

Sélection par hybridation de la levure Fermol Spirit pour l'élaboration d'eaux-de-vie de qualité.

Arnaud Delaherche⁽¹⁾, Jean-Marie Bercy⁽¹⁾, Walter Mulinazzi⁽¹⁾, Marie-Charlotte Colosio⁽²⁾ et Jean Roy⁽³⁾.

⁽¹⁾ AEB France, ZI, 3 rue Ampère, 77220 Gretz-Armainvilliers.

⁽²⁾ IFV Pôle Val de Loire, Château de la Frémoire, 44120 Vertou.

⁽³⁾ Station Œnologique de Saintonge, 17500 Jonzac.

Introduction

Le groupe AEB est un acteur majeur dans la sélection et la production de levures œnologiques. Il consacre une part importante de ses activités de R&D aux levures dédiées à la production de vins destinés à l'élaboration de Cognac. Ceci afin de répondre aux attentes techniques des producteurs d'eaux-de-vie dont les vins doivent remplir des cahiers des charges stricts dus aux spécificités d'élaboration d'une eau-de-vie de qualité. La distillation du vin est une étape primordiale dans son processus d'élaboration. Elle entraîne la concentration des molécules souhaitées comme les arômes (esters éthyliques d'acides gras) mais elle entraîne aussi la concentration de certaines molécules dont la présence doit être maîtrisée comme l'éthanal, l'acétate d'éthyle et les alcools supérieurs. Il est donc impératif que le vin permettant l'élaboration d'une eau-de-vie de qualité soit le plus faiblement concentré en molécules non souhaitées. Et à ce titre, le rôle des levures est essentiel car c'est lors de la fermentation alcoolique que les dérivés organoleptiques et chimiques peuvent apparaître. Depuis les années 80, l'utilisation des levures sèches actives (LSA) est devenue un outil technique permettant la maîtrise de la fermentation alcoolique. Cela permet de limiter les accidents liés au développement des levures indigènes dont les capacités fermentaires sont aléatoires et non reproductibles.

Déjà producteur d'une levure référencée (Zymasil®) pour la production du Cognac, le groupe AEB teste chaque année de nouvelles souches de levures. Issue d'un programme d'hybridation mené par l'I.F.V. Pôle Val de Loire, la levure Fermol Spirit est le résultat d'un croisement de deux souches « mères » ayant des caractéristiques œnologiques complémentaires et des capacités fermentaires irréprochables. La technique du Breeding consiste à croiser deux souches de levures pour regrouper au sein d'une même cellule « fille » les propriétés technologiques d'intérêt des deux souches parentales. Cette approche génétique permet, d'une part, d'optimiser les performances des souches de levure obtenues sans affecter leur nature biologique et, d'autre part, d'accroître la biodiversité des levures.

Ainsi depuis 2013, des essais « grands volumes » menés avec la levure Fermol® Spirit ont été effectués. D'un point de vue technique, la levure œnologique utilisée doit permettre un départ franc en fermentation alcoolique et une consommation complète et régulière des sucres. De plus, par ses caractéristiques métaboliques, la levure doit avoir de très faibles productions d'alcools supérieurs, d'éthanal et d'acétate d'éthyle. D'un point de vue organoleptique, la levure doit respecter la typicité des raisins et ne pas imposer son empreinte sur le profil aromatique du vin.

Dans un premier temps, l'article sera consacré à la genèse de la souche Fermol® Spirit ainsi qu'aux résultats d'hybridation. Puis dans un second temps, les résultats d'expérimentation menés sur différentes sites sur le millésime 2014 seront présentés.

Matériels et méthodes

Le Breeding dirigé, une nouvelle approche technologique.

Le Breeding dirigé est une innovation technologique utilisée par le groupe AEB depuis plusieurs années pour optimiser la sélection de souches de levures de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*. Comme nous l'avons présenté précédemment, les vins destinés à l'élaboration d'une eau-de-vie doivent avoir des caractéristiques analytiques très précises. Ainsi, toutes les levures de l'espèce *S. cerevisiae* ne sont pas

en mesure de répondre positivement à ces particularités métaboliques strictes. En effet, très peu de levures peuvent produire des esters d'acides gras en quantité importantes tout en produisant très peu d'alcools supérieurs, d'éthanal et d'acétate d'éthyle. Ainsi la subtilité réside dans le développement d'une levure ayant des propriétés physico-chimiques hors normes. Et pour cela, la technique génétique du Breeding dirigé apparaît comme une solution innovante. En effet, la sélection de deux souches « mères » ayant des capacités métaboliques complémentaires a permis l'élaboration d'une souche de levure ayant les caractéristiques requises.

