

# Modulation des Notes Aromatiques des Calvados : MoNArC

## Partie 2 – Produire un cidre de distillation pour une eau-de-vie fruitée

Projet financé grâce à des fonds : Région Normandie, FEDER, IDAC et UNICID  
Partenaires : LABEO, Université de Caen Normandie

### Contexte & Objectif

Cet article fait suite à l'article paru en novembre 2020 (Modulation des Notes Aromatiques des Calvados : MoNArC - Partie 1 : Caractéristiques sensorielles - Comportement des composés volatils à la distillation, revue Pomme à cidre, n°52). Ce programme de recherche s'inscrit dans un contexte de marché régressant, avec un besoin de redynamiser cette filière et d'adapter le produit à des changements de type de consommation. Les volumes de ventes sont notamment très importants pour des eaux-de-vie jeunes avec une attente des consommateurs pour des eaux-de-vie peu boisées, très fruitées.

Afin de répondre à ces challenges, le projet MoNArC a été construit afin de diversifier l'offre actuelle, en organisant les expérimentations selon le schéma suivant :

- i) définir clairement la cible à atteindre d'un point de vue sensoriel et physico-chimique,
- ii) déterminer la part du procédé de distillation dans la qualité du produit sorti d'alambic,
- iii) caractériser les cidres de distillation et les évolutions subies lors de la fermentation suivant les modalités de fabrication actuelles,
- iv) expérimenter des solutions technologiques afin d'obtenir des produits les plus fruités possible et en conservant cette caractéristique au cours du temps.

Le projet MoNArC a débuté en 2017 pour une durée de 4 ans. La partie 2 présentée ici, concernera le quatrième point cité ci-dessus. Cet aspect du projet, concernant l'augmentation du fruité final des eaux-de-vie, est conçu en considérant l'étape de fermentation comme étant le point clé, permettant d'obtenir des cidres à distiller plus fruités, conduisant par conséquent à des eaux-de-vie plus fruitées.



Figure 1 : Système de fermentation en conditions contrôlées de l'IFPC.

L'hypothèse sous-jacente réside dans le fait que le potentiel de gain aromatique est le plus important au niveau de la fermentation puisque celle-ci est réalisée par des micro-organismes dont certains sont producteurs de composés volatils impactant l'arôme du produit.

Le projet se focalise sur les principaux composés en lien avec les perceptions fruitées rencontrées dans les cidres (Figure 2). Ainsi, l'étude porte essentiellement sur les paramètres fermentaires susceptibles de jouer sur les esters d'acétate et leurs précurseurs, les alcools supérieurs.

Au cours de ce projet, nous nous sommes focalisés sur deux levures cidricoles intéressantes du fait de leur aptitude à générer des composés d'arômes fruités. En premier lieu, nous présenterons la souche *Hanseniaspora valbyensis*, se développant au début de la fabrication du cidre. Ensuite, nous avons étudié les aptitudes de la souche *Saccharomyces uvarum* impliquée dans la fermentation principale. La souche utilisée dans cette étude, est une souche cidricole, isolée et caractérisée par l'INRAE et l'IFPC. Enfin, nous aborderons des fermentations réalisées en associant ces deux souches.

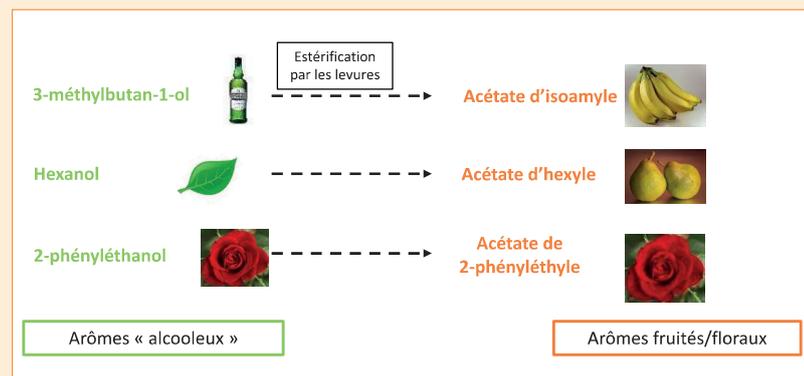


Figure 2 : Les principaux composés volatils suivis dans l'étude.

