. Les tubes sont mis à refroidir dans la position inclinée.

Milieu de Gorodkowa modifié. Le milieu contient 0,1 p. 100 de glucose, 1 p. 100 de peptone, 0,5 p. 100 de chlorure de sodium et 2 p. 100 de gélose. Les tubes sont préparés de la même façon que le malt gélosé.

Extrait de malt gélosé. L'extrait de malt gélosé est utilisé uniquement pour le genre **Hanseniaspora** qui sporule facilement sur ce milieu. On dissout 5 p. 100 d'extrait de malt et on y ajoute 3 p. 100 de gélose. Les tubes sont préparés comme il a été indiqué plus haut.

C. — ETUDE DES CARACTERES PHYSIOLOGIQUES.

a) Test de fermentation des sucres.

Le test de fermentation des sucres est considéré comme un des caractères taxonomiques fondamentaux, car le pouvoir fermentaire des sucres dépend des systèmes transporteurs intervenant dans l'absorption des sucres et des systèmes enzymatiques intervenant dans l'hydrolyse et la dégradation glycolytique en anaérobiose (LODDER, 1970). Le test constitue un critère important de différenciation des espèces, mais aussi des genres, dans certains cas. Par exemple, le genre **Saccharomyces** est caractérisé par une vigoureuse fermentation du glucose, tandis que plusieurs autres genres sont incapables de fermenter les sucres quels qu'ils soient : **Rhodotorula, Cryptococcus,** etc.

Pour ce test, nous utilisons des tubes de Durham contenant 2 p. 100 de sucre. A l'aide d'une pipette Pasteur, nous ensemençons chaque souche avec un levain de trois jours de culture à 25 °C. La réponse est observée au bout de trois jours, une semaine et deux semaines.

Pour les tests de routine, nous utilisons les sucres suivants : glucose, galactose, saccharose, maltose et raffinose et, éventuellement, cellobiose, tréhalose, mélibiose, lactose, inuline et amidon soluble.

Comme milieu de base, nous utilisons une solution d'extrait de levure. On y ajoute 2 p. 100 de sucre très pur, exception faite pour le raffinose utilisé à 4 p. 100. On introduit une clochette de 25 × 8 mm dans chaque tube de 160 × 13 mm. On stérilise à 180 °C pendant une

heure à l'étuve. On ajoute environ 6 ml de solution dans chaque tube et on stérilise à nouveau à l'autoclave à 120 °C.

Cas du raffinose.

Le raffinose est un trisaccharide qui peut être fermenté au tiers, aux deux tiers ou complètement. Ce caractère est utile surtout pour la détermination des espèces de **Saccharomyces.** Quand le raffinose est fermenté au tiers, ou bien le mélibiose reste comme sucre résiduel (c'est le cas de **Saccharomyces cerevisiae**), ou bien la partie de galactose est fermentée et c'est le saccharose qui reste dans le milieu **(Sacch. oleaceus, Sacch. oleaginosus).**

Certaines levures peuvent hydrolyser le raffinose complètement mais ne fermentent que deux tiers de la molécule, c'est-à-dire la partie saccharose ; le galactose est alors le sucre résiduel **(Sacch. inusitatus, Sacch. eupagycus).**

D'autres levures fermentent le raffinose complètement ne laissant aucun sucre résiduel **(Sacch. uvarum, Sacch. kluyveri).** Quand le test de la fermentation du raffinose est positif, nous analysons le sucre résiduel par chromatographie sur papier, qui est la méthode la plus précise pour cette détermination.

Détermination des sucres résiduels provenant de la fermentation du raffinose par chromatographie sur papier.

Papier : Arches 302.
Solvant : Acétate d'éthyle, acide acétique, eau (6 : 3 : 2).
Révélateur : On dissout 1,3 g de dichlorhydrate de N- (1-naphtyl) éthylène diamine dans un mélange de 2,5 ml de glycérol, 5 ml d'eau distillée et 42 ml d'acétone.

Avant utilisation, on ajoute de l'acide phosphorique concentré pour que la solution contienne 5 p. 100 d'acide phosphorique (GUIMBERTEAU, 1969).

