

Les levures d'un chai du Mâconnais

par

J. M. BELIN¹⁾

The yeasts of a Mâconnais winery

S u m m a r y . — The yeast populations of the various parts of a Mâconnais winery have been analysed from a taxonomy and biology point of view. 14 species have been isolated from the cement vats used for red and white wine making, on the horizontal wine-presses with wooden and plastics laths, on the walls and ground of the winery and on the bottling apparatus. The qualitative and quantitative distribution of the species has been studied. The dominant species was *Saccharomyces cerevisiae*. *Hansenula anomala* and *Pichia membranaefaciens* were also frequent. Some species have newly been revealed in this habitat: *Hansenula subpelliculosa*, *Saccharomyces pretoriensis*, *Cryptococcus infirmo-miniatus*, *Cr. laurentii* and *Aureobasidium pullulans*.

Introduction

Afin d'avoir une meilleure connaissance des populations de levures présentes dans les chais, des recherches ont été entreprises sur la mycoflore d'un chai du Mâconnais. Des travaux ont déjà été réalisés sur deux chais de la partie Côte d'orientne du vignoble bourguignon (BELIN 1978).

Les recherches consacrées aux microorganismes de ce type d'habitat sont peu nombreuses malgré l'importance évidente des levures au cours des diverses phases de l'élaboration et de la conservation des vins. En France PEYNAUD et DOMERCQ (1959) ont fait de telles études dans le Bordelais. VAN DER WALT et VAN KERKEN (1961) en ont réalisé en Afrique du Sud et MINÁRIK (1968, 1969 a et b) en Tchécoslovaquie.

Le but de ce travail est donc d'étudier, d'un point de vue qualitatif et quantitatif, les populations levuriennes du logement et du matériel de vinification d'un chai du Mâconnais.

Toute recherche de ce type nécessite un travail important d'identification des microorganismes. Les principales observations réalisées durant ce travail et pouvant apporter des précisions sur les caractères des espèces seront également mentionnées.

Matériel et méthodes

Le Mâconnais

Entre la Côte de Beaune et le Beaujolais, le vignoble du Mâconnais, situé sur la rive droite de la Saône, s'étale sur une longueur de 35 km et 10 à 15 km de largeur. Les prélèvements ont été faits dans un chai de la commune d'Igé située dans la zone centrale de ce vignoble.

¹⁾ Ce travail a été effectué avec la collaboration technique de L. UDE.

Les prélèvements

Les prélèvements ont été réalisés en Décembre 1977, donc relativement tard après les vendanges, sur les lieux suivants: murs et sol de la cuverie, pressoir à lattes en plastique, pressoir à lattes en bois, cuve de vinification en rouge, cuve de vinification en blanc et tireuse.

Les levures de chacun de ces lieux sont prélevées par application d'un milieu gélosé sur le support étudié. 5 prélèvements sont réalisés pour chaque lieu, la surface totale de prélèvement correspond à 35 cm².

Le milieu gélosé servant aux prélèvements est composé de jus de raisin dilué: 1000 ml; peptone: 5 g; gélose: 30 g et solution d'auréomycine à 1 g/200 ml: 6,6 ml afin d'éliminer la plus grande partie des bactéries.

Isolément des souches

Les prélèvements sont incubés pendant 3 à 6 d à 25 °C. Il est alors possible d'effectuer la numération des colonies de chaque type morphologique apparue.

1 à 2 colonies de chaque type sont isolées en vue de leur identification. C'est ainsi que 44 souches ont été isolées.

Identification des souches

La détermination des souches est réalisée suivant les méthodes décrites par WICKERHAM (1951), LODDER et KREGER-VAN RIJ (1952), BOIDIN *et al.* (1962) et LODDER (1970).

