



# MoNARC : MODULATION DES NOTES AROMATIQUES DES CALVADOS

## Dynamique des populations microbiennes dans le cidre de distillation



Source IDAC



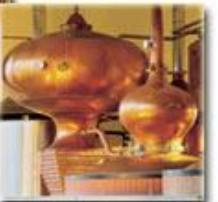
Normandie Université



UNICAEN  
UNIVERSITÉ  
CAEN  
NORMANDIE



Source IDAC



# Schéma d'analyse des cidres de distillation (campagne 2017)

- 1<sup>ère</sup> campagne d'échantillonnage
- 4 producteurs : A, B, C, D
- 6 cuves (A, B, C1, C2, D1, D2)

1L/semaine

Initiation de la fermentation (I)

Fin de fermentation alcoolique (F)

Fin de maturation (M)

## Analyses physico-chimiques

15 paramètres dont densité, sucres, alcools

## Approche métagénétique

- Extraction d'ADN
- Séquençage Illumina MiSeq-2x300bp
- V1-V3 (bactéries) / ITS1 (levures/moisissures)
- Analyses bio-informatiques (Frogs, Migale)

Cuves	Date d'initiation de la fermentation (I)	Durée de fermentation alcoolique (F)	Durée de la période de maturation (M)	Volume (hL)	Localisation
A	Octobre 2017	8 semaines	11 semaines	7500	Pays d'Auge, Calvados
B	Octobre 2017	<b>6 semaines</b>	14 semaines	1300	Pays d'Auge, Orne
C1	Octobre 2017	<b>9 semaines</b>	<b>6 semaines</b>	60	Cotentin, Manche
C2	<b>Novembre 2017</b>	6 semaines	7 semaines	60	Cotentin, Manche
D1	Octobre 2017	6 semaines	11 semaines	1200	Sud Manche
D2	Novembre 2017	7 semaines	<b>22 semaines</b>	1200	Sud Manche

# Durée des fermentations alcoolique et malolactique, températures moyennes extérieures et volumes des différentes cuves suivies



Cuves	Initiation de la fermentation (I)	Fermentation alcoolique (F)	Période de maturation (M)	Température I (°C)	Température F (°C)	Température M (°C)	Volumes des cuves (hL)	Localisation
A	25/10/2017	8 semaines	11 semaines	13.7	6.3	16.8	7500	Pays d'Auge, Calvados
B	26/10/2017	6 semaines	14 semaines	13.7	6.3	16.8	1300	Pays d'Auge, Orne
C1	23/10/2017	9 semaines	6 semaines	13.4	7.2	15.3	60	Cotentin, Manche
C2	08/11/2017	6 semaines	7 semaines	13.4	7.2	15.3	60	Cotentin, Manche
D1	19/10/2017	6 semaines	11 semaines	13.8	7.1	18.2	1200	Sud Manche
D2	09/11/2017	7 semaines	22 semaines	13.8	7.1	18.2	1200	Sud Manche

# Caractéristiques des cidres des producteurs A, B, C et D.

## Tous les paramètres physico-chimiques ont été testés avec le test de Kruskal-Wallis et Friedman.

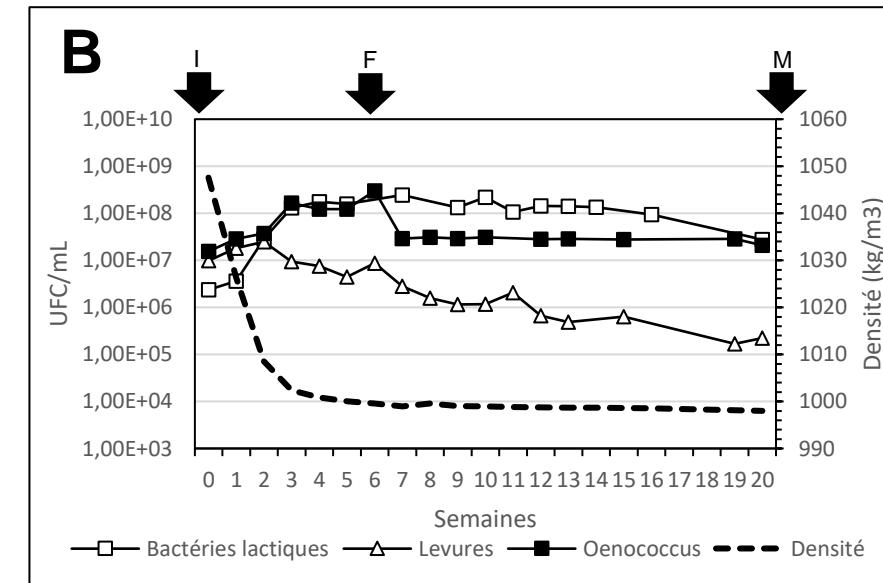
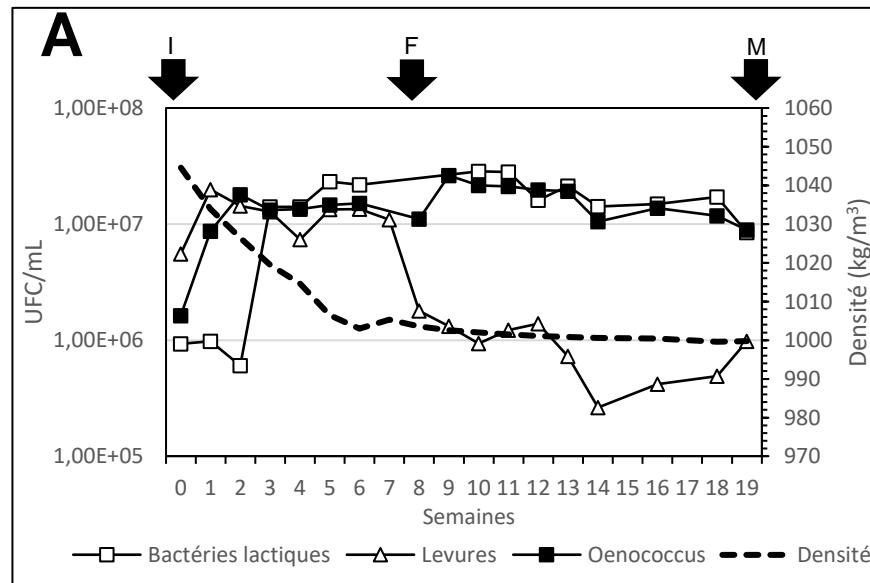