A l'aide d'une micropipette, nous déposons sur le papier 5 µl des solutions fermentées de raffinose à intervalles de 3 cm. Comme témoins, 5 µl d'une solution de galactose, mélibiose, saccharose et raffinose à 0,2 p. 100 sont déposées sur le même papier. Le chromatogramme est développé par la méthode descendante pendant cinq à six heures. Nous

retirons ensuite le chromatogramme de la cuve et nous le séchons pendant quelques minutes. Nous pulvérisons sur le chromatogramme la solution du révélateur et laissons sécher à l'air pendant dix à quinze minutes, puis pendant quatre minutes à 110 °C.

	Rf	Couleur
	—	—
Galactose	0,22	Brun violacé
Saccharose	0,16	Violet
Mélibiose	0,09	Brun violacé
Raffinose	0,06	Violet

b) **Test de l'utilisation oxydative des substances carbonées.**

Ce critère est devenu le plus important dans la taxonomie moderne ; d'une part, il est le test le plus précis et le plus sensible pour mettre en évidence des systèmes enzymatiques spécifiques et, d'autre part, le nombre de substances carbonées susceptibles d'être métabolisées par cette voie est beaucoup moins limité que dans le cas de la fermentation. La capacité ou incapacité des levures à métaboliser par voie oxydative des substances carbonées dépend de la présence de deux facteurs : la perméabilité de la cellule à la substance et la présence de système enzymatique nécessaire à la dégradation oxydative de ces substances.

LODDER et KREGER VAN RIJ (1970) ont utilisé une trentaine de substances : ce sont des sucres et leurs dérivés, des alcools, des acides et leurs dérivés.

Nous avons utilisé la méthode en milieu liquide. La croissance des levures est mesurée au bout de dix jours de culture à 25 °C par turbidimétrie. Dans le cas où la réponse n'est pas claire, nous poursuivons l'observation pendant un mois, chaque semaine.

Le milieu de base a la composition suivante :

- **Sels minéraux** (g par litre)

Sulfate d'ammonium	5 g	Sulfate de magnésium ..	0,5 g
Phosphate de potassium (monobasique)	0,85 g	Chlorure de sodium	0,1 g
Phosphate de potassium (dibasique)	0,15 g	Chlorure de calcium	0,1 g

- **Acides aminés** (mg par litre) :

L - Histidine	10	DL - Tryptophane	20
DL - Méthionine	20		

- **Vitamines** (µg par litre) :

Biotine	20	Acide p-aminobenzoïque .	200
Pantothénate de calcium .	2.000	Pyridoxine	400
Acide folique	2	Riboflavine	200
Inositol	10.000	Thiamine	400
Nicotinamide	400		

- **Composés à l'état de traces** (µg par litre) :

Acide borique	500	Sulfate de manganèse ..	400
Sulfate de cuivre	40	Molydbate de sodium ..	200
Iodure de potassium	100	Sulfate de zinc	400
Chlorure ferrique	200		

On stérilise à l'autoclave à 115 °C. Pour éviter la destruction des vitamines, nous arrêtons l'autoclave dès que la température atteint 115 °C. Quand elle descend à 110 °C, les tubes sont retirés de l'autoclave et aussitôt refroidis à l'eau froide. Avec chaque souche, nous ensemençons les tubes contenant les différentes substances carbonées et le tube contenant la solution témoin de la même façon que pour le test de fermentation.

c) **Test d'utilisation des substances azotées.**

Les différentes sources d'azote peuvent être employées pour le test d'utilisation des substances azotées : nitrate, nitrite, amino-alkane, créatine, créatinine et acides aminés.

Parmi les levures concernant spécialement l'œnologie, beaucoup de genres sont incapables d'utiliser les nitrates : **Saccharomyces, Pichia, Hanseniaspora, Debaryomyces,** etc. **Hansenula** est le seul genre caractérisé par l'utilisation positive du nitrate. Dans le genre **Candida** et **Torulopsis,** on trouve à la fois des espèces nitrate négatives et des espèces nitrate positives.