## Impact de la souche *Hanseniaspora valbyensis* 107 (Hv107)

La levure Hv107 est une souche dite apiculée qui se développe en tout début de fermentation. Son intérêt réside dans sa forte capacité estérifiante conduisant à de grandes quantités d'esters dans les produits. Il est à noter que cette levure nécessite peu d'azote dans le moût pour se développer (environ 60 mg/l suffisent largement) et qu'elle ne conduit généralement pas la fermentation principale. Cette levure ne se développe plus à partir de concentrations en éthanol de l'ordre de 6 % vol d'alcool (données non présentées).

Il s'agissait dans notre étude d'acquérir des données sur les profils de génération de composés volatils suite à une inoculation initiale de *Hanseniaspora valbyensis* 107 en mono-souche.

### 1) Génération d'esters d'acétate

Comme le montre la Figure 3, cette levure est capable de générer des quantités importantes d'acétate d'hexyle (environ 1 mg/l) et d'acétate d'isoamyle (environ 3 mg/l), respectivement responsables des odeurs de poire et de banane. Ce résultat confirme le caractère estérifiant de Hv107. En revanche, nous avons

observé une formation très faible d'acétate de 2-phényléthyle lorsqu'elle est inoculée en début de fermentation. Ceci s'explique par la très faible concentration en précurseur (le 2-phényléthanol) dans le moût en début de fermentation.

Afin de vérifier sa capacité à générer cet ester, nous avons supplémenté le moût en 2-phényléthanol (Figure 4). Dès l'apport du précurseur et quelque soit le moment d'apport, cette souche génère de l'acétate de 2-phényléthyle en quantité importante (> 30 mg/l).

Dans une fermentation cidricole classique, Hv107 se développe en tout début de processus et se trouve donc en absence de 2-phényléthanol. Dans ces conditions, elle n'a donc pas la capacité à générer l'acétate de 2-phényléthyle en quantité importante.

Il est à noter également que du fait de cette aptitude à former des esters d'acétate, Hv107 produit également de l'acétate d'éthyle (odeur solvant) et ce d'autant plus en présence d'oxygène.

Il est donc important de maîtriser cet aspect afin de limiter ce composé non recherché. En absence d'oxygène, Hv107 génère environ

30 mg/l d'acétate d'éthyle tandis que cette quantité peut être supérieure à 70 mg/l en présence d'oxygène.

### 2) Ensemencement d'Hv107 en fin de fermentation

Aux vues des constatations précédentes, il est apparu intéressant de tester l'utilisation de Hv107 en fin de fermentation après l'utilisation de *Saccharomyces*, susceptible de générer le précurseur. Ainsi, un cidre fermenté initialement avec la souche *Saccharomyces uvarum* Su200 est microfiltré puis ensemencé avec la souche Hv107 à différentes masses volumiques : 1015, 1010, 1005 et 1000 kg/m<sup>3</sup> afin de déterminer les évolutions en termes d'arômes, en fin de fermentation (Figure 5).

Les résultats montrent deux comportements très différents de la souche Hv107. Cette souche a une forte capacité estérifiante pour le 2-phényléthanol, conduisant à une formation conséquente d'acétate de 2-phényléthyle. Cependant, cette génération n'a pas eu lieu lorsque la souche a été apportée à des masses volumiques inférieures à