Paramètres	Densité <sup>b</sup> (kg.m <sup>-3</sup> )	Fructose <sup>b</sup> (g.L <sup>-1</sup> )	Glucose <sup>b</sup> (g.L <sup>-1</sup> )	Saccharose <sup>b</sup> (g.L <sup>-1</sup> )	Sucres totaux <sup>b</sup> (g.L <sup>-1</sup> sucrose)	TAV <sup>b</sup> (% v/v)	Glycérol <sup>b</sup> (g.L <sup>-1</sup> )	pH <sup>a</sup> (UpH)	Azote <sup>b</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	Acidité totale <sup>b</sup> (g.L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Acidité volatile <sup>b</sup> (g.L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Acide L-malique <sup>b</sup> (g.L <sup>-1</sup> )	Acide L-lactique <sup>b</sup> (g.L <sup>-1</sup> )	Acide D-Lactique <sup>ab</sup> (g.L <sup>-1</sup> )	
Initiation de la fermentation (I)	A	1044.57	67.50	21.30	17.90	102.26	0.12	<1.0	3.94	46.23	1.35	0.11	2.31	<0.10	<0.10
	B	1047.61	64.00	20.90	26.70	107.35	0.14	1.3	3.99	76.77	1.49	0.15	2.54	<0.10	<0.10
	C1	1050.08	70.50	21.90	31.10	118.88	0.08	<1.0	4.07	48.75	1.46	0.16	2.55	<0.10	<0.10
	C2	1052.38	72.90	19.60	30.20	118.08	0.03	1.3	3.96	67.81	1.69	0.04	3.46	<0.10	<0.10
	D1	1042.03	61.40	17.50	22.30	97.26	0.12	1.1	3.93	56.04	1.57	0.12	2.74	<0.10	<0.10
	D2	1039.54	61.50	17.60	13.40	88.55	0.58	<1.0	3.85	19.89	1.63	0.23	2.47	0.18	<0.10
Fermentation alcoolique (F)	A	1003.30	12.40	<1.0	<1.0	11.80	5.41	3.80	3.94	0	2.01	0.64	<0.10	1.29	0.79
	B	999.70	4.10	<1.0	<1.0	3.90	6.21	4.38	3.99	0	2.29	0.65	<0.10	1.37	1.39
	C1	997.82	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	6.80	3.33	4.04	0	3.15	0.90	<0.10	1.05	0.11
	C2	1039.97	67.50	17.90	4.60	85.74	6.80	2.20	4.29	0	2.59	1.02	<0.10	0.15	<0.10
	D1	1002.37	10.60	<1.0	<1.0	10.05	5.27	4.20	3.93	0	2.67	1.14	<0.10	1.71	1.57
	D2	1011.50	18.60	1.60	<1.0	21.01	no data	1.89	3.99	0	1.45	0.32	<0.10	1.62	2.07
Période de maturation (M)	A	999.78	5.30	<1.0	<1.0	5.0	5.76	3.80	3.94	0	2.53	1.25	<0.10	1.23	1.03
	B	998.43	1.40	<1.0	<1.0	1.33	6.39	5.00	3.94	0	2.61	1.23	<0.10	1.57	1.76
	C1	997.71	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	6.81	3.20	4.02	0	3.14	1.28	<0.10	1.02	0.13
	C2	999.78	<1.0	<1.0	<1.0	<2.9	6.80	2.40	4.26	0	2.80	1.09	<0.10	0.14	<0.10
	D1	1000.77	7.30	<1.0	<1.0	6.93	5.46	4.60	3.68	0	2.80	1.20	<0.10	1.81	1.84
	D2	1003.20	12.50	<1.0	<1.0	11.88	5.17	3.34	3.80	0	3.02	1.47	<0.10	1.66	0.56