Cependant nous avons suivi un schéma d'identification quelque peu différent de celui proposé par LODDER (1970) ou par BARNETT et PANKHURST (1974) et ne comportant, dans un premier temps, que 15 tests (caractères de la reproduction végétative; formation de pseudomycélium; morphologie des colonies en milieu liquide; fermentation: glucose, galactose, saccharose, maltose, lactose et raffinose; assimilation de tous ces sucres sauf le glucose et assimilation du nitrate de potassium). Ces tests permettent d'arriver soit directement à l'espèce soit à des groupes d'espèces. Dans ce dernier cas quelques tests complémentaires permettent d'arriver à l'espèce.

Il est bien entendu toujours possible d'effectuer une vérification de la détermination en réalisant sur un nombre réduit de souches les 52 tests classiques signalés par LODDER (1970).

Résultats

Ainsi que nous l'avons déjà fait antérieurement (BELIN 1978) les résultats de cette étude seront divisés en deux parties: taxonomie des souches isolées et répartition des populations de levures.

A — Étude taxonomique des souches

La comparaison du comportement des 44 souches isolées, au cours de différents tests, a permis de réunir certaines levures entre elles, par analogie dans les résultats des tests d'identification. En conséquence 14 espèces ont été identifiées et, parmi elles, les deux variétés d'une même espèce.

Nous allons étudier successivement les levures sporogènes puis les levures asporogènes. Dans chaque groupe les genres et espèces isolés seront classés par ordre alphabétique.

I — Levures sporogènes

1) Genre *Hansenula* H. et P. SYDOW

L'assimilation positive du nitrate de potassium est le principal critère de différenciation d'avec le genre *Pichia* que nous avons également rencontré.

H. anomala (HANSEN) H. et P. SYDOW: 5 souches s'apparentent à cette espèce et parmi elles 3 appartiennent à la variété *anomala* et 2 semblent appartenir à la variété *schneeggii* car elles fermentent faiblement le saccharose et ne se développent pas sur milieu à pression osmotique élevée. Toutes nos souches présentent un abondant pseudomycélium et une seule souche se développe lentement et faiblement sur lactose.

H. subpelliculosa BEDFORD: une seule souche semble se rattacher à cette espèce; elle présente notamment une assimilation lente et faible du galactose, maltose et raffinose.

2) Genre *Pichia* HANSEN

L'assimilation du nitrate de potassium est donc négative.

P. fluxuum (PHAFF et KNAPP) KREGER-VAN RIJ: 2 souches présentant des spores avec un rebord et dépourvues de pouvoir fermentaire peuvent être identifiées à cette espèce. Tous les caractères morphologiques et physiologiques sont identiques à ceux décrits dans l'ouvrage de LODDER (1970). Il faut signaler que nos deux souches produisent un pseudomycélium rudimentaire.

P. membranaefaciens HANSEN: les 4 souches que nous avons isolées n'ont aucun pouvoir fermentaire. Une souche ne se développe que très faiblement sur milieu sans vitamines et présente une croissance positive à 37 °C. Tous les autres tests sont en accord avec ceux précédemment décrits (LODDER 1970).

3) Genre *Saccharomyces* HANSEN

S. cerevisiae HANSEN: 16 souches appartiennent à cette espèce. Nous avons retrouvé dans cette étude la grande variabilité dans les assimilations, déjà signalée par LODDER (1970) et que nous avons également observée dans un travail précédent (BELIN 1978). Le développement très lent sur succinate a été retrouvé pour 10 des souches. Toutes les souches peuvent se développer sur milieu sans vitamines.

S. pretoriensis VAN DER WALT et TSCHUCHNER: 2 souches possèdent les caractéristiques morphologiques et physiologiques qui ont conduit à les considérer comme *S. pretoriensis* malgré l'absence de croissance sur glycérol et D-xylose. Nos souches présentent également une fermentation positive du galactose et une croissance positive à 37 °C; ces deux caractères sont d'ailleurs signalés comme étant variables.