Parmi les divers composés des amino-alkane, le chlorhydrate d'éthylamine est particulièrement utile pour différencier les espèces des **Saccharomyces.**

Le milieu de base est celui utilisé dans le test des substances carbonées, mais modifié par une addition de 10 g par litre de glucose et une concentration dix fois moins forte en acides aminés. En outre, le milieu est dépourvu de sulfate d'ammonium.

Selon la substance azotée étudiée, le milieu de base est éventuellement enrichi en nitrate de potassium (0,78 g par litre) ou en chlorhydrate d'éthylamine (0,64 g par litre).

d) **Test de résistance à l'actidione (cycloheximide).**

La résistance à l'actidione varie assez fortement en fonction de l'espèce. Cette différenciation est utilisée pour la détermination de certaines espèces, notamment pour le genre **Saccharomyces.** Nous avons utilisé une solution d'actidione à 100 mg par litre. La réponse est vérifiée tous les huit jours pendant trois semaines par simple observation à l'œil nu.

Nous avons procédé de la même manière que pour la recherche de l'utilisation oxydative du glucose en utilisant le même milieu nutritif additionné de 100 mg d'actidione par litre.

RÉPARTITION DES LEVURES DANS LA RÉGION DES CHARENTES.

Au cours de deux années d'études sur les levures de la région des Charentes, nous avons isolé 650 souches appartenant à 31 espèces réparties entre 8 genres sporogènes relevant des **Ascomycetes** et 3 genres non sporogènes relevant des **Fungi Imperfecti.**

Nous avons donné dans notre thèse (1974) le tableau de la classification des souches isolées ainsi que la description de celles-ci. Dans ce travail nous étudierons plus particulièrement la répartition des souches et des espèces de levures selon le milieu sur lequel elles vivent et selon le cru.

I. — LEVURES ISOLÉES SUR LES RAISINS.

En 1971, nous avons effectué 17 prélèvements de raisins dans trois régions correspondant à trois crus de Cognac. Nous avons isolé 97 souches de levures appartenant à 10 espèces.

TABLEAU I

Répartition des espèces de levures isolées sur les raisins

Cru et lieu de prélèvement	Nombre de souches	Genre et espèces	
		Premier isolement	Deuxième et troisième isolements
Grande Champagne (P)	10	**H'spora uvarum** 5 **R. glutinis** 1	**Sacch. cerevisiae** 3 **D. phaffii** 1
Petite Champagne (F)	42	**H'spora uvarum** 15 **M. pulcherrima** 1	**Sacch. cerevisiae** 10 **T. stellata** 10 **H'spora uvarum** 5 **C. intermedia** 1
Borderies (B)	45	**H'spora uvarum** 17	**H'spora uvarum** 17 **H'spora osmophila** 3 **Sacch. cerevisiae** 4 **P. membranaefaciens** 1 **T. stellata** 1 **T. candida** 2

Les premiers prélèvements ont été effectués aussitôt après le pressurage des raisins en laboratoire. Les deux autres isolements se situaient au cours de la fermentation de ce jus à 25 °C après une semaine et quatre semaines. Ce sont donc les espèces obtenues lors du premier isolement qui reflètent le mieux la population réelle des levures sur le raisin, bien que la méthode ne soit pas quantitative. On constate que deux espèces fermentaires seulement se trouvent sur le raisin : **Hanseniaspora uvarum,** qui est la plus répandue, et **Metschnikowia pulcherrima.**

En 1972, nous avons adopté une technique d'isolement quantitative. Malheureusement, nous n'avons obtenu aucune espèce de levures. Toutes les colonies apparues dans les boîtes de Pétri étaient probablement des **Aerobasidium.**

On peut considérer que cette année-là la population des levures sur les raisins est inférieure à 10^3 par millilitre.

Ce phénomène peut s'expliquer par une température d'été exceptionnellement basse qui aurait empêché le développement normal des insectes, principaux agents de la propagation des microorganismes.

II. — LEVURES ISOLÉES DU JUS DE RAISIN.

En 1971 et 1972, nous avons obtenu 137 souches appartenant à 14 espèces à partir de 13 moûts pris à la sortie du pressoir.