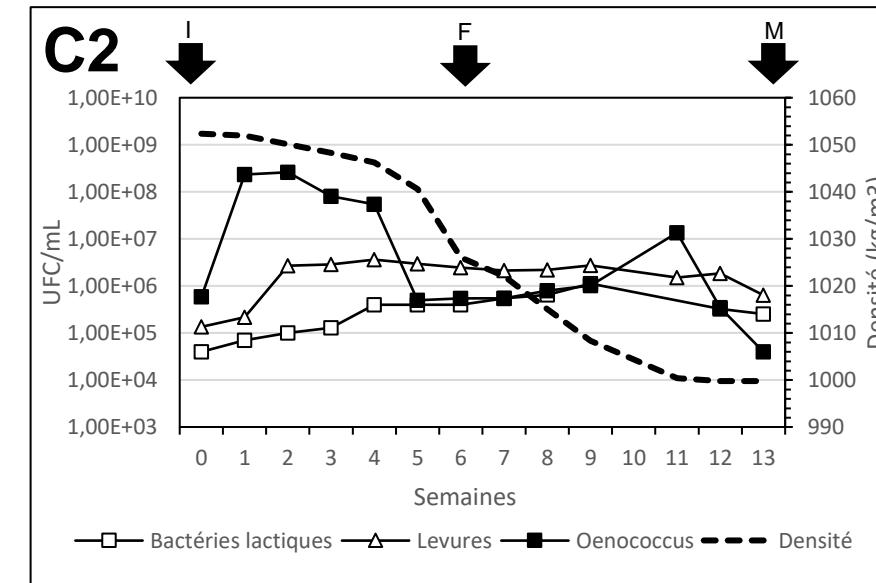
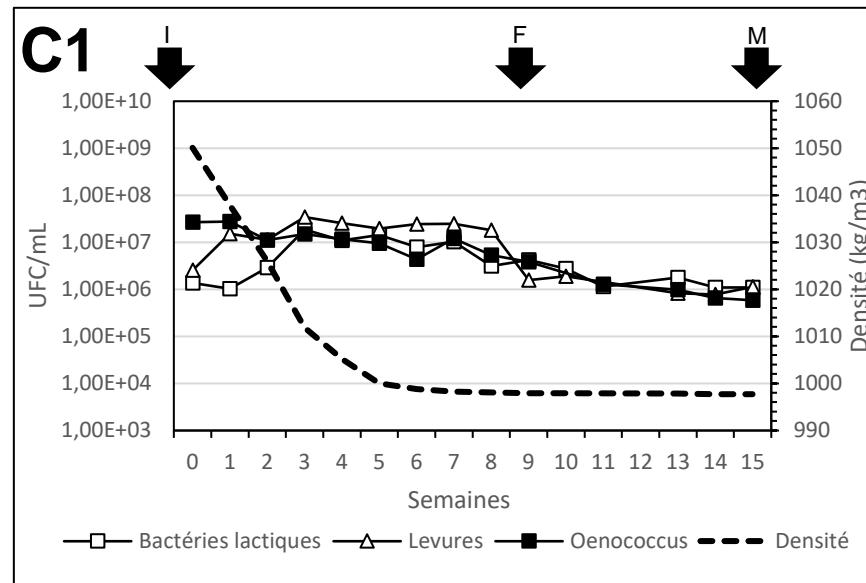
<sup>a</sup> Test de Kruskal-Wallis entre cuves. Aucune différence n'est significative à l'exception du pH et de la teneur en acide D-lactique.

<sup>b</sup> Test de Friedman entre I, F, M. Seul le pH n'est pas significativement différent.

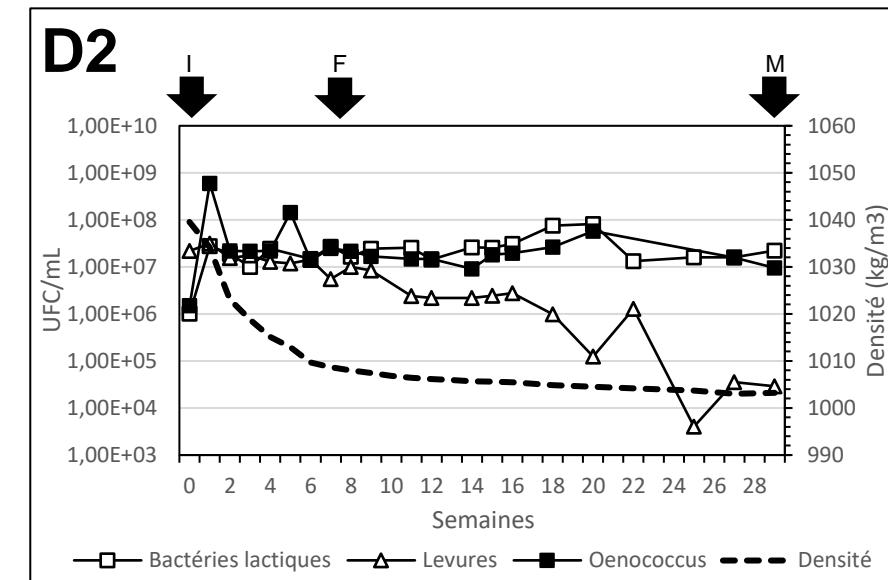
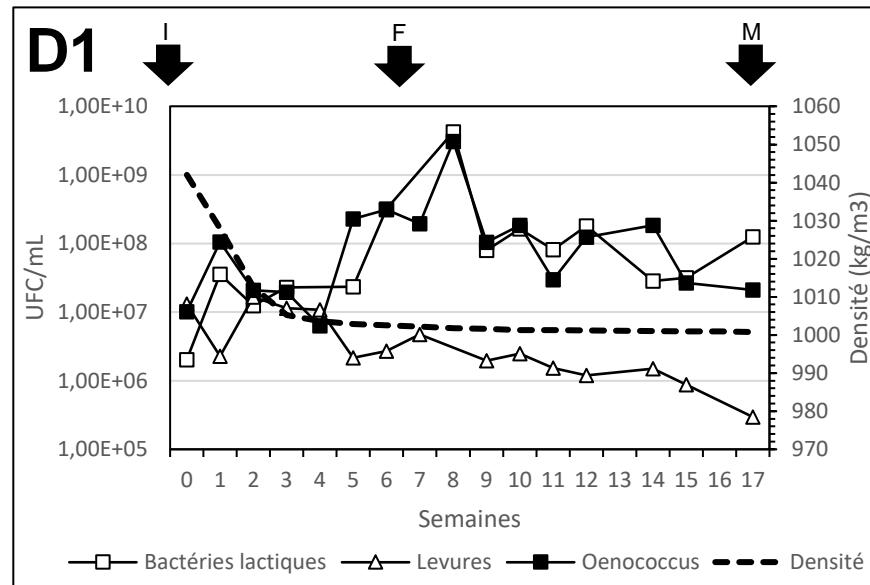
# Evolution des populations de bactéries lactiques ( $\square$ ), levures ( $\Delta$ ), oenocoques ( $\blacksquare$ ) et de la densité dans les cuves des producteurs A et B.