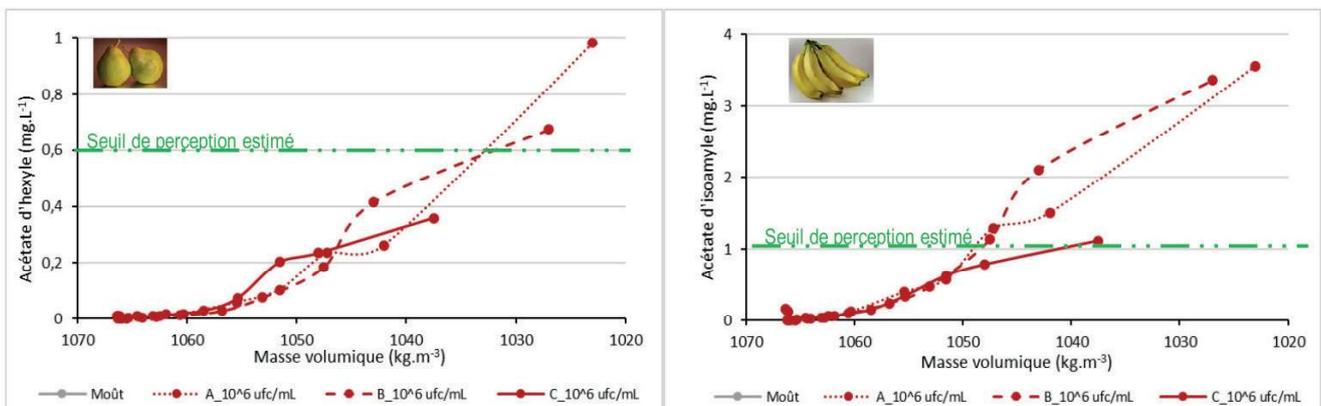


Figure 3 : Génération de deux esters d'acétate par *Hanseniaspora valbyensis*, en cours de fermentation.

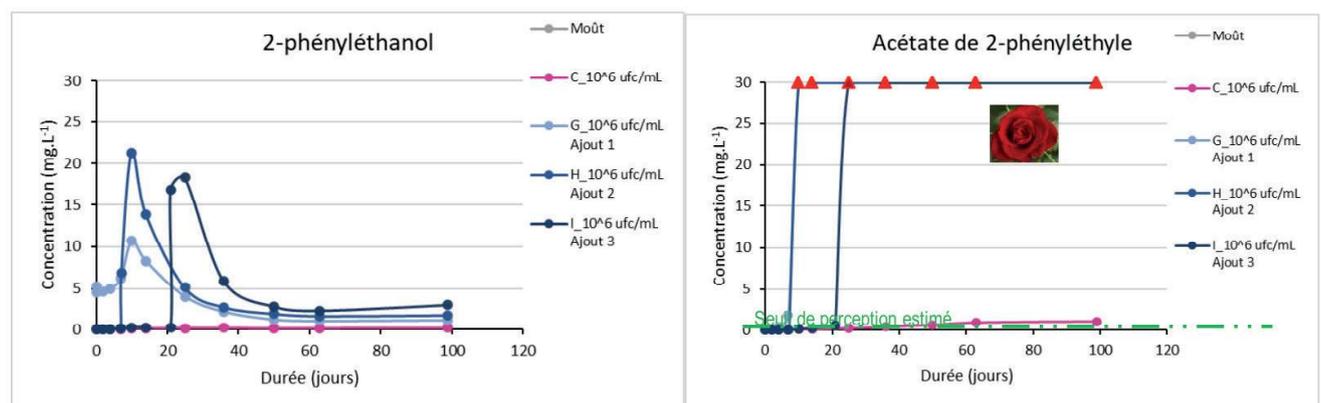


Figure 4 : Génération d'acétate de 2-phényléthyle par *Hanseniaspora valbyensis* en cours de fermentation en fonction du moment d'ajout de son précurseur, le 2-phényléthanol.