En 1971, deux isolements supplémentaires faits au cours de la fermentation de ces moûts au laboratoire à 25 °C, nous ont permis de retenir 69 souches parmi lesquelles prédominent les **Saccharomyces.** Le fait que la population soit plus importante et la flore levurienne plus variée dans le jus de raisin que sur le raisin s'explique par une contamination due aux manipulations et aussi par un développement favorable d'espèces peu nombreuses sur le raisin.

La population des **Saccharomyces rosei** paraît plus importante en Charente que dans d'autres régions. En effet, on a trouvé cette espèce dans tous les crus, sauf ceux des Borderies et elle constitue jusqu'à 85 p. 100 des souches isolées dans un moût de Petite Champagne, soit 120 000 cellules par millilitre de moût.

Cependant, dans les Borderies, le genre **Hanseniaspora** est le plus important avec 80 p. 100 des souches obtenues environ.

En outre, nous avons isolé plusieurs espèces rares ; **Sacch. kluyveri, Sacch. cidri, Nadsonia elongata, Torulopsis etchellsii, Candida sake.**

III. — LEVURES ISOLÉES DANS LE MOUT DE FERMENTATION.

En 1971 et 1972, nous avons prélevé 20 moûts en cuves au début de la fermentation, en pleine fermentation et à la fin de la fermentation.

Nous avons isolé 303 souches de levures appartenant à 17 espèces appartenant à 5 genres, dont la répartition par crus est indiquée dans le tableau III.

La fermentation est conduite essentiellement par les **Saccharomyces** qui comprennent 285 souches sur 303.

Sacch. cerevisiae est l'espèce la plus courante ; la proportion varie de 30 p. 100 à 98 p. 100 selon le moût et au total 207 souches sur 303 ; ces résultats sont surprenants si on les compare à ceux obtenus sur

TABLEAU II

Répartition par cru des espèces isolées du moût

Cru et lieu de prélèvement	Année	Genre et espèces		Nombre de souches
Grande Champagne (P)	1971	**Sacch. rosei**	4	11
		H'spora uvarum	2	
		T. stellata	3	
		C. sake	2	
Grande Champagne (P)	1972	**Sacch. rosei**	15	30
		Sacch. cerevisiae	3	
		Sacch. uvarum	1	
		H'spora valbyensis	1	
		H. anomala	1	
		N. elongata	1	
		T. etchellsii	3	
		C. sake	2	
Grande Champagne (M)	1972	**Sacch. cerevisiae**	2	11
		Sacch. uvarum	1	
		Sacch. kluyveri	1	
		Sacch. rosei	1	
		Sacch. capensis	1	
		H'spora uvarum	5	
Petite Champagne (F)	1971	**Sacch. cerevisiae**	3	18
		Sacch. uvarum	3	
		Sacch. kluyveri	1	
		Sacch. rosei	1	
		H'spora uvarum	9	
		C. intermedia	1	
Petite Champagne (T)	1972	**Sacch. rosei**	12	14
		Sacch. capensis	1	
		T. lactis condensi	1	
Borderies (B)	1971	**H'spora uvarum**	11	12
		M. pulcherrima	1	
Borderies (B)	1972	**Sacch. cidri**	2	16
		H'spora uvarum	7	
		H'spora osmophila	7	
Fin Bois (Br)	1972	**Sacch. rosei**	12	19
		Sacch. cerevisiae	2	
		H'spora osmophila	4	
		H'spora uvarum	1	
Fin Bois (L)	1972	**Sacch. kluyveri**	3	6
		Sacch. rosei	1	
		C. valida	2	