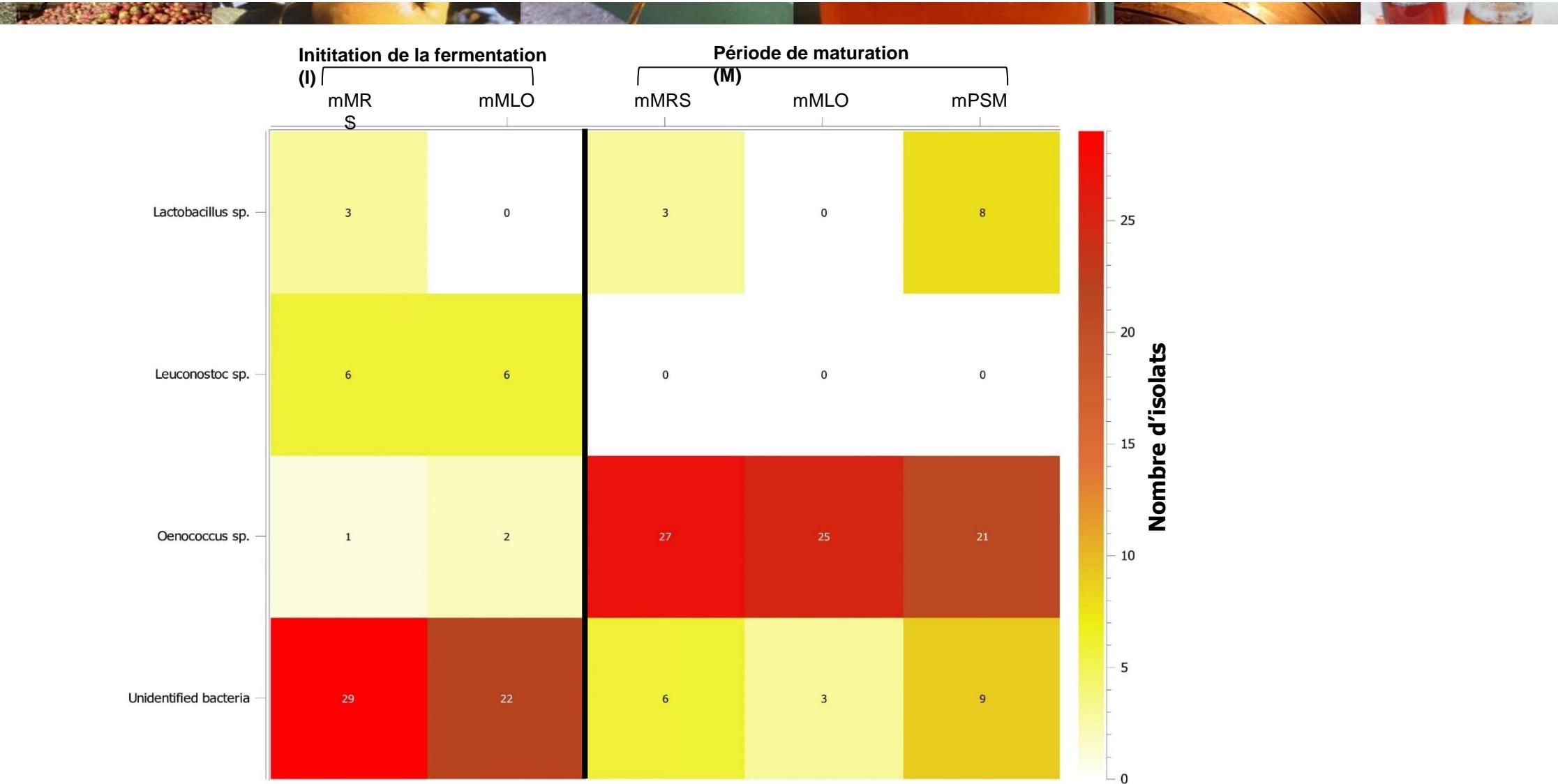
# Evolution des populations de bactéries lactiques (□), levures (△), oenocoques (■) et de la densité dans les cuves du producteur C.



