

Diagnostic sur les odeurs animales

Suivi de l'évolution des phénols volatils au cours de l'élaboration et de la conservation des cidres non pasteurisés

Depuis 2008, un projet visant à mieux maîtriser le problème des odeurs animales en cidrerie est engagé entre l'IFPC, l'INRA URC, les conseillers cidricoles et le Laboratoire Départemental Frank Duncombe - Conseil Général du Calvados. Ce projet coordonné par l'IFPC est décliné dans les Régions Bretagne, Pays de la Loire, Basse-Normandie et Haute-Normandie, au travers des CPER de Basse-Normandie, Haute-Normandie

Contexte filière

Actuellement, un certain nombre de retours en provenance d'amateurs techniques de la filière ou d'élaborateurs de cidre font état de la présence en quantité significative de produits présentant des odeurs dites "animales". Déjà, en 2003, le travail de caractérisation des cidres réalisé par l'IFPC et l'INRA URC avait mis en évidence, aussi bien sur le plan organoleptique que sur le plan analytique, qu'un nombre important de cidres présentait des notes "animales". Qualitativement, cette caractéristique avait été jugée très importante car les produits qualifiés par ces arômes étaient dans le même temps les moins fruités, alors que ce caractère est plutôt recherché par les élaborateurs afin de répondre à l'attente a priori majoritaire des consommateurs. S'il peut encore exister en très faible quantité, et dans certains types de produits, il existe un consensus pour affirmer qu'en concentration importante elles induisent un réel problème or-

Origine des odeurs animales

Les composés responsables de ces odeurs "animales" sont connus pour partie depuis longtemps, d'autant plus qu'ils sont également présents dans d'autres produits fermentés : le 4-vinylgâicol, le 4-éthylgâicol, le 4-vinylphénol, le 4-éthylphénol, et plus récemment le 4-éthylcatéchol qui se caractérise par une odeur camphrée, fumée. Les composés majoritaires dans les cidres à la consommation sont surtout les éthylphénols.

Les précurseurs de ces molécules sont les acides hydroxycinnamiques qui représentent 50 % de la famille des composés phénoliques du moût de pomme dont la quantité peut varier d'un facteur 1 à 5 entre Avrolles et Kermerrien (source INRA URC). Leur transformation nécessite l'action d'enzymes et de microorganismes, dont notamment la fameuse levure de contamination *Brettanomyces*.

Pour plus de précisions vous pouvez vous reporter au cahier technique de l'IFPC de la revue Pomme à cidre n°17 qui détaille les mécanismes impliqués.

et Pays de la Loire (financement par les Régions et FranceAgriMer).

Cet article présente les résultats de la première étape du projet dont l'objectif était d'identifier la cinétique d'apparition des différents phénols volatils dans les cidres, de façon à définir les étapes technologiques critiques, pour ensuite envisager des actions préventives au cours de l'élaboration.

ganoleptique : odeurs de gouache, pharmacie, cuir, suint de cheval, lisier...

Or actuellement aucun moyen n'existe pour maîtriser quantitativement la génération de ces composés aromatiques. L'objectif technique poursuivi est donc de limiter au maximum ces odeurs animales dans les produits.

Ce défaut touche peu les produits industriels et concerne en général les cidres non pasteurisés. Même si ces derniers produits ne représentent qu'une minorité des volumes ils contribuent fortement à l'image du cidre.

Les eaux-de-vie sont également concernées car les phénols volatils sont entraînés dans les vapeurs lors de la distillation, comme l'ont montré des travaux menés par l'IDAC sur la composition et la qualité des Calvados.

Le projet inter-régional mis en place et coordonné par l'IFPC est décliné en 3 parties :

1. Bilan des cinétiques d'apparition des phénols volatils lors de l'élaboration des cidres ;
2. Comparaison et validation de méthodes prédictives du risque d'apparition des phénols volatils à l'embouteillage ;
3. Essai et validation de techniques de nettoyage/désinfection des matériels liés aux étapes d'embouteillage (saturateur, tireuse).

Travail réalisé sur les suivis d'apparition des phénols volatils

Différents suivis ont été réalisés depuis 2008 en cidrerie artisanale et fermière.

Un suivi analytique du moût en sortie de presse jusqu'à l'assemblage pour la mise en bouteille a été mis en place sur 12 cuvées en Basse Normandie sur 2008-2009.