S. rosei (GUILLIERMOND) LODDER et KREGER-VAN RIJ: une seule souche correspond à la description de cette espèce. Notre souche présente cependant une très lente et très faible croissance sur maltose et un développement positif sur milieu sans vitamines mais ces deux caractères sont considérés comme variables.

II — Levures asporogènes

1) Genre *Candida* BERKHOUT

C. sake (SAITO et OTA) VAN UDEN et BUCKLEY nov. comb.: une seule souche appartient à cette espèce. De même que pour la souche isolée précédemment à Vougeot (BELIN 1978) nous avons retrouvé une très faible croissance sur érythritol et L-rhamnose et aucun développement sur L-sorbose.

2) Genre *Cryptococcus* KÜTZING emend. PHAFF et SPENCER

Cr. infirmo-miniatus (OKUNUKI) PHAFF et FELL nov. comb.: une souche s'apparente à cette espèce. Pas de pouvoir fermentaire. Assimilation de l'inositol et du nitrate

de potassium. Nous avons observé une faible et lente croissance sur milieu sans vitamines mais tous les autres caractères concordent avec ceux de l'espèce type.

Cr. laurentii (KUFFERATH) SKINNER: une seule de nos souches correspond à cette espèce. Pas de pouvoir fermentaire, assimilation de l'inositol mais pas d'assimilation du nitrate de potassium. Il faut souligner l'absence de développement sur D-mannitol, adonitol et dulcitol; ces caractères étant déjà signalés comme très variables.

3) Genre *Rhodotorula* HARRISON

R. glutinis (FRES.) HARRISON var. *glutinis*: une seule souche semble appartenir à cette espèce et notamment à la variété *glutinis* du fait de sa rapide assimilation du nitrate de potassium. Il faut cependant signaler que la description type de l'espèce montre la variabilité de nombreux caractères d'assimilation.

R. rubra (DEMME) LODDER: 4 souches correspondent parfaitement à cette espèce malgré une très faible et lente croissance sur lactose et sur milieu sans vitamines.

4) Genre *Torulopsis* BERLESE

T. candida (SAITO) LODDER: 1 souche se rapproche le plus de cette espèce. Le grand nombre de caractères variables donnés par LODDER (1970) dans la description type ne permet pas d'effectuer de remarques sur cette espèce qui semble très mal définie.

III — Microorganismes levuriformes

Il est très courant d'isoler, en même temps que les levures, des champignons dont les colonies qui apparaissent sur les milieux de cultures ressemblent beaucoup à celles des levures proprement dites.

Aureobasidium pullulans (DE BARY) ARNAUD appartient à cette catégorie de champignons. Sa morphologie, et notamment la couleur des colonies, est très variable suivant les substrats et les conditions de culture. Les colonies peuvent être ainsi roses ou noires. D'autre part la reproduction végétative de ce champignon est caractérisée par la formation de blastospores, d'arthrospores et de chlamydo-spores. Ses caractères physiologiques ont été peu étudiés: comme le signale COOKE (1959) son pouvoir fermentaire est nul; l'assimilation du nitrate de potassium est positive ainsi que pour glucose, galactose, saccharose, maltose, raffinose, lévulose, D-xylose, acide citrique, acide succinique, acide tartrique, D-mannitol, glycérol et salicine, seule l'assimilation du lactose est négative.

Les 4 souches que nous avons isolées sont fortement colorées en noir par des pigments du groupe des mélanines et tous les caractères tant morphologiques que physiologiques correspondent parfaitement à ceux que nous venons de décrire.