Les souches parentales de levures choisies par le groupe AEB et l'IFV Pole Val de Loire sont la Zymasil® et la Fermol® PURBLANC. La Zymasil® est une souche référence dans la région de Cognac, elle est validée depuis 2005 par le B.N.I.C. (Bureau National Interprofessionnel du Cognac). Ses compétences métaboliques sont caractérisées par une très faible production d'alcools supérieurs, une faible production d'éthanal et d'acétate d'éthyle. D'un point de vue fermentaire, la souche a un temps de latence court avec un démarrage rapide de la fermentation alcoolique. La Fermol PURBLANC est une souche plus récente puisqu'en 2013 elle a été pré-qualifiée par la station viticole de Cognac suite aux expérimentations pilotes. Des essais en grand volume ont confirmés ses caractéristiques œnologiques. D'un point de vue métabolique, elle se caractérise par sa faible production d'alcools supérieurs et sa production importante d'esters aromatiques et d'acide gras. Ces caractéristiques fermentaires permettent à la souche d'assurer des fermentations alcooliques franches et rapides.

Millésime 2012 : le Breeding permet de développer plusieurs hybrides.

A partir de 2012, des essais de Breeding ont été menés avec les deux souches parentales dans le but d'obtenir des hybrides ayant les caractéristiques œnologiques répondant à notre cahier des charges. Les 17 hybrides obtenus, identifiés par analyse de leur profil génétique, ont été analysés selon des protocoles stricts pour déterminer leurs caractéristiques métaboliques et leurs capacités fermentaires (cinétique de dégradation des sucres, rendement d'alcool et temps de latence). A cette étape de la sélection, il est nécessaire de vérifier que les hybrides sélectionnés conservent leurs caractéristiques métaboliques après les étapes de production de biomasse et de séchage. En effet, ces deux étapes sont stressantes pour les levures et cela peut entraîner des modifications génétiques des levures sélectionnées. Cela permet aussi de s'assurer de la stabilité génétique des souches issues du Breeding.

En 2013, ces 17 hybrides ont été confiés à la Station Œnologique de Saintonge, en vue de tests d'aptitude à l'élaboration de vins de distillation. Ces essais ont été conduits en micros-fermenteurs, avec un suivi de la cinétique fermentaire pour chacune de modalités. Les analyses classiques et les analyses fines des micro-distillats ont été réalisées par chromatographie en phase gazeuse (CPG). Pour chaque souche, trois répétitions ont été mises en œuvre. Ce travail a permis d'aboutir à une pré-sélection de trois souches. Il s'agit des hybrides 33G4, 36G5 et 33G3. A ce stade de la sélection, les trois hybrides présentent des caractéristiques conformes à notre cahier des charges.

Les mini-fermentations menées à partir de moût issu d'Ugni blanc sur le millésime 2013 ont permis de confirmer les résultats obtenus des micro-fermentations. Les résultats analytiques des eaux-de-vie sont présentés dans les figures 1 et 2. Le témoin utilisé lors de ces expérimentations est une souche de levure référencée et qualifiée par le B.N.I.C (Bureau National Interprofessionnel du Cognac) depuis plusieurs années.