L'évolution post-embouteillage (6, 12 et 18 mois) a été étudiée sur 26 produits issus de l'ensemble des 4 régions cidricoles impliquées par le projet. La conservation a été réalisée à 10° C et 20° C

pour évaluer un éventuel effet de la température de stockage des bouteilles sur la teneur en phénols volatils.

Par souci d'harmoniser les résultats d'analyse, l'ensemble des dosages des phénols volatils a été confié à un même organisme partenaire, le Laboratoire Départemental du Calvados Frank Duncombe (LDFD 14).

L'équipe de Valérie Kientz-Bouchart, Responsable R&D du Département Environnement-Alimentation du LDFD 14 a ainsi développé depuis de nombreuses années une technique de dosage des phénols volatils dans les cidres et eaux-de-vie. Cette méthode fait appel à la chromatographie en phase liquide (HPLC) avec un détecteur UV-DAD permettant de séparer, de quantifier et de confirmer l'identité des molécules identifiées par l'acquisition d'un spectre UV caractéristique. La méthode développée permet de doser ces composés dans des limites de concentration intéressantes à savoir 0,25mg/L pour le 4-éthylcatéchol et 0,10 mg/L pour les autres molécules.

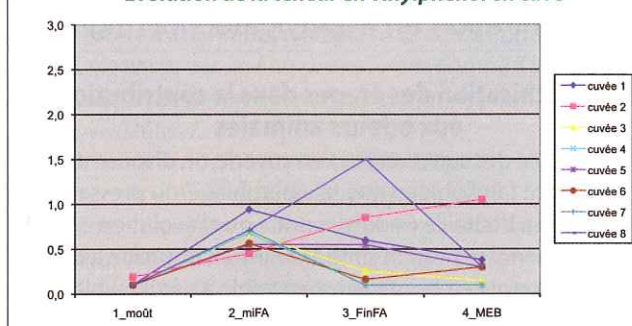
Résultats du suivi en cuverie

Par souci de simplification on ne s'intéressera qu'au 4-vinylphénol et 4-éthylphénol. Ces deux phénols volatils sont étudiés ensemble car le 4-vinylphénol est le précurseur du 4-éthylphénol. Pour le couple 4-éthyl/4-vinylgâicol, on observe les mêmes évolutions que pour le couple précédent, avec des concentrations observées plus faibles d'un facteur 2.

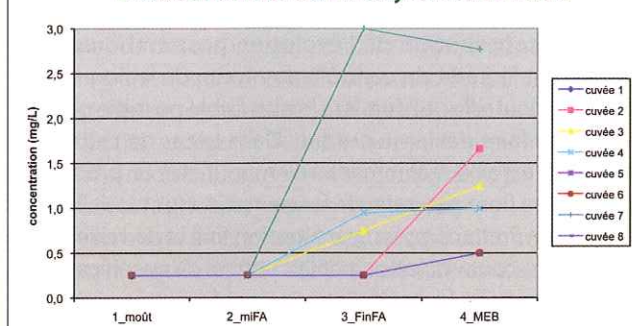
Les résultats des dosages sont repris dans les graphiques suivants. Ils permettent de suivre l'évolution dans le temps, en fonction des dates de prélèvement, l'évolution des deux phénols volatils analysés.

Pour chaque lot, le premier point représente le stade moût, le second le stade mi-fermentation, le troisième le stade fin de fermentation et enfin le dernier la mise en bouteille. Pour les points correspondant à la mise en bouteille, ne sont figurés que ceux liés à des lots pour lesquels il n'y a pas eu d'assemblage, car dans le cas contraire, il y a une discontinuité dans le produit suivi.

Evolution de la teneur en vinylphénol en cuve



Evolution de la teneur en éthylcatéchol en cuve

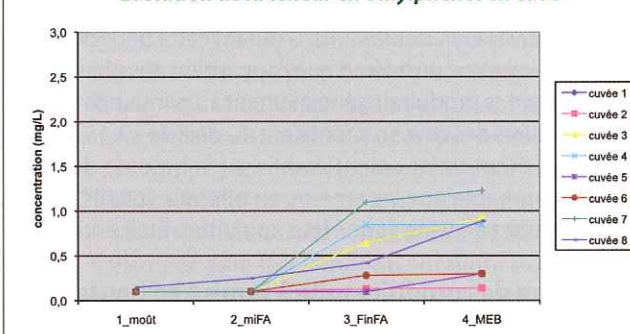


La première constatation est qu'il n'y a pas de phénols volatils dans le moût de pomme en sortie de presse. Ensuite, dans tous les lots étudiés, les quantités de vinylphénols augmentent du stade moût jusqu'au stade de mi-fermentation alcoolique. Les teneurs relevées sont de l'ordre de 0,5 à 1 mg/L. Ensuite, du stade mi-fermentation alcoolique au stade fin de fermentation alcoolique les évolutions diffèrent : certains lots voient leur teneur continuer à augmenter ou à se stabiliser et d'autres lots voient leur teneur diminuer.