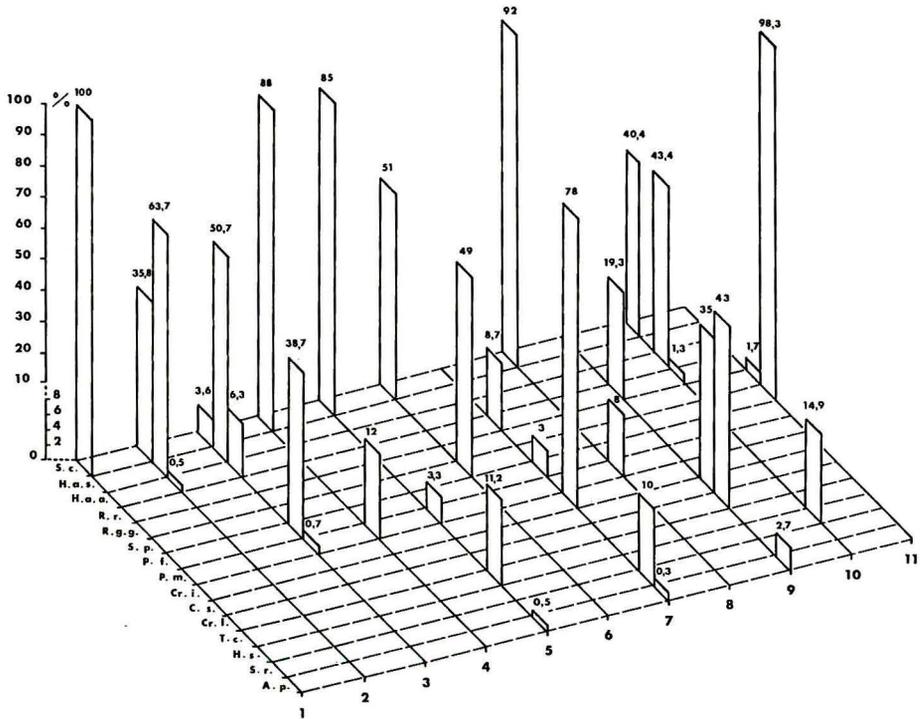
B — Étude des populations de levures

Cette partie sera consacrée à la présentation des résultats des prélèvements effectués, avec indication du nombre total de levures isolées et de l'estimation quantitative des espèces identifiées. Toutes ces données sont regroupées dans la figure.

La microflore d'un certain nombre d'éléments caractéristiques du chai a donc été étudiée. Après identification des souches isolées les populations levuriennes observées sont les suivantes:

a) Cuve en ciment pour la vinification en rouge

Deux séries de prélèvements sont réalisées sur les parois internes de la cuve: la première concerne le fond et les parties inférieures des parois latérales; l'autre



Estimation qualitative et quantitative des populations de levures isolées d'un chai du Mâconnais

Qualitative and quantitative estimation of the yeast populations isolated from a Mâconnais winery

Abréviations des espèces

Abbreviations of species

| | | | |
|--|--------|--|--------|
| <i>Aureobasidium pullulans</i> | A.p. | <i>P. membranaefaciens</i> | P.m. |
| <i>Candida sake</i> | C.s. | <i>Rhodotorula glutinis</i> var. <i>glutinis</i> | R.g.g. |
| <i>Cryptococcus infirmo-minutus</i> | Cr.i. | <i>R. rubra</i> | R.r. |
| <i>Cr. laurentii</i> | Cr.l. | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | S.c. |
| <i>Hansenula anomala</i> var. <i>anomala</i> | H.a.a. | <i>S. pretoriensis</i> | S.p. |
| <i>H. anomala</i> var. <i>schneggii</i> | H.a.s. | <i>S. rosei</i> | S.r. |
| <i>H. subpelliculosa</i> | H.s. | <i>Torulopsis candida</i> | T.c. |
| <i>Pichia fluxuum</i> | P.f. | | |

Numéros des prélèvements

| | | | |
|-------------------------------------|---|---------------------------------|----|
| Cuve de vinification en rouge: | | Pressoir à lattes en plastique: | |
| — fond | 1 | — côté externe | 7 |
| — sommet | 2 | — côté interne | 8 |
| Cuve de vinification en blanc: | | Murs de la cuverie | 9 |
| — fond | 3 | Sol de la cuverie | 10 |
| — sommet | 4 | Tireuse | 11 |
| Pressoir à lattes en bois : | | | |
| — côté externe | 5 | | |
| — côté interne | 6 | | |

série est effectuée au sommet de la cuve, sur les parois latérales. Cette cuve en ciment a été affranchie à l'acide tartrique et rincée à l'eau après sa dernière utilisation.