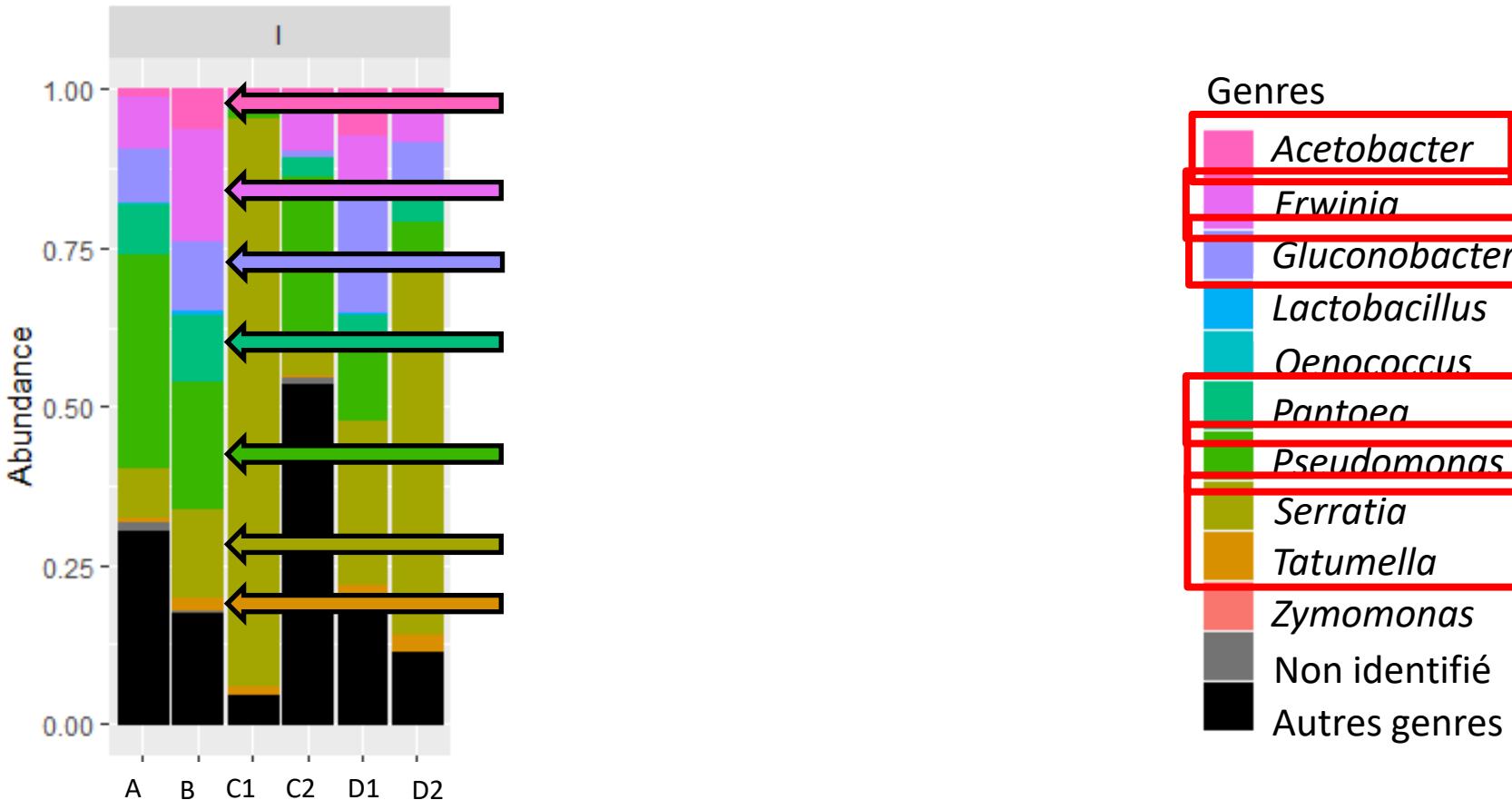
# Evolution des populations de bactéries lactiques (□), levures (Δ), oenocoques (■) et de la densité dans les cuves du producteur D.



# Identification des bactéries lactiques obtenues sur les milieux mMRs, mMLO et mPSM à différents stades d'élaboration du cidre