TABLEAU III

Répartition par cru des espèces isolées du moût en fermentation

Cru et lieu de prélèvement	Année	Genre et espèces		Nombre de souches
Grande Champagne (P)	1971	**Sacch. cerevisiae**	12	17
		S'des, ludwigii	5	
Grande Champagne (P)	1972	**Sacch. cerevisiae**	20	30
		Sacch. uvarum	6	
		Sacch. chevalieri	2	
		C. valida	2	
Grande Champagne (M)	1972	**Sacch. cerevisiae**	13	23
		Sacch. chevalieri	4	
		Sacch. uvarum	3	
		Sacch. pretoriensis	2	
		Sacch. bayanus	1	
Petite Champagne (F)	1971	**Sacch. cerevisiae**	24	37
		Sacch. chevalieri	2	
		Sacch. capensis	1	
		Sacch. protoserdovii	1	
		S'des ludwigii	7	
		C. valida	2	
Petite Champagne (F)	1972	**Sacch. cerevisiae**	22	34
		Sacch. uvarum	6	
		Sacch. globusus	4	
		Sacch. capensis	1	
		Sacch. diastaticus	1	
Petite Champagne (T)	1972	**Sacch. cerevisae**	34	43
		Sacch. rosei	2	
		Sacch. capensis	2	
		Sacch. uvarum	1	
		Sacch. bayanus	1	
		Sacch. pretoriensis	1	
		Sacch. diastaticus	1	
		Sacch. chevalieri	1	

le raisin où la quasi-totalité des levures appartiennent au genre **Hanseniaspora,** ou dans le moût avant fermentation où la proportion de **Sacch. cerivisiae** est environ de 8 p. 100 des souches.

TABLEAU IV

Répartition par cru des espèces isolées du moût en fermentation (suite)

Cru et lieu de prélèvement	Année	Genre et espèces		Nombre de souches
Borderies (B)	1971	**Sacch. cerevisiae**	22	24
		P. membranaefaciens	2	
Borderies (B)	1972	**Sacch. cerevisiae**	15	17
		Sacch. rosei	1	
		Sacch. uvarum	1	
Fin Bois (Br)	1972	**Sacch. cerevisiae**	37	52
		Sacch. uvarum	14	
		P. polymorpha	1	
Fin Bois (L)	1972	**Sacch. cerevisiae**	8	26
		Sacch. kluyveri	5	
		Sacch. uvarum	4	
		Sacch. bayanus	1	
		Sacch. rosei	1	
		Sacch. cidri	1	
		H'spora uvarum	4	
		C. validl	2	

TABLEAU V

Répartition par cru des espèces isolées du vin

Cru et lieu de prélèvement	Année	Genre et espèces		Nombre de souches
Grande Champagne (P)	1972	**Sacch. cerevisiae**	3	3
Petite Champagne (F)	1971	**Sacch. cerevisiae**	11	11
Petite Champagne (F)	1972	**Sacch. cerevisiae**	10	11
		Sacch. bayanus	1	
Petite Champagne (T)	1972	**Sacch. cerevisiae**	4	4
Borderies (B)	1971	**Sacch. cerevisiae**	9	9
Borderies (B)	1972	**C. valida**	3	3
Fin Bois (Br)	1972	**Sacch. cerevisiae**	8	8
Fin Bois (L)	1972	**Sacch. cerevisiae**	1	3
		C. valida	2	

Le tableau III montre encore une fois la prédominance de **Sacch. cerevisiae** sur les autres espèces dans le jus de raisin en fermentation.

La proportion de **Sacch. rosei** est très faible par rapport à celle trouvée dans le moût avant fermentation.

TABLEAU VI

Répartition par cru des espèces isolées en 1971

Cru et lieu de prélèvement	Genre et espèces		Nombre de souches
Grande Champagne (P)	**Sacch. cerevisiae**	37	60
	Sacch. rosei	4	
	H'spora uvarum	7	
	S'des ludwigii	5	
	D. phaffii	1	
	T. stellata	3	
	C. sake	2	
	R. glutinis	1	
Petite Champagne (F)	**Sacch. cerevisiae**	68	131
	Sacch. uvarum	4	
	Sacch. chevalieri	2	
	Sacch. capensis	1	
	Sacch. rosei	1	
	Sacch. prostoserdovii	1	
	Sacch. kluyveri	1	
	S'des ludwigii	7	
	H'spora uvarum	29	
	M. pulcherrima	1	
	T. stellata	10	
	C. intermedia	2	
	C. valida	4	
Borderies (B)	**Sacch. cerevisiae**	41	114
	P. membranaefaciens	3	
	H'spora uvarum	45	
	H'spora osmophila	3	
	M. pulcherrima	1	
	T. stellata	1	
	C. valida	18	
	T. candida	2	

L'espèce **Saccharomycodes ludwigii** est présente en Grande et Petite Champagne dans 4 moûts prélevés en 1971, mais l'année suivante, nous n'avons isolé aucune souche de cette espèce.