— Fond de la cuve:

Le nombre total de levures isolées est de 12 725/35 cm². *Saccharomyces cerevisiae*.

— Sommet de la cuve:

Les levures y sont au nombre de 17 736/35 cm². *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula anomala* var. *anomala* et var. *schneggii*.

b) Cuve en ciment pour la vinification en blanc

Comme pour la cuve précédente deux séries de prélèvements ont été effectuées: la première au fond et la seconde au sommet de la cuve. Il s'agit également d'une cuve affranchie à l'acide tartrique et qui a été rincée à l'eau après sa dernière utilisation.

— Fond de la cuve:

Le dénombrement des levures est de 1 304/35 cm². *Hansenula anomala* var. *anomala* et var. *schneggii*, *Pichia fluxuum*, *P. membranaefaciens*, *Saccharomyces cerevisiae*.

— Sommet de la cuve:

Le nombre de souches isolées est de 12 142/35 cm². *Pichia membranaefaciens*, *Saccharomyces cerevisiae*.

c) Pressoir horizontal à lattes en bois

Une première série de prélèvements a été réalisée sur le côté externe des lattes et une autre sur le côté interne. Après les vendanges ce pressoir a été rincé à l'eau.

— Côté externe des lattes:

Le nombre de levures est de 2 732/35 cm². *Pichia membranaefaciens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulopsis candida*, *Aureobasidium pullulans*.

— Côté interne des lattes:

Le nombre total de levures y est de 23 653/35 cm². *Saccharomyces cerevisiae*, *S. pretoriensis*.

d) Pressoir horizontal à lattes en plastique

Les prélèvements ont été effectués de la même manière que pour le pressoir précédent. Ce pressoir a également été rincé à l'eau.

— Côté externe des lattes:

| Numbers of sampling | | | |
|---------------------------------|---|-------------------------------|----|
| Vat used for red wine making: | | Press with laths of plastics: | |
| — ground | 1 | — exterior | 7 |
| — top | 2 | — interior | 8 |
| Vat used for white wine making: | | Walls of the cellar | 9 |
| — ground | 3 | Ground of the cellar | 10 |
| — top | 4 | | |
| Press with wooden laths: | | Bottling apparatus | 11 |
| — exterior | 5 | | |
| — interior | 6 | | |

Le nombre de souches isolées s'élève à 381/35 cm². *Pichia fluxuum*, *Saccharomyces rosei*, *Cryptococcus infirmo-miniatus*, *Rhodotorula rubra*, *Aureobasidium pullulans*.

— Côte interne des lattes:

Les levures y sont au nombre de 12 443/35 cm². *Pichia membranaefaciens*, *Saccharomyces cerevisiae*.

e) Murs de la cuverie

Les murs des locaux où se trouvent les cuves précédemment étudiées sont recouverts d'un enduit grossier en ciment qui a été peint avec une peinture laquée.

Nombre de levures: 148/35 cm². *Candida sake*, *Cryptococcus laurentii*, *Rhodotorula rubra*, *Aureobasidium pullulans*.

f) Sol de la cuverie

Il s'agit d'un sol cimenté fréquemment lavé à l'eau.

Nombre de levures: 47 200/35 cm². *Hansenula anomala* var. *anomala*, *H. subpelliculosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula rubra*.

g) Tireuse

Il s'agit d'une tireuse Elva-Friedrich.

Le prélèvement a été effectué sur la partie interne constituée d'acier inoxydable. Cet appareil avait été rincé à l'eau.

Nombre de levures: 58/35 cm². *Saccharomyces pretoriensis*, *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis*.