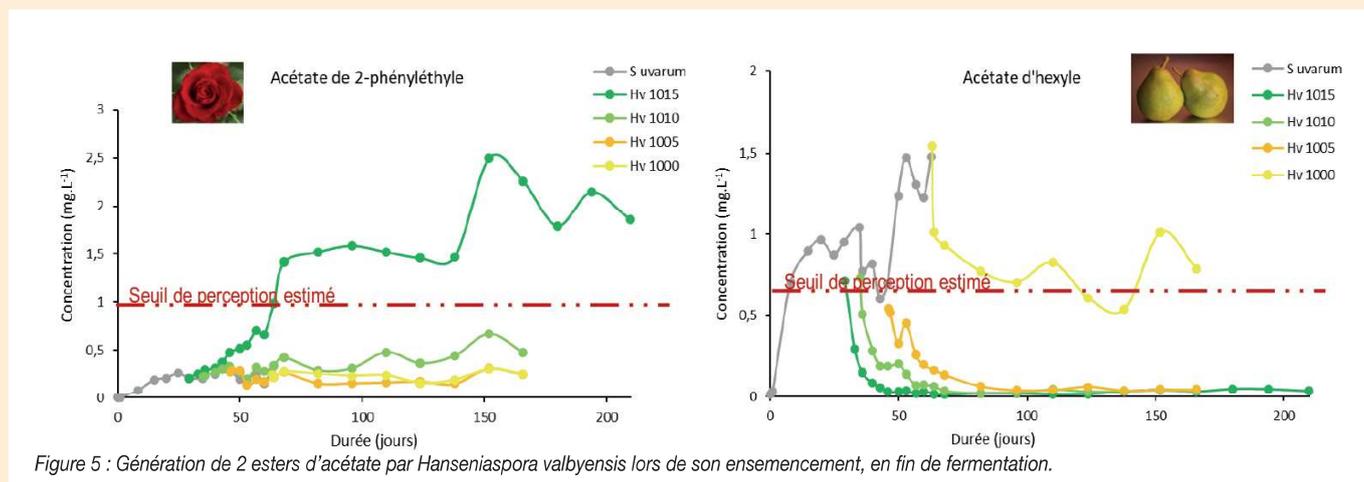


Figure 5 : Génération de 2 esters d'acétate par *Hanseniaspora valbyensis* lors de son ensemencement, en fin de fermentation.

1010 kg/m<sup>3</sup>. Ce comportement est dû à la sensibilité de cette souche vis-à-vis de l'alcool, celle-ci ne se développant plus au-delà de 6 % vol d'alcool, ce qui était le cas pour les masses volumiques inférieures citées. Cependant, ajoutée suffisamment tôt, elle est capable de générer des doses supérieures à 1,5 mg/l d'acétate de 2-phényléthyle, au-dessus du seuil de perception.

Il est également important de noter qu'elle catabolise l'acétate d'hexyle dans quasiment tous les cas et de façon très rapide suite à son inoculation. Seule une inoculation lors de l'arrivée à sec (1000 kg/m<sup>3</sup>), n'engendre pas de dégradation de cet ester, probablement du fait de l'inactivation de la levure. Cette dégradation est en contradiction avec les observations précédentes, montrant une

génération d'acétate d'hexyle en début de fermentation. On émet l'hypothèse de l'utilisation de l'hexanol présent dans le moût par Hv107 dans le but de « détoxifier » le milieu, cet alcool semblant gêner le développement des levures.

Cette souche permet donc de moduler le profil aromatique des produits et ce, en fonction du moment d'ensemencement.

## Impact de la souche *Saccharomyces uvarum* (Su200)

Cette étude nous a permis d'acquérir des données sur l'évolution des composés volatils au cours et après fermentation complète par *Saccharomyces uvarum*, en conditions contrôlées. La phase de fin de fermentation (masse volumique inférieure à 1010 kg/m<sup>3</sup>) est peu étudiée, et les professionnels observent souvent une perte du fruité lors de cette phase de conservation.

### 1) Génération de composés volatils par *Saccharomyces uvarum*

Une fermentation totale en monosouche a été réalisée, à 10 °C, par *Saccharomyces uvarum* 200 (Su 200) inoculée à 1.10<sup>6</sup> ufc/ml. Les composés volatils ont été analysés au cours de la phase de la fermentation et de la phase de conservation. Les analyses ont porté sur six molécules.