Si on observe l'évolution des teneurs en éthylphénols, on ne constate aucune évolution sensible entre le stade moût et le stade mi-fermentation alcoolique. C'est dans la seconde partie de la fermentation que l'on observe une augmentation des teneurs en éthylphénols plus ou moins rapide suivant les lots. Dans les cas où il y a évolution, les teneurs en fin de fermentation vont de 0,25 à plus de 1 mg/L d'éthylphénols.

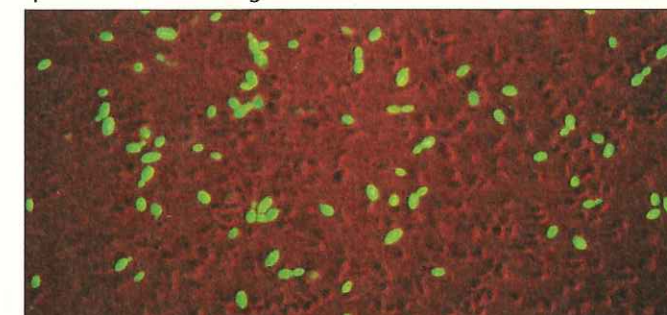
Le 4-éthylcatéchol suit une évolution similaire au 4-éthylphénol avec des concentrations pouvant être plus importantes.

Evolution de la teneur en éthylphénol en cuve



A la lumière de l'abondante littérature sur les phénols volatils, il est possible d'expliquer les phénomènes observés.

Tout d'abord, la production de vinylphénols démontre la présence dans le milieu de son précurseur : l'acide p-coumarique qui est un acide phénolique libre. Or cet acide phénolique libre n'existe pas à l'état naturel dans le fruit sain, seules les formes estérifiées existent dans la pomme. Le passage de la forme estérifiée à la forme libre résulte d'une (ou de plusieurs) activité(s) de déstérification d'origine fongique. Des travaux antérieurs réalisés par l'INRA URC avaient montré que les pommes altérées apportent bien cette activité enzymatique. On conseille également d'utiliser des préparations enzymatiques (par exemple pour clarifier les moûts) qui soient purifiées et présentent la mention FCE (Free Cinnamyl Esterase), c'est à dire dépourvue de l'activité qui libère les acides hydroxycinnamiques pouvant donner lieu ensuite à l'apparition de phénols volatils. Cette purification est liée au fait que les préparations enzymatiques sont extraites de moisissures qui sont dotées à l'origine de cette activité.



Brettanomyces en microscopie à épifluorescence (Photo IFV)

Ensuite, la production de vinylphénols à partir de son précurseur est réalisable par différents microorganismes. Outre *Brettanomyces*, certaines levures de fermentation sont parfaitement capables de produire des vinylphénols. L'augmentation de la teneur en vinylphénols observée entre le stade moût et le stade mi-fermentation alcoolique est donc bien compatible avec l'activité de fermentation alcoolique observée lors de cette phase.