L'estimation quantitative des diverses espèces isolées à partir de chaque prélèvement apparaît dans le graphique de la figure.

Discussion

Les résultats précédents entraînent deux séries de remarques: l'une sur les espèces isolées et l'autre sur la composition des populations de levures en liaison avec les divers éléments du chai.

La comparaison des résultats obtenus avec ceux des travaux antérieurs (PEYNAUD et DOMERCQ 1959, VAN DER WALT et VAN KERKEN 1961, MINÁRIK 1968, 1969 a et b, BELIN 1978) nous montre qu'un certain nombre d'espèces n'avaient pas encore été signalées dans les chais:

— *Hansenula anomala* var. *schneegii*: seule cette variété n'avait pas été rencontrée. Mais cette espèce est fréquente dans les chais et essentiellement sous la variété *anomala*.

— *H. subpelliculosa*: cette levure à métabolisme fermentaire peut produire un voile à la surface des milieux liquides. C'est un agent de contamination.

— *Saccharomyces pretoriensis*: on le rencontre parfois sur le raisin au moment des vendanges et dans les moûts (SAPIS-DOMERCQ et GUITTARD 1976). Ses caractères oenologiques sont peu connus. Il possède cependant un bon pouvoir fermentaire.

— *Cryptococcus infirmo-miniatus*, *Cr. laurentii*: le genre *Cryptococcus* n'a été signalé qu'une seule fois dans un chai (BELIN 1978). Ce sont des levures à métabolisme essentiellement oxydatif et des agents de contamination.

— *Aureobasidium pullulans*: ce microorganisme levuriforme est très souvent isolé à partir des diverses parties du cep de vigne mais rarement signalé dans la littérature (DAVENPORT 1976).

L'analyse des résultats montre que l'espèce dominante dans ce chai est *Saccharomyces cerevisiae*. PEYNAUD et DOMERCQ (1959) pour le Bordelais et MINÁRIK (1968) pour divers éléments des chais de la région de Raca en Tchécoslovaquie avaient fait des observations identiques. Mais ceci n'avait pas été observé dans les chais précédemment étudiés en Bourgogne (BELIN 1978). Par contre il faut souligner que *Kloeckera apiculata* n'a pas été mis en évidence dans ce chai.

L'examen du graphique de la figure fait apparaître que *Saccharomyces cerevisiae* n'est absent que de l'extérieur du pressoir à lattes en plastique, des murs de la cuverie et de la tireuse. Comme on pouvait s'y attendre, il se trouve en grand nombre sur les pressoirs et dans les cuves.

Hansenula anomala est également assez répandu notamment dans les cuves et sur le sol de la cuverie. Enfin, *Pichia membranaefaciens*, se rencontre principalement dans les cuves et sur les pressoirs.

D'autres espèces ne semblent localisées, dans ce chai qu'à un seul lieu de prélèvement: *Torulopsis candida* pour le pressoir à lattes en bois, *Saccharomyces rosei* et *Cryptococcus infirmo-miniatus* pour le pressoir horizontal à lattes en plastique, *Candida sake* et *Cryptococcus laurentii* pour les murs de la cuverie, et *Rhodotorula glutinis* pour la tireuse.

D'autre part, si l'on compare les dénombrements de levures, il apparaît que les lieux les plus contaminés sont le sol de la cuverie, le pressoir à lattes en bois, et évidemment les cuves en ciment. De telles constatations ont déjà été faites à Vougeot et à Meursault (BELIN 1978). Les substrats les plus pauvres en microorganismes sont les murs de la cuverie et la tireuse. Il faut remarquer, enfin, les différences de contamination entre les divers types de pressoirs et de cuves.

Toutes les espèces isolées dans ce chai du Mâconnais soulignent, une fois de plus, l'importance des levures des chais dans l'élaboration des vins. Il n'est pas nécessaire d'insister sur le rôle favorable de certaines espèces présentes dans les populations de levures isolées et pouvant se trouver directement en contact avec le moût; mais il ne faut pas oublier le nombre également important d'espèces appartenant aux levures d'altération des vins.