Les analyses ont montré que le 2-phényléthanol, le 3-méthylbutan-1-ol, l'acétate de 2-phényléthyle et l'acétate d'isoamyle étaient générés tout au long de la phase de fermentation (Tableau 1). L'hexanol était présent dans le moût initial et sa concentration diminuait dès le début de la fermentation pour atteindre une valeur stable de 3 mg/l. L'accumulation d'acétate d'hexyle a été observée de manière plus précoce par rapport aux autres esters d'acétate. Ces premiers travaux ont permis de mettre en évidence que l'accumulation de 3-méthylbutanol, 2-phényléthanol ainsi

TABLEAU 1 : Concentrations des composés volatils à différentes étapes de la fermentation monosouche réalisée par Su200 et lors de la conservation post-fermentaire

| Composé volatil           | Concentration (mg/L) |           |                       |
|---------------------------|----------------------|-----------|-----------------------|
|                           | Initial (moût)       | Fin de FA | Conservation (3 mois) |
| 3-méthylbutanol           | 0                    | 55-70     | 55-70                 |
| 2-phényléthanol           | 0                    | 55        | 80                    |
| Hexanol                   | 14                   | 3         | 3                     |
| Acétate d'isoamyle        | 0                    | 2         | 1,3                   |
| Acétate de 2-phényléthyle | 0                    | 0,4       | 0,4                   |
| Acétate d'hexyle          | 0                    | 1,9       | 1,4                   |
| Butyrate d'éthyle         | 1,6                  | 0,4       | 0,4                   |
| Hexanoate d'éthyle        | 0                    | 1,2       |                       |
| Octanoate d'éthyle        | 0                    | 4         |                       |
| Décanoate d'éthyle        | 0                    | 2         |                       |

que leurs acétates semblait se dérouler en parallèle de la fermentation, c'est-à-dire de manière concomitante avec la consommation des ressources carbonées.

La conservation post-fermentaire en conditions contrôlées n'a pas induit de pertes drastiques de composés volatils qui auraient pu justifier la perte de fruité observée par les professionnels. En effet, la phase de conservation n'a pas montré d'impact sur la teneur des trois alcools supérieurs étudiés. Une perte en esters d'acétate, de 5 à 45 %

selon les composés, a été observée due à une dégradation chimique naturelle et/ou à du dégagement dans la phase gazeuse. En conditions non contrôlées, l'origine de cette perte serait principalement due à une origine microbologique, notamment une dégradation des esters d'acétate par *Brettanomyces anomala*.

### 2) Effet de la supplémentation en azote sur la génération des arômes

La génération des arômes par les levures

dépend de leur nutrition. L'élément principal influençant les levures est la quantité et le type d'azote disponible. Nous avons donc travaillé sur l'optimisation du potentiel aromatique de notre souche Su200 en comparaison à une souche de *Saccharomyces cerevisiae* (Sc-B), dans le contexte cidricole. Les compléments nutritionnels testés sont : Fermaid K, Fermaid C et Fermaid C nature ; ajoutés en fin de croissance des levures (moment optimum d'action) à une concentration de 40 g/hL, et en comparaison à un témoin non supplémenté.

Dans les conditions de l'expérimentation, la

souche cidricole Su200 montre de meilleures aptitudes à générer du 3-méthylbutan-1-ol et de l'acétate d'isoamyle dès lors qu'une supplémentation est apportée (Figure 6) avec un gain de 25 % environ pour l'alcool et à plus de 100 % pour l'ester.

L'effet souche est encore plus marqué pour le couple 2-phényléthanol/acétate de 2-phényléthyle (Figure 7). En effet, un facteur 12 est observé entre les doses de 2-phényléthanol produites par les levures des modalités témoins (5 mg/l pour ScB contre 62 mg/l pour Su200). Ce facteur est de 25 pour l'acétate correspondant (0,02 mg/l pour ScB contre

0,5 mg/l pour Su200). En revanche, l'ajout des compléments nutritionnels a induit une répression de la génération de 2-phényléthanol, principalement pour les compléments C et K, dans le cas de la souche Su200. Les teneurs finales en présence de ces deux compléments (environ 28 mg/l), sont, en effet, 2 fois plus faibles que pour le témoin (62 mg/l). En ce qui concerne l'acétate de 2-phényléthyle, l'ajout des compléments C et C nature ne semble induire qu'une augmentation minime de sa teneur finale (environ 0,6 mg/l), par rapport au témoin et au complément K (environ 0,5 mg/l).