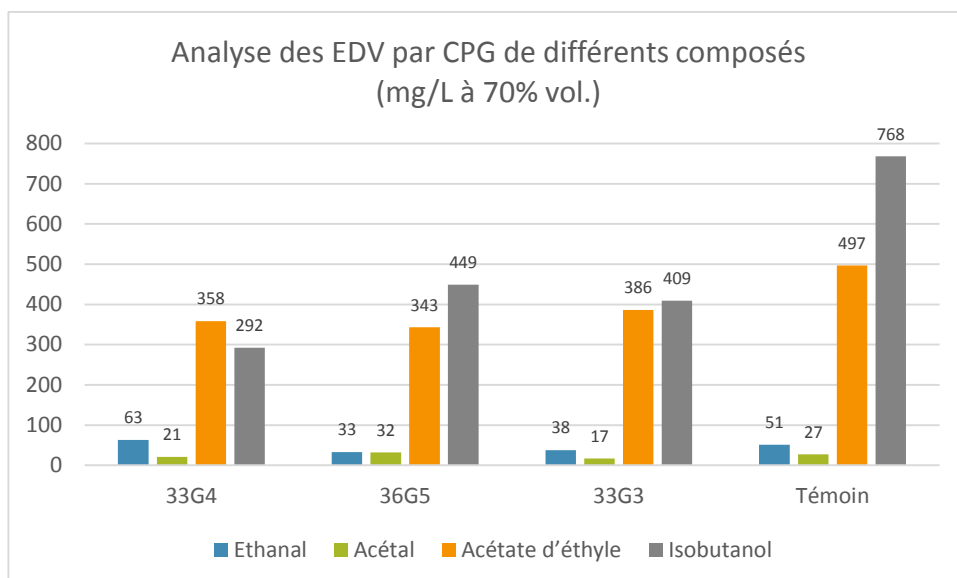


Figure 1 : Comparaison des teneurs en différents composés des eaux-de-vie (Essais 2013).

Les résultats analytiques présentés dans la figure 1 permettent de constater que les hybrides 36G5 et 33G3 produisent des quantités très faibles d'éthanal par rapport au témoin. En effet, les souches 36G5 et 33G3 produisent 35% et 25% de moins d'éthanal que le témoin, respectivement. De plus, leurs productions d'acétate d'éthyle et d'isobutanol sont beaucoup plus faibles. Les souches 36G5 et 33G3 produisent 31% et 22% de moins d'acétate d'éthyle que le témoin.

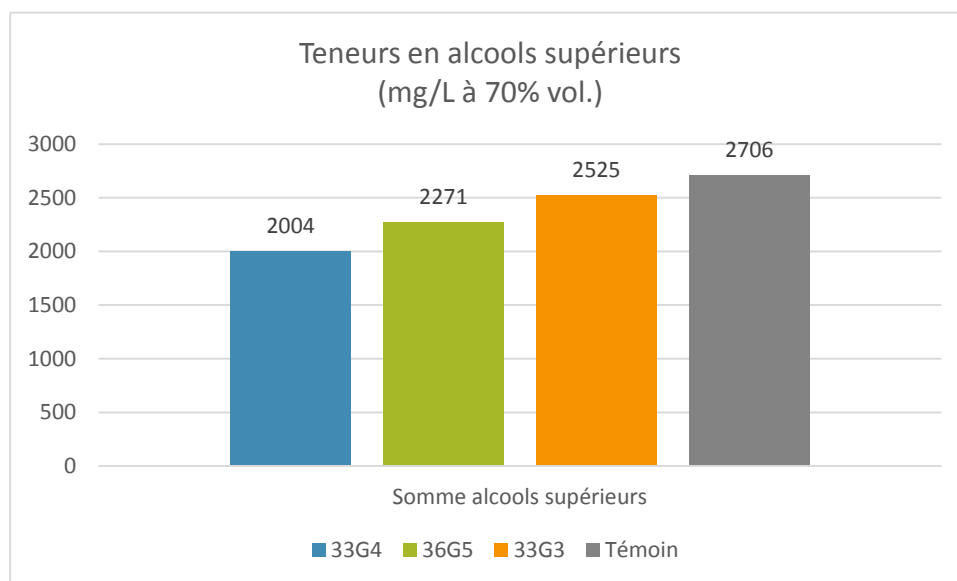


Figure 2 : Comparaison des teneurs en alcools supérieurs des eaux-de-vie (Essais 2013).

Pour les trois hybrides testés, la teneur en alcools supérieurs est inférieure au témoin. En effet, les hybrides 33G4, 36G5 et 33G3 produisent 26, 16 et 6,6 % de moins d'alcools supérieurs que le témoin, respectivement. A noter que les valeurs obtenues sont inférieures aux limites acceptées par la profession.

Suite à cela, les eaux-de-vie ont été dégustées par un jury d'expert composé de 8 personnes. Les résultats des dégustations sont présentés dans le tableau 1.

souches	Note moyenne sur 20	Descripteurs sensoriels
33G4	13,94	Finesse, fruit, florale
36G5	15,38	Nette, finesse, rondeur, gras, aromatique, fruit
33G3	9,31	Sèche, métallique
témoin	7,13	Pas nette, éthanal

Tableau 1 : Résultats de la dégustation des eaux-de-vie par un jury d'expert (Essais 2013).