IV. — LEVURES ISOLÉES DU VIN.

Nous avons isolé 52 souches de levures à partir de 15 prélèvements de vin.

Sacch. cerevisiae est prédominante ; elle représente 90 p. 100 des souches isolées. Nous avons trouvé **Candida valida** dans deux prélèvements et une seule souche de **Sacch. bayanus.**

TABLEAU VII

Espèces de levures isolées dans la région de Cognac

Levures sporogènes			
Espèces	Nombre de souches	Espèces	Nombre de souches
Sacch. cerevisiae	328	**Pichia membranaefaciens**	3
Sacch. rosei	50	**Pichia kluyveri**	3
Sacch. uvarum	41	**Pichia polymorpha**	1
Sacch. kluyverii	10	**Debaryomyces phaffii**	1
Sacch. chevalieri	9	**Metschnikowia pulcherrima**	2
Sacch. capensis	6	**H'spora uvarum**	101
Sacch. bayanus	4	**H'spora osmophila**	14
Sacch. pretoriensis	3	**H'spora valbyensis**	1
Sacch. cidri	3	**S'des ludwigii**	12
Sacch. diastaticus	2	**Nadsonia elongata**	1
Sacch. globosus	4	**H. anomala**	1
Sacch. prostoserdovii	1		
Levures asporogènes			
Torulopsis stellata	14	**Candida valida**	30
Torulopsis etchellsii	3	**Candida sake**	4
Torulopsis lactis condensi	1	**Candida intermedia**	2
Torulopsis candida	2	**Rhodotorula glutinis**	1

V. — RÉCAPITULATION DES ESPÈCES ISOLÉES DANS LA RÉGION DES CHARENTES.

Deux années de prélèvements ne sont pas suffisantes évidemment pour connaître l'écologie des levures d'une région.

Pour comparer la flore des divers crus de Charente, il faudrait continuer des études systématiques pendant plusieurs années.

Après le tableau V, il y a une très nette différence entre les trois crus dans la répartition des espèces.

TABLEAU VIII

Répartition par cru des espèces isolées en 1972

Cru et lieu de prélèvement	Genre et espèces		Nombre de souches
Grande Champagne (P)	**Sacch. cerevisiae**	26	63
	Sacch. rosei	15	
	Sacch. uvarum	7	
	Sacch. chevalieri	2	
	H'spora uvarum	3	
	H'spora valbyensis	1	
	H. anomala	1	
	N. elongata	1	
	T. etshellsii	3	
	C. sake	2	
	C. valida	2	
Grande Champagne (M)	**Sacch. cerevisiae**	15	34
	Sacch. uvarum	4	
	Sacch. chevalieri	4	
	Sacch. pretoriensis	2	
	Sacch. rosei	1	
	Sacch. capensis	1	
	Sacch. bayanus	1	
	Sacch. kluyveri	1	
	H'spora uvarum	5	
Petite Champagne (F)	**Sacch. cerevisiae**	32	45
	Sacch. uvarum	6	
	Sacch. globosus	4	
	Sacch. bayanus	1	
	Sacch. capensis	1	
	Sacch. diastaticus	1	
Petite Champagne (T)	**Sacch. cerevisiae**	38	61
	Sacch. rosei	14	
	Sacch. capensis	3	
	Sacch. uvarum	1	
	Sacch. bayanus	1	
	Sacch. pretoriensis	1	
	Sacch. chevalieri	1	
	Sacch. diastaticus	7	
	T. lactis condensi	1	

La proportion des levures du genre **Saccharomyces** diminue dans l'ordre suivant des crus : Grande Champagne, Petite Champagne, Borderies. Par contre, la proportion des levures genre **Hanseniaspora** augmente dans le même ordre. Les autres genres restent à peu près constants.