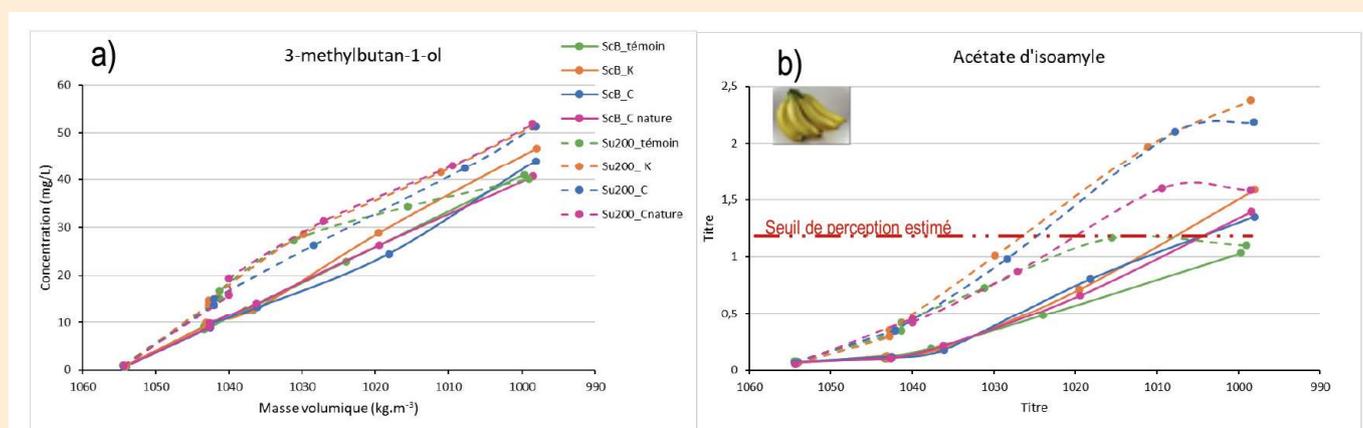


Figure 6 : Evolution des teneurs en 3-méthylbutan-1-ol (a) et en acétate d'isoamyle (b) produits par ScB et Su200.