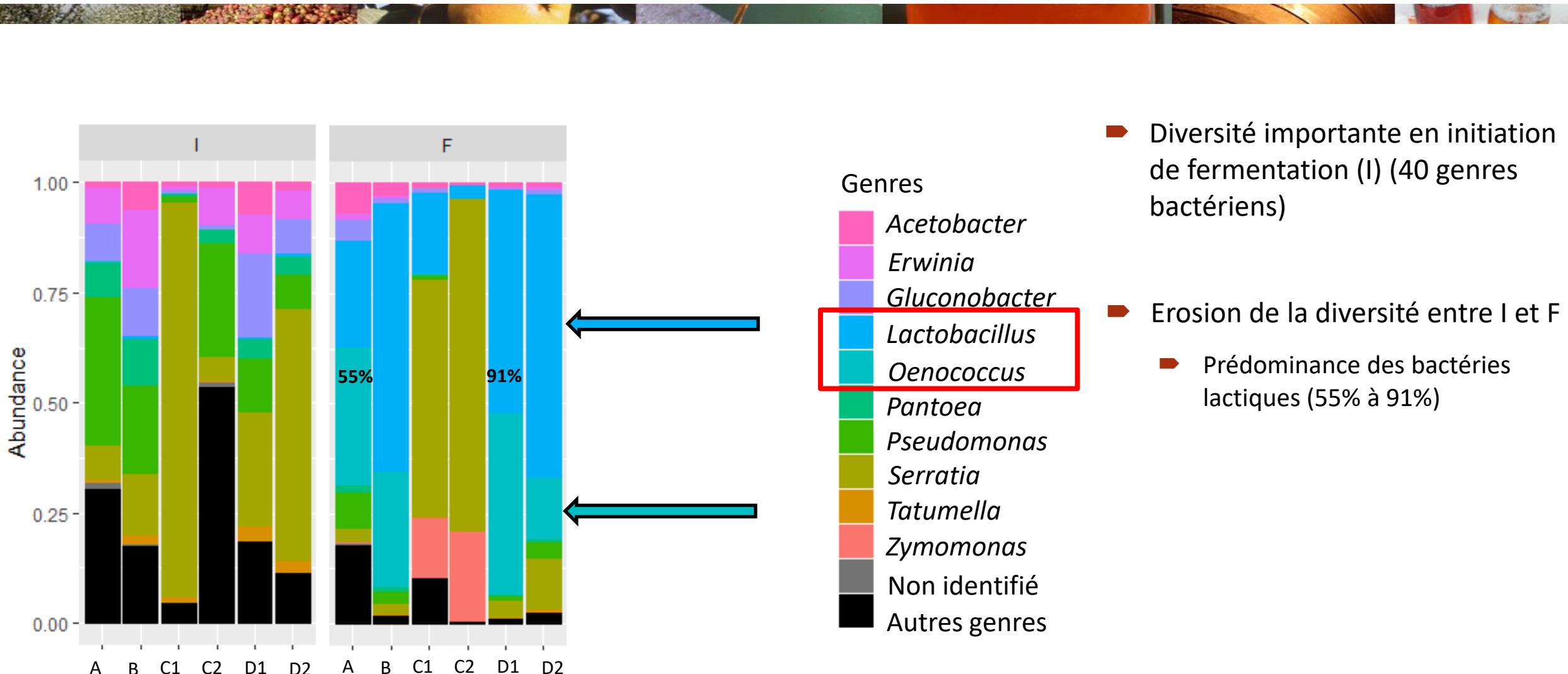


# Evolution de la diversité bactérienne des six cidres à distiller

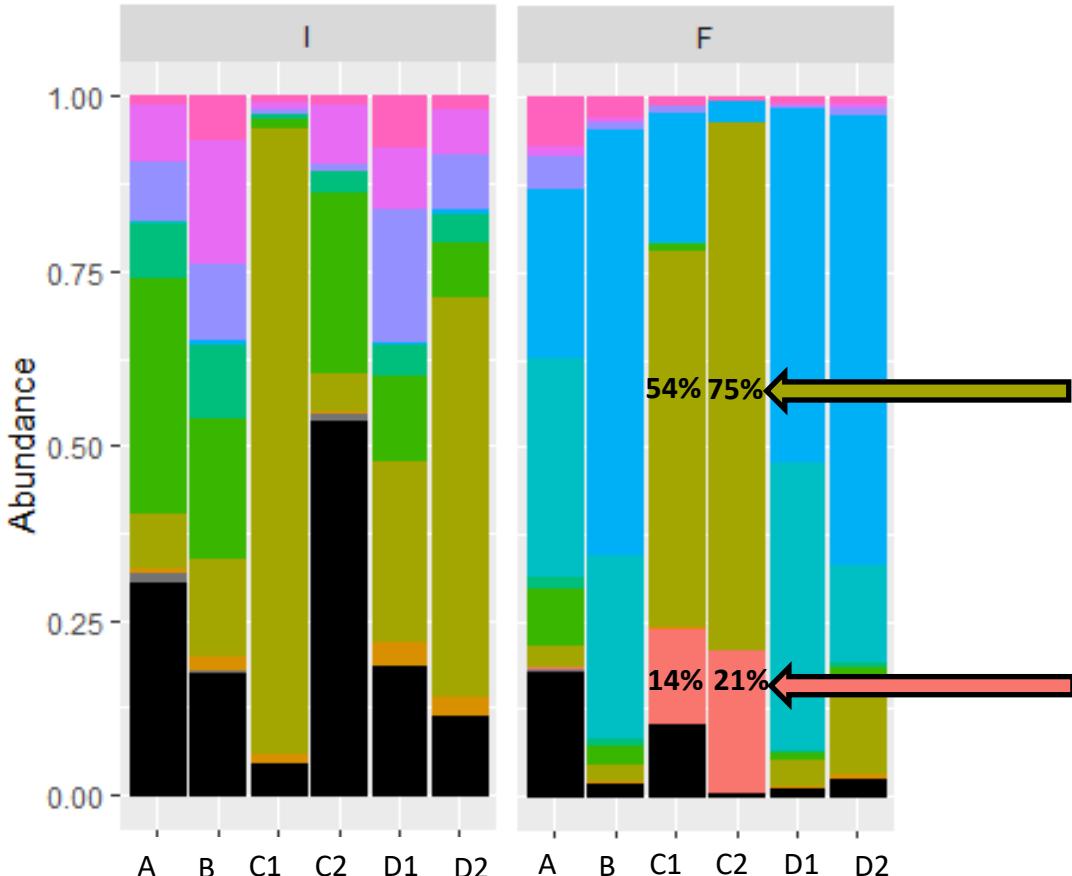


- Diversité importante en initiation de fermentation (I) (40 genres bactériens)