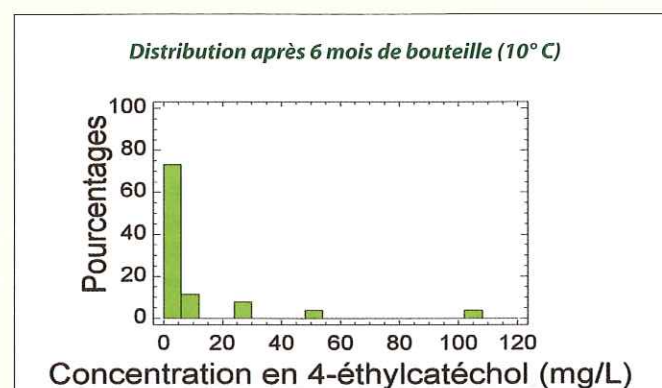
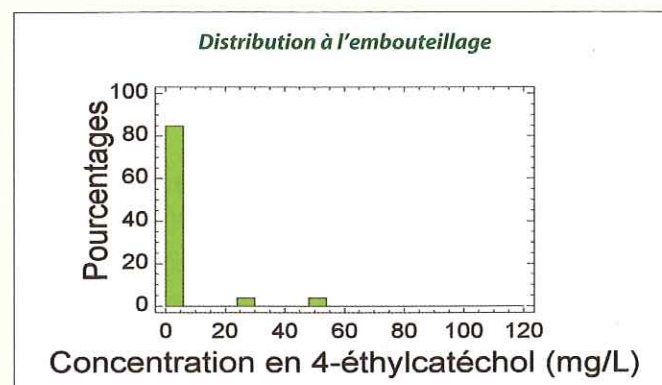
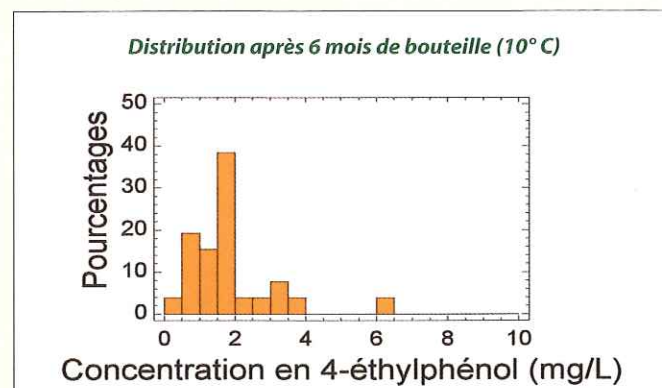
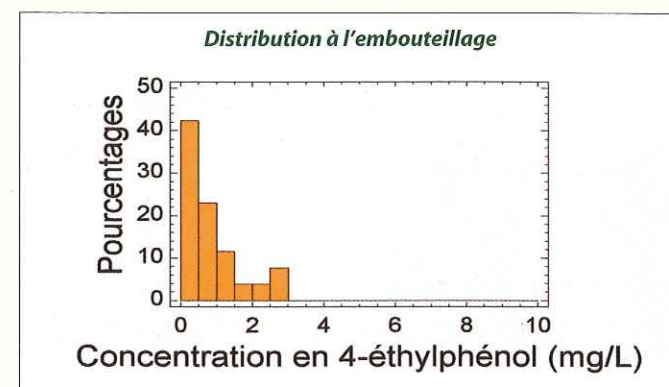
En cours de fermentation alcoolique, les différents types d'évolutions de la teneur en vinylphénols peuvent être expliqués par les valeurs relatives des vitesses de synthèse et de consommation des vinylphénols. Dans la majorité des cuvées on observe d'ailleurs une bonne corrélation entre diminution de la teneur en vinylphénols et augmentation de la teneur en éthylphénols. La levure *Brettanomyces* est capable de réaliser cette réaction de réduction, il est donc raisonnable de suspecter la présence de *Brettanomyces* dans les produits où une augmentation de la teneur en éthylphénols est observée.

Il est à noter que, d'après ces observations, la production d'éthylphénols, certes en très petite quantité, débute très rapidement (de novembre à février) alors qu'en général les températures des produits sont souvent inférieures à 10° C durant cette période. Avant ces observations, on considérait que l'apparition des phénols volatils en cuverie se produisait généralement au printemps lorsque les températures des cuves remontaient au-delà de 12-15° C. Mais ces constats étant uniquement établis sur la base de dégustations, il est probable que les teneurs en phénols volatils étaient en fait déjà assez élevées, et que leur apparition était antérieure.

Evolution des produits suite à la mise en bouteille

Les résultats disponibles actuellement portent sur le suivi de 26 produits jusqu'à 6 mois de bouteille. La comparaison des histogrammes de fréquence à l'embouteillage et après 6 mois de mise en bouteille à une température de 10° C montre une augmentation de la teneur en 4-éthylphénol et en 4-éthylcatéchol. La teneur moyenne en 4-éthylphénol passe de 0,82mg/L à 1,81mg/L soit plus d'une multiplication par 2. L'ordre de grandeur de l'augmentation pour le 4-éthylcatéchol est similaire avec un passage de 4 à 10 mg/L. La part de produits avec plus de 1mg/L de 4-éthylphénol passe de 24 à 76 %.