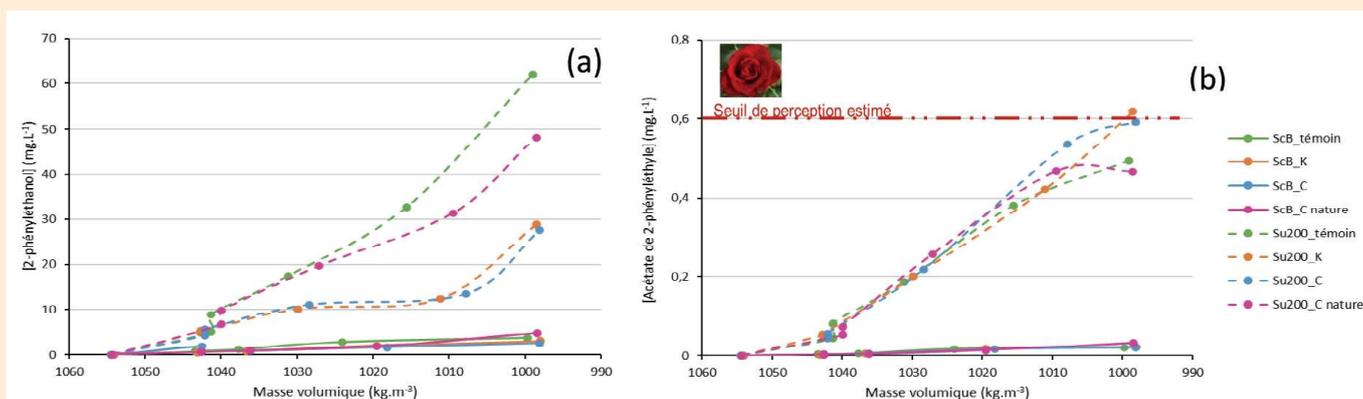


Figure 7 : Evolution des teneurs en 2-phényléthanol (a) et en acétate de 2-phényléthyle (b) produits par ScB et Su200.

## Impact de *Hanseniaspora valbyensis* (Hv107) et *Saccharomyces uvarum* (Su200) en succession de souches ou en souches mixtes

Les levures de type *Saccharomyces uvarum* (souche Su200) et *Hanseniaspora valbyensis* (souche Hv107) ont montré des profils fermentaires et aromatiques différents. Dans nos conditions, la levure Su200 peut mener une fermentation à sec, contrairement à la levure Hv107. Lors de précédents essais, la levure Su200 a généré des concentrations

intéressantes en alcools supérieurs, en acétate d'isoamyle et en acétate d'hexyle. La population d'Hv107 a produit, quant à elle, des quantités d'acétate de 2-phényléthyle quatre fois supérieures à celles de Su200, et a dégradé l'acétate d'hexyle. Lors de l'inoculation d'Hv107 après fermentation par Su200, la carence en sucres n'a pas été atteinte, et

l'acétate d'hexyle généré par Su200 a été dégradé.

Il s'agissait donc d'évaluer d'autres stratégies d'inoculation de microorganismes, avec pour objectifs de mener la fermentation à sec, et de maximiser le potentiel aromatique fruité, voire de proposer des itinéraires permettant de générer des profils aromatiques différents.

Cinq modalités ont été testées :

- Une co-inoculation dans le moût : il s'agissait d'évaluer la capacité des deux souches à générer des composés d'intérêt dans un milieu compétitif.
- Une succession de flores (séquentiel Hv + Su) : l'objectif était d'évaluer la possibilité d'obtenir dans un premier temps de l'acétate de 2-phényléthyle et de l'acétate d'isoamyle avec Hv107. L'inoculation de Su200 doit permettre ensuite de générer de l'acétate d'hexyle et de mener la fermentation à terme.
- La troisième stratégie consistait à mélanger deux cidres, l'un ayant été fermenté par Su200, l'autre par Hv107. Il s'agissait d'évaluer si les composés volatils générés par chacune des souches dans un milieu non compétitif pouvaient être conservés et permettaient de maximiser le fruité des cidres en utilisant aussi ensuite les précur-

seurs potentiels générés par l'autre. Cette stratégie a été testée de deux manières, en laissant Hv107 dans le milieu (Mélange Hv + Su), ou en l'éliminant (Mélange Hv (MFT) + Su) afin d'évaluer son impact sur l'acétate d'hexyle.

Les courbes présentées en *Figure 8* permettent de faire ressortir les itinéraires technologiques conduisant à de fortes quantités d'esters d'acétate.

En premier lieu, on peut constater que la levure Su200 produit des quantités importantes de 3-méthylbutan-1-ol et le 2-phényléthanol, tout au long de la fermentation. En effet, les teneurs sont respectivement entre 1,5 et 8 fois supérieures que dans les autres modalités. D'autre part, cette souche produit également des quantités très intéressantes d'acétate d'hexyle (1,8 mg/l en monosouche et 1,6 mg/l en mélange en éliminant Hv107). Ceci confirme la dégradation de ce composé

lorsque Hv107 est utilisée en fin de fermentation.

En ce qui concerne l'acétate d'isoamyle, on note principalement que la co-inoculation initiale est défavorable à la génération de ce composé. Les teneurs en acétate d'isoamyle sont 1,5 à 2,5 fois supérieures dans les autres modalités, l'inoculation séquentielle étant la plus favorable (3,3 mg/l).