# Evolution de la diversité bactérienne des six cidres à distiller

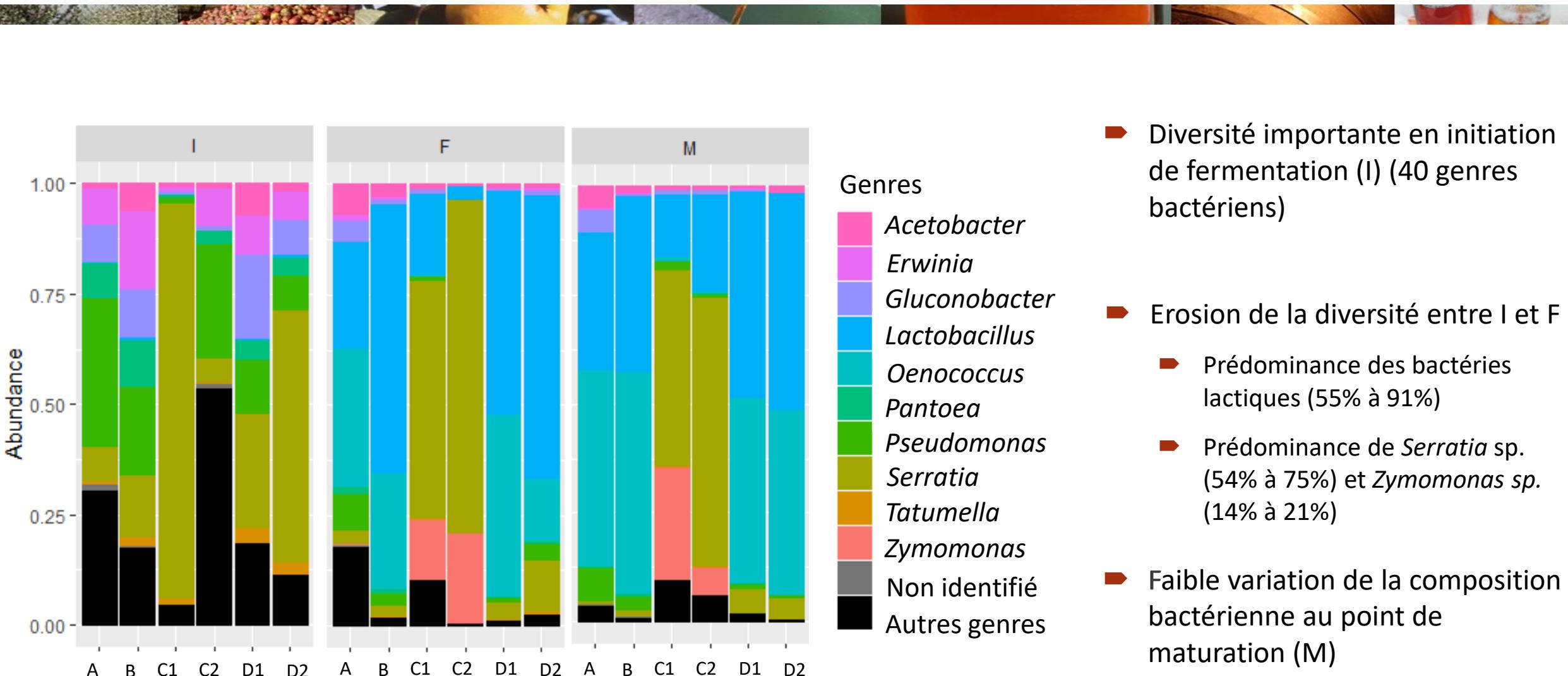


# Evolution de la diversité bactérienne des six cidres à distiller

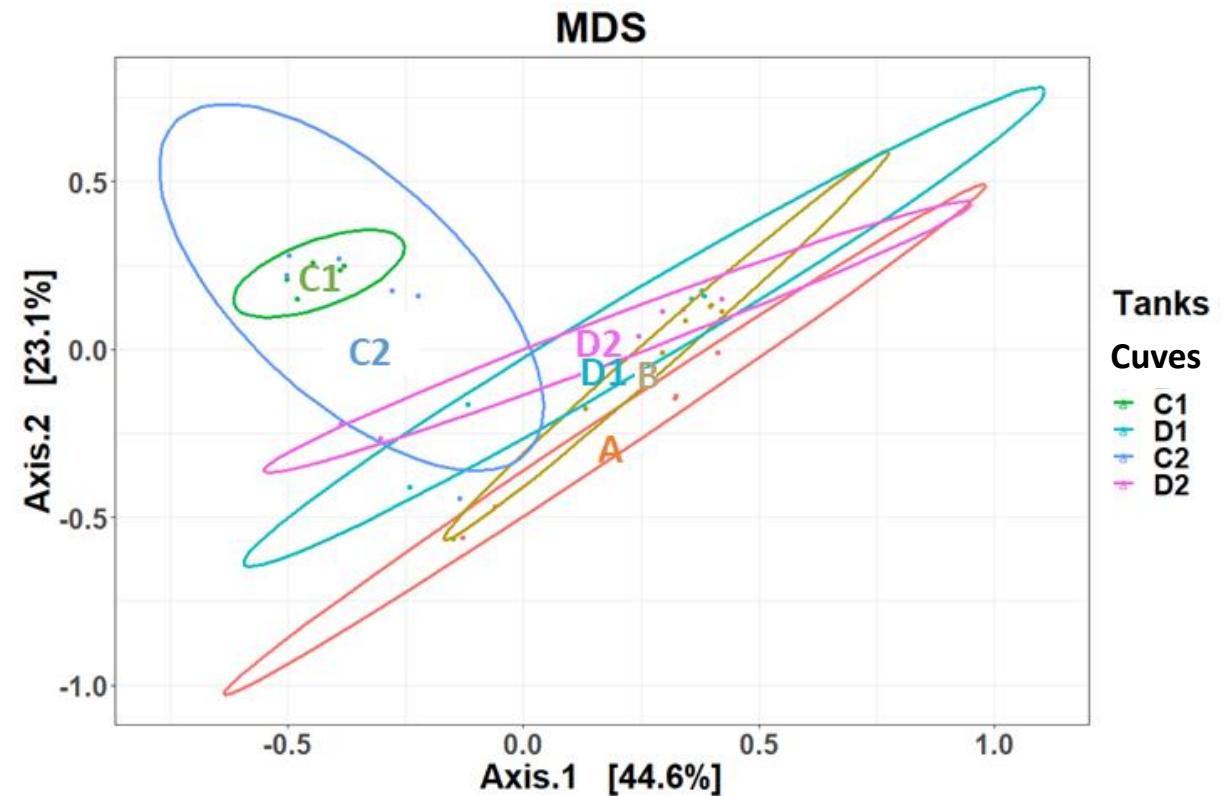
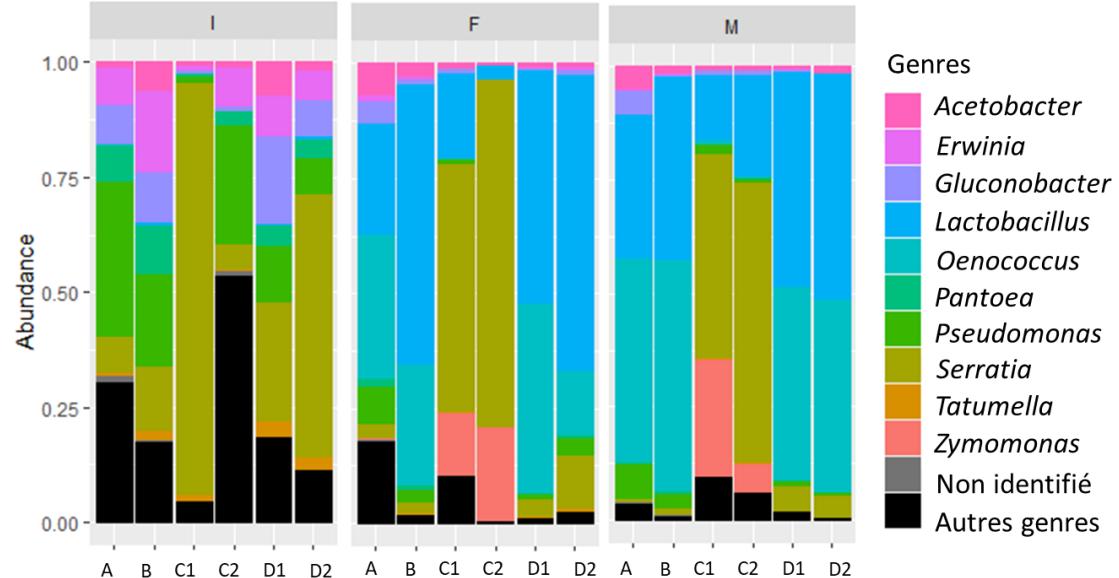