En 1972, la comparaison entre les crus est moins significative, car les trois prélèvements effectués pendant la fermentation (c'est-à-dire au début, au milieu et à la fin) n'ont pu être réalisés dans les mêmes conditions dans toutes les propriétés, les fermentations n'ayant pas débuté aux mêmes dates.

Cependant, dans les Borderies, on observe encore la plus forte proportion de levures du genre **Hanseniaspora** et la plus faible proportion de levures du genre **Saccharomyces.** Dans les Fins Bois, à Lignerie, où aucun prélèvement n'avait été fait en 1971, la proportion des **Saccharomyces** est relativement basse.

TABLEAU IX

Répartition par cru des espèces isolées en 1972 (suite)

Cru et lieu de prélèvement	Genre et espèces		Nombre de souches
Borderies (B)	**Sacch. cerevisiae**	15	36
	Sacch. cidri	2	
	Sacch. rosei	1	
	Sacch. uvarum	1	
	C. valida	3	
	H'spora uvarum	7	
	H'spora osmophila	7	
Fin Bois (Br)	**Sacch. cerevisiae**	47	79
	Sacch. uvarum	14	
	Sacch. rosei	12	
	H'spora osmophila	4	
	H'spora uvarum	1	
	P. polymorpha	1	
Fin Bois (L)	**Sacch. cerevisiae**	9	35
	Sacch. kluyveri	8	
	Sacch. uvarum	4	
	Sacch. rosei	2	
	Sacch. bayanus	1	
	Sacch. cidri	1	
	H'spora uvarum	4	
	C. valida	6	

CONCLUSIONS

Notre étude met en évidence les caractéristiques écologiques propres à la région de Charente en ce qui concerne les levures de vinification.

— La fermentation est conduite principalement par les levures du genre **Saccharomyces** parmi lesquelles prédomine l'espèce **Sacch. cerevisiae.**

— Sur le raisin, les levures du genre **Hanseniaspora** constituent la population levurienne essentielle et notamment dans la région des Borderies.

— Dans les vins jeunes de Charente, contrairement à ce qu'on observe ailleurs, **Sacch. bayanus** n'est pas l'espèce la plus courante.

— Parmi les autres espèces du genre **Saccharomyces** habituellement rencontrées, on trouve **Sacch. uvarum, Sacch. rosei, Sacch. capensis, Sacch. chevalieri** et **Sacch. globosus.**

Sacch. rosei est isolée en nombre important dans le moût de Grande Champagne et de Petite Champagne.

— **S' des ludwigii** est plus fréquente en Charente qu'en Gironde où cette levure est extrêment rare.

— Nous avons enfin identifiée plusieurs espèces qui jusqu'ici n'avaient jamais été isolées du raisin, du moût ou du vin : **Sacch. pretoriensis, Sacch. cidri, Sacch. kluyveri, Sacch. diastaticus, P. kluyveri, P. polymorpha, D. phaffii, N. elongata, T. etchellsii, T. lactis condensi, C. sake.**

— Nous avons également isolé et identifié certaines espèces qui se développent après la fermentation en formant un voile superficiel. Ce sont : **C. valida, H. anomala** et **P. kluyveri.**

Manuscrit reçu le 30 juin 1974.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BENDA I., 1964. Die Hefeflora des frankischen Weinbaugebietes. **Weinberg u. Keller, 11,** 67-80.

BRECHOT P., CHAUVET J. et GIRARD H., 1962. Identification des levures d'un moût de Beaujolais au cours de la fermentation. **Ann. Techn. Agric., 11**, 235-244.

BUHAGIAR et BARNETT J., 1971. **J. Appl. Bact., 4,** 727.

CANO-MAROTTA C.R. et DE KALAMAR D.B., 1962. I lieviti della fermentazione vinaria in Uruguay. **Atti Acc. ital. vite vino, 14,** 275-285.

CANTARELLI C. et CAPRIOTTI A., 1952. Gli agenti della fermentazione vinaria della provincia di Trevisio. **Rivista viticolt, enol. Conegliano,** N° 6, 7 et 8.

CASTELLI T., 1954. Recherche microbiologiche sulle uve di moscato di Pantelleria. **Riv. Vitic. Enol.,** N° 3, 81-86.