Les résultats de la dégustation des eaux-de-vie sont en adéquation avec les résultats analytiques. En effet, les souches 33G4 et 36G5 sont les mieux appréciées par le jury d'experts et ce sont celles qui présentent les plus faibles productions d'alcools supérieurs, d'acétate d'éthyle et d'isobutanol. La souche 36G5 présente une note de dégustation significativement supérieure à celle du témoin. Ainsi au vu des premiers résultats, la souche 36G5 présente les meilleures aptitudes à l'élaboration d'une eau-de-vie qualitative.

De plus, dans le but de comprendre le gain aromatique apporté par les souches 33G4 et 36G5, les dosages des composés aromatiques ont été réalisés sur les deux eaux-de-vie ainsi que sur le témoin. Les résultats sont présentés dans la figure 3. Pour cela, les esters aromatiques comme l'acétate d'isoamyle, l'acétate de phényléthyle, l'acétate d'hexyle et le phényl-2-éthanol ont été dosés par CPG après extraction. Il en a été de même pour les ester éthyliques d'acides gras comme le caproate, le caprylate et le laurate d'éthyle.

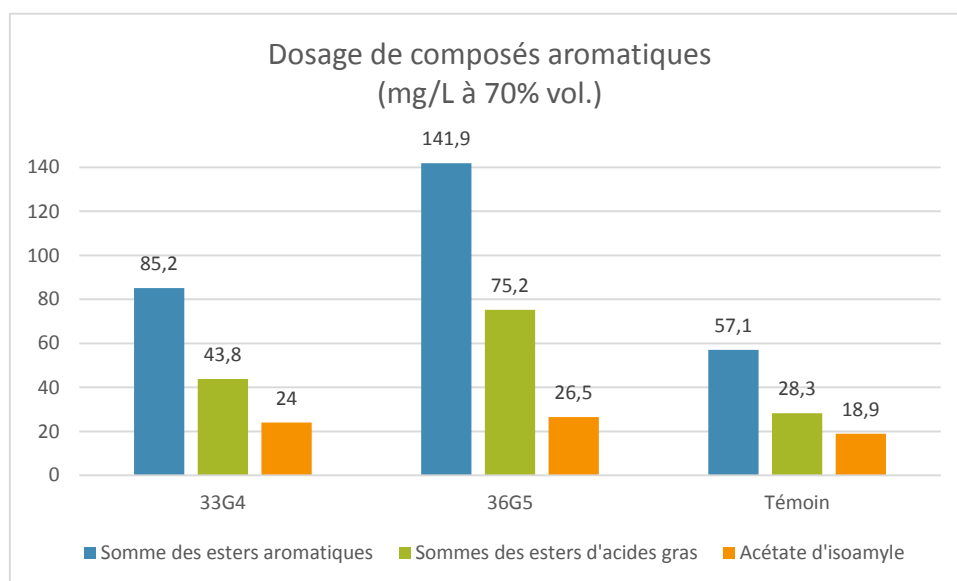


Figure 3 : Dosage des composés aromatiques des eaux-de-vie (Essais 2013).

Au vu des résultats de la figure 3, les teneurs en composés aromatiques des hybrides 33G4 et 36G5, sont supérieures au témoin. D'une manière générale c'est l'hybride 36G5 qui a produit le plus d'arômes. Ce qui corrobore fortement les descripteurs sensoriels décrits lors de la dégustation par le jury d'expert. Concernant les esters aromatiques, les hybrides 33G4 et 36G5 en produisent 49 et 147 % de plus que le témoin. Pour les esters d'acides gras, les hybrides 33G4 et 36G5 en produisent 54,7 et 165 % de plus que le témoin. Pour l'acétate d'isoamyle, marqueur aromatique associé à la banane, les différences entre les trois souches sont moins importantes, les hybrides 33G4 et 36G5 en produisent 27% et 40,2% de plus que le témoin.

Les résultats obtenus sur le millésime 2013, d'un point de vue analytique et gustatif, nous ont réconforté dans l'idée que le Breeding avait permis d'obtenir un hybride à la hauteur de nos espérances. Suite à cela, l'hybride 36G5 a été produit à grande échelle et une nouvelle levure œnologique a vu le jour : la **Fermol® Spirit**.