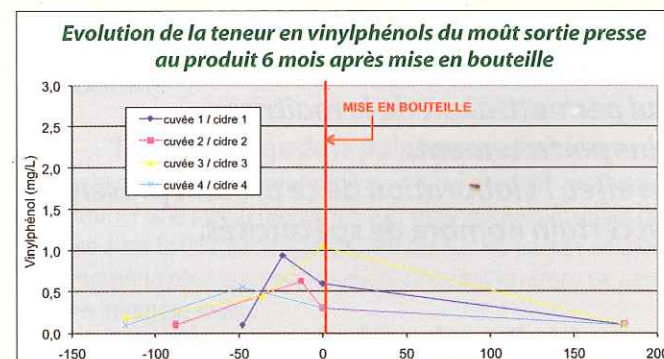
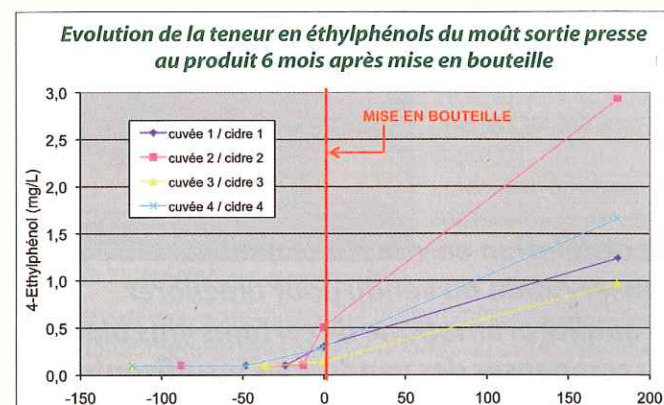
Les données obtenues à 6 mois de bouteille à une température de 20° C montrent une concentration moyenne en 4-éthylphénol de 2,38mg/L au lieu 1,81mg/L à 10° C soit environ 30 % de plus. L'intérêt d'une conservation à basse température est donc évident. Il est à noter que les produits présentant de fortes teneurs en 4-éthylcatéchol (> 40mg/L) ont été jugés comme présentant une odeur et un goût de "fumé" très important, désagréable, et persistant en bouche.



Hiérarchisation des étapes dans la contribution aux odeurs animales

Sur l'ensemble des suivis réalisés en cuverie, on dispose de 4 cuvées qui n'ont fait l'objet d'aucun assemblage, du pressage jusqu'à la mise en bouteille. Ce suivi montre que l'évolution majeure du 4-éthylphénol se produit suite à la mise en bouteille, alors que sa quantité avant l'embouteillage est faible à négligeable. Cette observation est cohérente avec le fait que les cidres stabilisés par pasteurisation présentent très généralement de faibles teneurs en 4-éthylphénol, et en particulier chez les industriels équipés de cuverie à basse température.

Cette forte contribution de l'évolution post-embouteillage confirme tout l'intérêt du contrôle du niveau de la flore *Brettanomyces* en bouteille qui doit être le plus faible possible pour espérer ne pas faire dévier le produit. Dans le cas de cidres non pasteurisés, il est ainsi recommandé d'embouteiller un produit débarrassé de sa flore naturelle de fermentation (potentiellement contaminé en *Brettanomyces*) par filtration fine et de veiller à une absence de re-contamination par le matériel de gazéification et de mise en bouteille. L'intérêt d'utiliser des LSA plutôt que la flore naturelle pour effectuer la prise de mousse en bouteille est donc



un levier important pour limiter les risques d'apparition de phénols volatils, dans le cadre d'une application de règles rigoureuses d'hygiène.

Néanmoins il ne faut pas considérer que la vie du produit avant son embouteillage n'a pas de conséquence sur la teneur en phénols volatils. Effet, lors de l'élaboration du cidre en cuve, il y a production de vinylphénols. On crée donc un potentiel plus ou moins important qui sera transformé en éthylphénols si le produit est contaminé en *Brettanomyces*. La limitation de la production en vinylphénols n'est pas évidente car sa production est réalisée a priori par les levures de fermentation. Il convient donc de jouer sur le précurseur de ce phénol volatil, à savoir limiter les possibilités de désestérification enzymatique des acides phénoliques du moût. Cela passe par un état sanitaire des pommes irréprochable et l'utilisation de préparations enzymatiques pures, sans activité cinnamyl estérase.

Conclusion et perspectives

Les premiers résultats des suivis de phénols volatils en cidrerie fermière et artisanale mettent donc en évidence l'absence de phénols volatils en moût mais un développement de vinylphénols puis d'une production d'éthylphénols très fréquentes pendant la seconde phase de la fermentation.