CASTELLI T., 1971. **Vini Italia, 13,** 523.

CASTELLI T. et INIGO LEAL B., 1957. **Ann. Fac. Agric. Prugia,** 13.

CASTELLI T., 1967. Ecologie et Systématique des levures de vin. Symposium intern. Œnologie, Bordeaux-Cognac.

CATALANO M., 1957. **Ann. Fac. Bari,** 11.

DESCOFFRE A., 1904. Etude sur les levures œnogènes des Charentes. **Thèse Pharmacie,** Bordeaux.

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

FLORENZANO G., 1949. La microflora blastomicetica dei mosti e dei vini di alcune zone Toscane. **Ann. sperim. agrar., 3,** 887.

GANDINI A., 1964. Contributo alla conoscenza dei lieviti della vinificazione del 1963 nell'astigiano. **Atti Accad. ital. vite vino, 16,** 447-468.

GUIMBERTEAU G., 1969. Etude de la formation des polyols dans la fermentation lactique des glucides. **Conn. Vigne Vin, 3,** N° 1, 1-41.

KRIMBAS B.D. et DAVIDES V.X., 1950. **VI^e Congrès intern. de la Vigne et du Vin,** Athènes.

LAFON J., COUILLAUD P. et GAYBELLILE F., 1973. **Le cognac.** Baillière J.B. éditeur, Paris.

LODDER J., 1970. **The Yeasts. A taxonomic study.** North Holland Publish Co, Amsterdam.

LODDER J. et KREGER VAN RIJ N.J.W., 1952. **The Yeasts. A taxonomic study.** North Holland Publish Co, Amsterdam.

MALAN C.E., 1951. I lieviti della fermentazione vinaria in Piemonte. **Atti Accad. ital. vite vino, 3**, 338-360.

MARTINAND V., 1909. Les levures cultivées dans la vinification de la vendange. **Revue de vitic., 32**, 174-206.

MRAK E.M. et Mc CLUNG L.S., 1940. Teasts occuring on grapes and grape products in California. **Journ. of Basteriology, 40,** 395.

MUSSO L., 1913. Contribution à l'étude des levures algériennes. **Thèse Sciences,** Paris.

NITESCU M.A., 1915. Contribution à l'étude des levures roumaines. **Thèse Sciences**, Paris.

OHARA Y., 1965. **Jap. Society of enologists.**

PARK Y.H., 1974. Contribution à l'étude des levures de Cognac. **Thèse 3e cycle**, Bordeaux.

PARLE J.N. et Di MENNA M.E., 1966. **N. Z. J. Agric. Res., 9,** 98.

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

RENAUD J., 1941. Les levures des vins du Val de Loire. **Thèse Sciences,** Paris.

ROSET M., 1970. Etude de quelques levures dites « sauvages ». Essais en vue de leur emploi dans l'industrie des jus de raisin. **Thèse Docteur-Ingénieur,** Toulouse.

ROSSI (de) G., 1935. I lieviti della fermentazione vinaria nella regione umbra. **IVe Congrès intern. de la Vigne et du Vin,** Lausanne.

SAPIS-DOMERCQ S., 1970. Nouvelles études de la microflore en vinification. **Conn. Vigne Vin, 4,** N° 1, 45-61.

SCHEFFER W.R. et MRAK E.M., 1951. Charasteristies of yeast causing clouding of dry white wines.**Mycopathologia mycologia applicat, 5,** 236.

SUCEFIC-SAFARD O., 1955. **Biljne Proizrodoje, 4,** 127.

TUIRINA L.V., 1962. **Station Tech. Œnol., Magaratch, 11,** 42.

VAN ZYL J.A. et DU PLESSIS L., 1961. **S. Afr. J. Agric. Sci., 4,** 393.

VERONA O., 1951. Aspetti e problemi relativi agli agenti della fermentazione vinaria. **Atti Accad. ital. vite vino, 3,** 203.

YOKOTSUKA I. et GOTO S., 1955. **J. Agric. Chem. Soc. Jap.,** V. 29, (39), 123.