Millésime 2014 : Mise en place d'essais dans différentes appellations de la région de Cognac

Le millésime 2014 a permis de tester la souche Fermol® Spirit en grand volume sur différentes sites charentais que ce soit en Grande Champagne (GC), Petite Champagne (PC), Fins Bois (FB) et Bons Bois (BB). Ces essais comparatifs avec d'autres souches concurrentes et l'une des deux souches parentales, la Zymasil®, ont permis d'accumuler des informations sur les caractéristiques générales de la souche sur ce millésime. Au total, 22 sites d'essais ont été répertoriés. Par souci de clarté, les essais comparatifs avec la Zymasil® seront uniquement présentés dans la suite de l'article. Les essais ont été suivis et analysés par Mr Roy Jean, le directeur de la station Œnologique de Saintonge.

Pour chacune des modalités, une attention toute particulière a été mise en œuvre sur la qualité de la préparation du levain afin d'assurer une implantation maximale des souches testées. De plus, lors des essais comparatifs, les moûts sont séparés dans des contenants permettant une distillation séparée de chaque lot. Ceci permet de suivre chaque modalité jusqu'à l'eau-de-vie. Les différentes cuves ont étéensemencées en moyenne avec 20 g/hL de levures.

Le tableau 2 synthétise les résultats d'analyses des micro-distillations des 22 essais réalisés par la station Œnologique de Saintonge par CPG pour la souche Fermol Spirit (Tableau 2).

N° Rapport	Localisation	Ethanal	Lactate d'éthyle	Acétate d'éthyle	Esters C8-C12	Isobutanol	Somme Alcools supérieurs
108/255	GC	34	8	262	88	714	3215
133/391	PC	30	8	259	48	844	3788
134/392	BB	25	19	153	43	786	3611
135/395	FB	32	48	210	56	833	3549
144/426	PC	43	34	183	101	641	3110
162/493	GC	68	9	158	28	610	2989
162/494	GC	91	8	190	56	621	2806
167/537	PC	51	71	302	45	556	2925
179/583	PC	36	12	197	55	744	3298
179/584	PC	21	10	192	70	921	3898
179/585	PC	30	9	224	120	864	3596
179/586	PC	33	58	260	61	555	2806
179/587	PC	23	42	251	74	607	2894
180/589	PC	32	56	223	115	779	3700
190/655	GC	28	81	238	52	575	2716
205/716	PC	27	95	136	34	530	3527
221/768	PC	26	55	214	53	447	2662
221/769	PC	28	51	186	45	598	2975
224/782	PC	29	53	261	91	736	3616
251/852	PC	30	98	180	101	597	2869
251/853	PC	25	112	162	118	642	2975

261/902	PC	25	72	305	84	442	2609
	Moyenne	35	46	216	70	666	3168
	Ecart-type	16	33	47	28	133	404

Tableau 2 : Teneurs de différents composés des eaux-de-vie pour la souche Fermol® Spirit. Valeurs exprimées en mg/L à 70% vol. (Essais 2014).

Les résultats d'analyses des micro-distillations des 22 essais pour la souche Zymasil® sont présentés dans le tableau 3.

N° Rapport	Localisation	Ethanal	Lactate d'éthyle	Acétate d'éthyle	Esters C8-C12	Isobutanol	Somme Alcools supérieurs
108/254	GC	99	7	289	46	461	2626
133/390	PC	53	13	237	29	874	4004
134/393	BB	31	88	302	25	599	2985
135/396	FB	48	12	312	41	601	3237
144/425	PC	33	17	135	65	590	2855
162/495	GC	106	12	337	41	547	2842
167/538	PC	37	30	234	33	751	3407
179/581	PC	32	60	221	30	625	3104
179/582	PC	36	12	262	36	535	2671
180/588	PC	24	30	221	67	728	3896
190/655	GC	47	52	306	26	502	2774
202/700	PC	53	13	129	22	1 015	4627
205/717	PC	31	83	192	31	521	3246
221/ 770	PC	27	74	104	39	366	2574
221/771	PC	30	45	213	37	381	2365
224/783	PC	58	32	347	18	474	2466
245/838	PC	38	40	218	20	630	3304
251/851	PV	27	99	124	56	761	3587
261/903	PV	25	72	305	84	442	2609
257/866	FB	16	64	177	25	727	3289
292/1005	PC	42	30	384	61	541	2760
292/1006	PC	54	34	443	43	447	2413
	Moyenne	43	40	232	37	609	3055
	Ecart-type	22	30	75	14	167	481

Tableau 3 : Teneurs de différents composés des eaux-de-vie pour la souche Zymasil®. Valeurs exprimées en mg/L à 70% vol. (Essais 2014).