L'apparition du 4-éthylphénol et du 4-éthylcatéchol peut se produire assez tôt dans la saison, alors que les températures sont pourtant peu élevées. Un état sanitaire irréprochable des pommes et une hygiène drastique en cidrerie restent donc une priorité. L'application de basses températures constitue un outil intéressant en prévention, mais doit être raisonnée en fonction des vitesses de fermentation souhaitées et des besoins d'appauvrir le milieu en éléments nutritifs et notamment azotés.

La mise en bouteille semble être une étape critique car pour certains lots la production d'éthylphénols est exclusivement postérieure à cette étape.

Ce bilan justifie donc pleinement l'intérêt de la suite du projet

qui traitera de la qualité des filtrations avant mise en bouteille et de l'hygiène du matériel d'embouteillage.

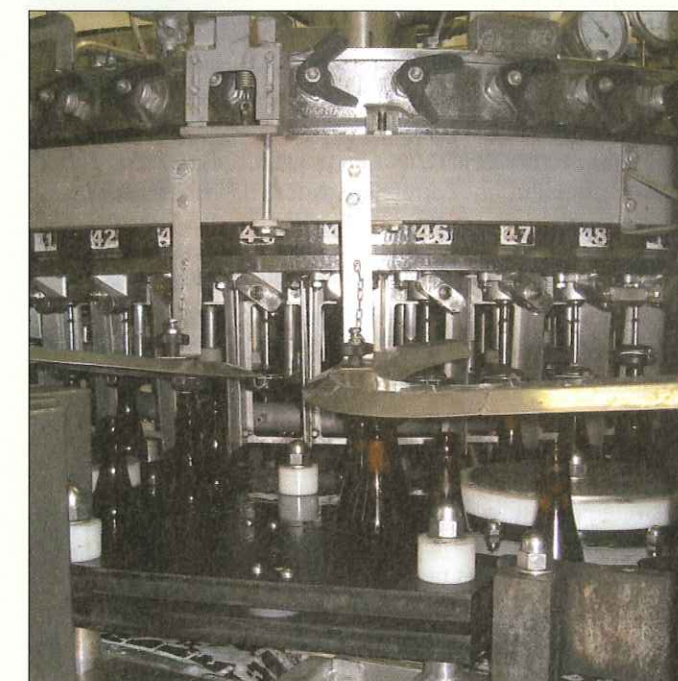
L'effet de la température de conservation des bouteilles sur la cinétique de production des phénols volatils est confirmé.

L'année 2011 doit également permettre de conclure sur l'intérêt de méthodes d'évaluation des risques d'apparition des phénols volatils en bouteille. Différentes techniques (tests commercialisés en œnologie, détection de *Brettanomyces* par PCR...) ont donc été appliquées lors des embouteillages des cidres des récoltes 2009, et les résultats seront corrélés ensuite aux évolutions des teneurs en phénols volatils constatés après 6 et 12 mois de bouteille. L'objectif est de fournir aux producteurs une méthode leur permettant d'estimer les risques avant embouteillage pour évaluer la qualité des traitements de finition par exemple, ou après embouteillage pour estimer les risques de déviations et envisager des priorités de consommation.

Parallèlement à cette étude, l'ARAC, les conseillers cidricoles et l'IFPC mènent un projet relatif à une évaluation des LSA commercialisées également dans le cadre des CPER des 4 régions cidricoles principales. L'objectif est d'aboutir à une évaluation des performances et intérêts de souches à la fois dans une application de type prise de mousse ou méthode mixte, mais également dans le cadre d'une reprise de fermentation en cuve. Parmi les nombreuses caractéristiques techniques des levures, leur capacité à produire des vinylphénols sera étudiée. En effet, certaines levures dites POF (Phenol Off Flavor), c'est-à-dire dépourvues d'activité cinnamyl décarboxylase, seraient potentiellement intéressantes dans la mesure où une fermentation conduite exclusivement avec ce type de levures permettrait d'éviter la production de vinylphénols. Les levures POF sont toutefois peu nombreuses, et leurs propriétés fermentaires et sensorielles inconnues en cidre ; il conviendra donc de les tester.

REMI BAUDUIN, YANN GILLES

Remerciements aux partenaires techniques du projet : Valérie Kientz-Bouchard (LDFD 14), Marina Desvigne (SPCFHN), Alain Le Page (CDA 22), François-Jan Raimbaud, Arnaud Didier (CRAN), Jean-Christophe Dechatre (ARAC), Jean-Michel Le Quéré (INRA).



Tireuse isobariométrique : un matériel sensible vis-à-vis des contaminations microbiennes.