Cependant, les teneurs les plus élevées en acétate de 2-phényléthyle sont observées lorsque Hv107 est utilisée dans le cidre en deuxième partie d'expérimentation : itinéraire séquentiel Hv107 puis Su200 et en mélange Hv107 (avec ou sans microfiltration) + Su200. Cette souche a déjà montré une forte capacité à générer de l'acétate de 2-phényléthyle lors de précédents essais lorsque le 2-phényléthanol, produit par Su200, était présent dans le milieu.

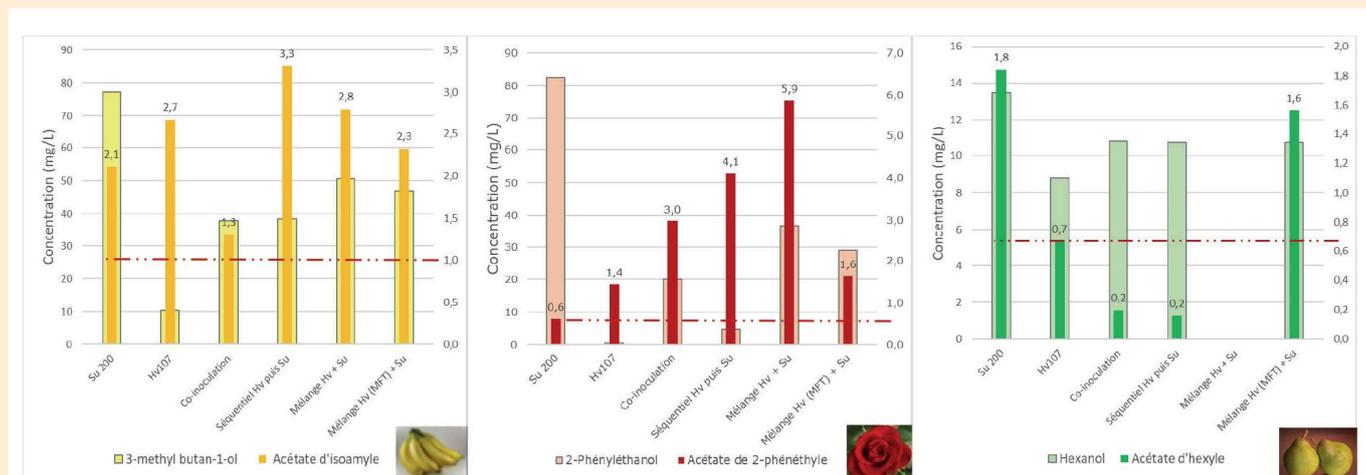


Figure 8 : Quantité d'alcools et d'esters générés en fonction des itinéraires technologiques choisis (monosouches Su200 et Hv107 ; co-inoculation ; inoculation séquentielle ; mélanges de souches avec élimination ou non de Hv107) ; en pointillé rouge : seuil de perception estimé de l'ester.

## Conclusion et perspectives

Cette étude a permis de montrer l'importance de deux souches de levures cidricoles pour la formation d'esters d'acétate nécessaires aux caractéristiques fruitées des cidres. Ces deux souches sont naturellement présentes dans le cidre. Cependant, il est possible de jouer sur les caractéristiques du milieu pour moduler la génération des esters. De plus, l'obtention de souches commerciales permettrait de jouer sur leur stratégie d'utilisation pour moduler le profil aromatique recherché.

D'un point de vue aromatique, il semble plus intéressant de favoriser le mélange de produits partiellement fermentés en flore pure, ou encore l'inoculation séquentielle des souches. Ces deux stratégies se sont en effet révélées les plus intéressantes en termes de quantités d'esters produits. L'utilisation de Su200 seule permet également de typer les produits.

D'un point de vue technique, la maîtrise de la teneur en oxygène est un point clé dans le cadre de l'utilisation de la souche Hv107.

Auteurs :  
Hugues Guichard, Pascal Poupard (IFPC)