Dans le but de voir le comportement de la souche Fermol® Spirit sur le millésime 2014, l'analyse des résultats, présentés dans les tableaux 3 et 4, est réalisée à partir de la moyenne des valeurs obtenues sur les 22 sites d'essais. Lorsque l'on analyse les résultats, il est intéressant de faire un point sur les paramètres analytiques comme la production d'éthanal, d'acétate d'éthyle, d'esters éthyliques d'acides gras et d'alcools supérieurs.

Dans un premier, l'analyse de la moyenne obtenue pour la production des alcools supérieurs est réalisée. En préambule, il est important de savoir que l'une des caractéristiques principales de la souche Zymasil® est sa très faible production d'alcools supérieurs. En effet, depuis sa

commercialisation 2005, quelle que soit la qualité de maturité des raisins et les caractéristiques intrinsèques de l' « effet millésime », la souche Zymasil® a toujours été une référence pour sa faible production d'alcools supérieurs. Ainsi l'analyse de la figure 4 nous permet de constater que la souche Fermol® Spirit produit une quantité légèrement plus importante d'alcools supérieurs que la souche Zymasil®. Comme le montre la figure 4, cette différence est seulement de +3,7% sur les 22 sites d'essais. De plus, ces valeurs sont en adéquation avec les limites d'acceptation exigées par les institutions et les différentes Maisons de Cognac. Ainsi, au vu de l'ensemble des résultats sur le millésime 2014, nous pouvons en déduire la souche Fermol® Spirit a naturellement une capacité à produire une faible quantité d'alcools supérieurs. Bien évidemment, cette capacité métabolique devra être confirmée sur les prochains millésimes. Cette faible différence métabolique entre les deux souches peut nous laisser entendre que la Fermol® Spirit aurait acquis cette caractéristique métabolique par sa souche « mère », c'est-à-dire la Zymasil®, lors du Breeding.

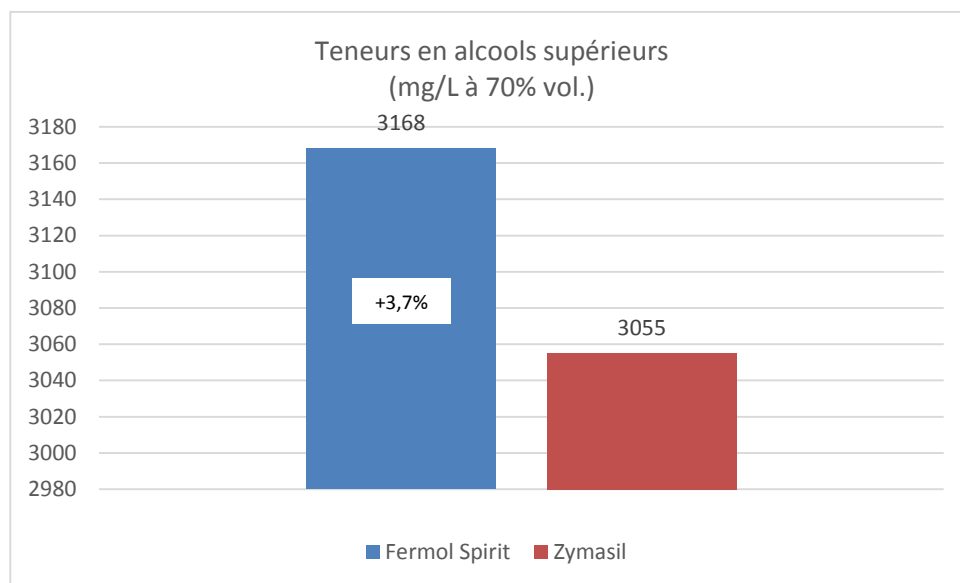


Figure 4 : Comparaison des teneurs en alcools supérieurs des eaux-de-vie (Essais 2014).

Parmi les autres paramètres analysés, il est intéressant de comparer les productions d'éthanal, d'acétate d'éthyle et des esters éthyliques d'acides gras (C8, C10 et C12) pour les deux souches (Figure 5). L'analyse des résultats des essais réalisés sur les 22 sites, permet de constater que la souche Fermol® Spirit produit moins d'éthanal que la Zymasil®. En effet, on constate une diminution de 18,6%. Pour l'acétate d'éthyle, la tendance est identique, la levure Fermol® Spirit en produit moins que la Zymasil®, soit une diminution de 7%.