Ce travail montre la diversité des espèces constituant les populations de levures des chais et apporte des précisions quant à leur répartition sur les divers lieux de prélèvement.

Résumé

Les populations de levures des divers éléments d'un chai du Mâconnais sont analysées d'un point de vue taxonomique et biologique. 14 espèces ont été isolées à partir des cuves en ciment pour la vinification en rouge et en blanc, des pressoirs horizontaux à lattes en bois et en plastique, des murs et du sol de la cuverie et de la tireuse. La répartition qualitative et quantitative des espèces est étudiée. L'espèce dominante est *Saccharomyces cerevisiae*. *Hansenula anomala* et *Pichia membranaefaciens* sont également fréquents. Un certain nombre d'espèces ont été nouvellement mises en évidence dans ce type d'habitat: *Hansenula subpelliculosa*, *Saccharomyces pretoriensis*, *Cryptococcus infirmo-miniatus*, *Cr. laurentii* et *Aureobasidium pullulans*.

Bibliographie

- BARNETT, J. A. and PANKHURST, R. J., 1974: A new key to the yeasts. North Holland Publishing Co., Amsterdam.
- BELIN, J. M., 1978: Contribution à l'étude des levures des chais. Taxonomie, répartition des levures. Mycopathologia (sous presse).
- BOIDIN, J., ABADIE, F., JACOB, J. L. et PIGNAL, M. C., 1962: Les levures à spores réniformes. Bull. Soc. Mycol. France 68, 155—203.
- COOKE, W. B., 1959: An ecological life history of *Aureobasidium pullulans* (DE BARY) ARNAUD. Mycopathol. Mycol. appl. 12, 1—41.
- DAVENPORT, R. R., 1976: Distribution of yeasts and yeast-like organisms from aerial surfaces of developing apples and grapes. In: DICKINSON, C. H. and PREECE, T. F. (Eds.): Microbiology of aerial plant surfaces, 325—359. Academic Press, New York.
- LODDER, J., 1970: The yeasts. North Holland Publishing Co., Amsterdam.
- — and KREGER-VAN RIJ, N. J. W., 1952: The Yeasts. A taxonomic study. North Holland Publishing Co., Amsterdam.
- MINÁRIK, E., 1968: Kontaminierende Hefen und hefeartige Mikroorganismen in den Betrieben. Mitt. Klosterneuburg 18, 10—16.
- — , 1969 a: Zur Ökologie von Hefen und hefeartigen Mikroorganismen sekundärer Standorte im Tokayer Weinbaugebiet. Mitt. Klosterneuburg 19, 40—45.
- — , 1969 b: Ecology of yeasts and yeast-like microorganisms on secondary habitats in Czechoslovakia. Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol. 35, Suppl.: Yeast Symposium 1969, D 7—8.
- PEYNAUD, E. and DOMERCO, S., 1959: A review of microbiological problems in wine-making in France. Amer. J. Enol. Viticult. 10, 69—77.
- SAPIS-DOMERCO, S. et GUITTARD, A., 1976: Étude de la microflore levurienne du Roussillon. Connaiss. Vigne Vin 10, 1—21.
- VAN DER WALT, J. P. et KERKEN, A. E. VAN, 1961: The wine yeasts of the Cape. V. Studies on the occurrence of *Brettanomyces intermedius* and *Brettanomyces schanderlii*. Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol. 27, 81—90.
- WICKERHAM, L. J., 1951: Taxonomy of yeasts. USDA Tech. Bull. (Washington) No. 1029, 1—56.

Eingegangen am 10. 10. 1978

J.-M. BELIN
 Lab. de Botanique appliquée
 Section Mycologie
 E.N.S.B.A.N.A.
 Centre Universitaire
 21100 — Dijon
 France