Pour la production de composés aromatiques, la souche Fermol® Spirit en produit davantage. Une augmentation, correspondant à 89% par rapport à la Zymasil®, est observée. Cette différence très significative entre les deux souches pourrait s'expliquer par le fait que la seconde souche « mère », c'est-à-dire la Fermol® PURBLANC, aurait apporté ce caractère métabolique à la Fermol® Spirit.

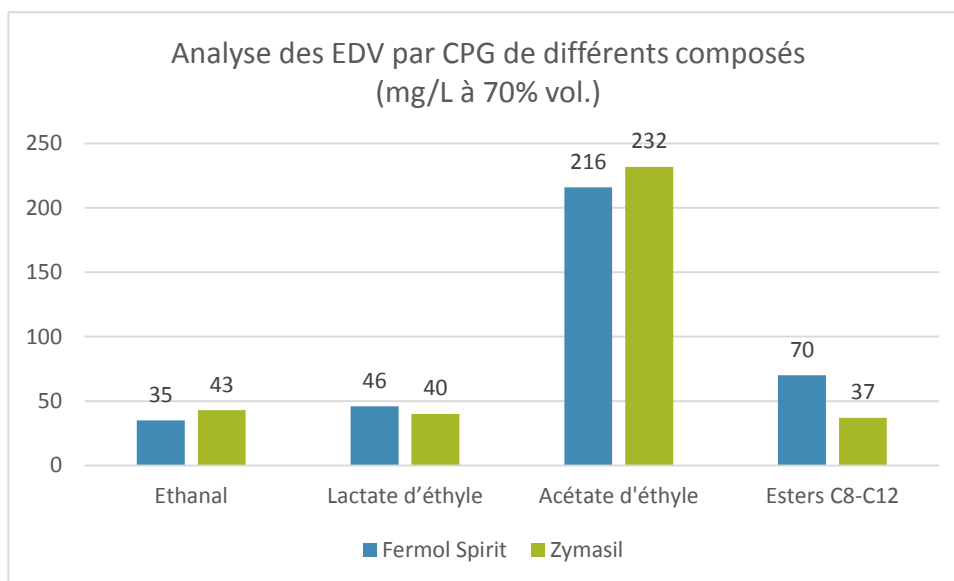


Figure 5 : Comparaison des teneurs en différents composés des eaux-de-vie (Essais 2014).

Conclusion

Les vins destinés à l'élaboration d'eaux-de-vie qualitatives doivent répondre à des exigences analytiques très strictes. Pour cela, la levure doit avoir des caractéristiques métaboliques très précises. Dans le but d'obtenir une levure spécifique, la technique du Breeding apparaît aujourd'hui comme une avancée technologique intéressante. Dans cet article, nous avons pu mettre en évidence que cette technique génétique a permis de conférer à la souche Fermol® Spirit des qualités aromatiques intéressantes, une capacité à produire en faible quantité des alcools supérieurs, de l'éthanal et de l'acétate d'éthyle, tant sur les vins que sur les eaux-de-vie. L'ensemble des résultats analytiques obtenus sur le millésime 2014 confirme ces caractéristiques métaboliques. De plus, nous avons constaté que sur le plan technologique, la souche a une phase de latence extrêmement courte et une cinétique fermentaire rapide par rapport aux autres souches utilisées comme témoin. Pour faire suite aux essais « grands volumes » menés en 2014, l'intégralité des eaux-de-vie vont être dégustées par un jury d'experts afin de constater si leurs profils sensoriels sont en adéquation avec les objectifs produits définis par les metteurs en marché.

Suite à l'ensemble de ces très bons résultats analytiques obtenus en Grande Champagne, Petite Champagne, Fins Bois et Bons Bois, nous allons solliciter la station viticole du B.N.I.C. ainsi que des grandes maisons de Cognac pour réaliser un suivi qualitatif de la souche sur les prochains millésimes. En effet, il est nécessaire de valider le comportement de la levure sur plusieurs millésimes dans le but de la confronter à des qualités différentes de raisins.

Pour le millésime 2015, en collaboration avec la Station Œnologique de Saintonge, le groupe AEB va poursuivre ses investigations dans le but d'obtenir des informations technologiques complémentaires sur la souche Fermol® Spirit.