- ▶ Diversité importante en initiation de fermentation (I) (40 genres bactériens)
  - ▶ Erosion de la diversité entre I et F
    - ▶ Prédominance des bactéries lactiques (55% à 91%)
    - ▶ Prédominance de *Serratia* sp. (54% à 75%) et *Zymomonas* sp. (14% à 21%)
- Genres
- Acetobacter*
  - Erwinia*
  - Gluconobacter*
  - Lactobacillus*
  - Oenococcus*
  - Pantoea*
  - Pseudomonas*
  - Serratia*
  - Tatumella*
  - Zymomonas*
  - Non identifié
  - Autres genres

# Evolution de la diversité bactérienne des six cidres à distiller



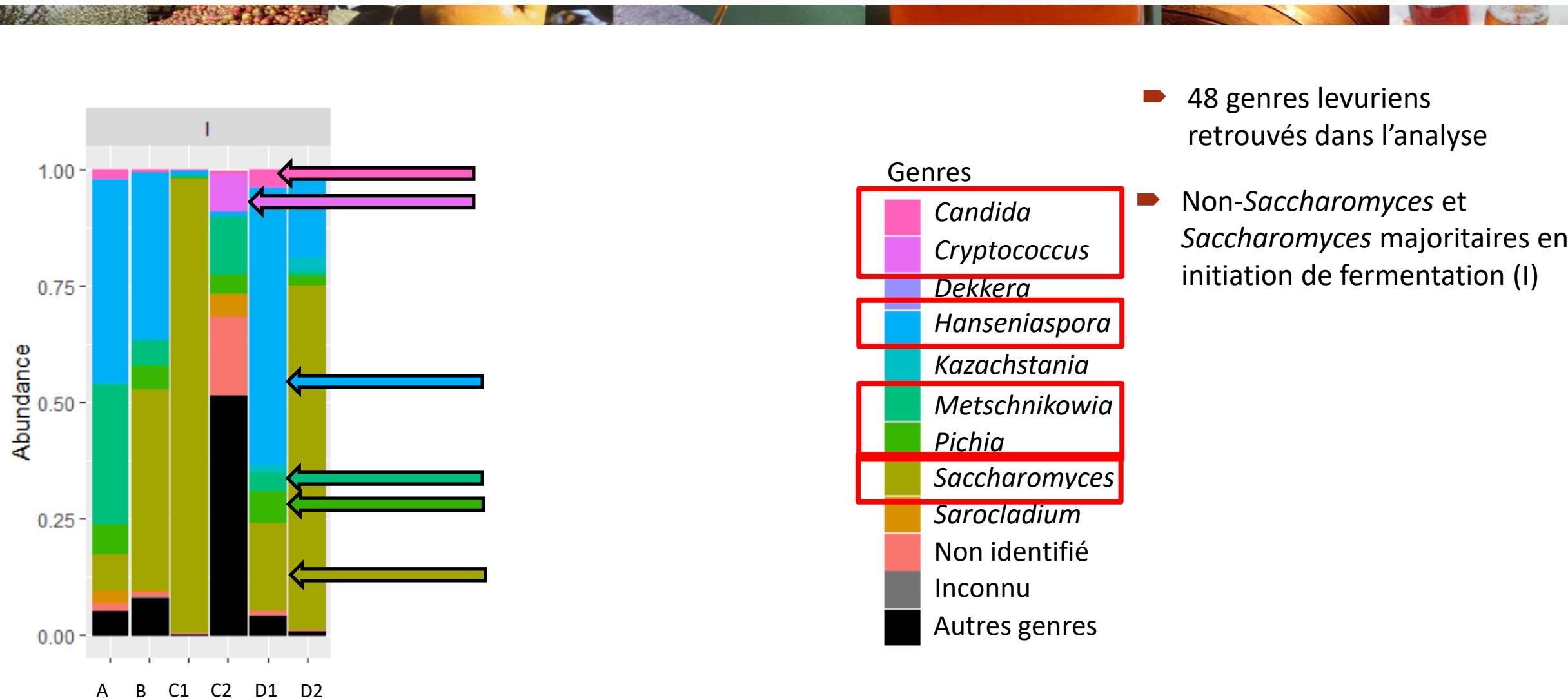
# Distribution des cuves en fonction de la composition bactérienne des cidres



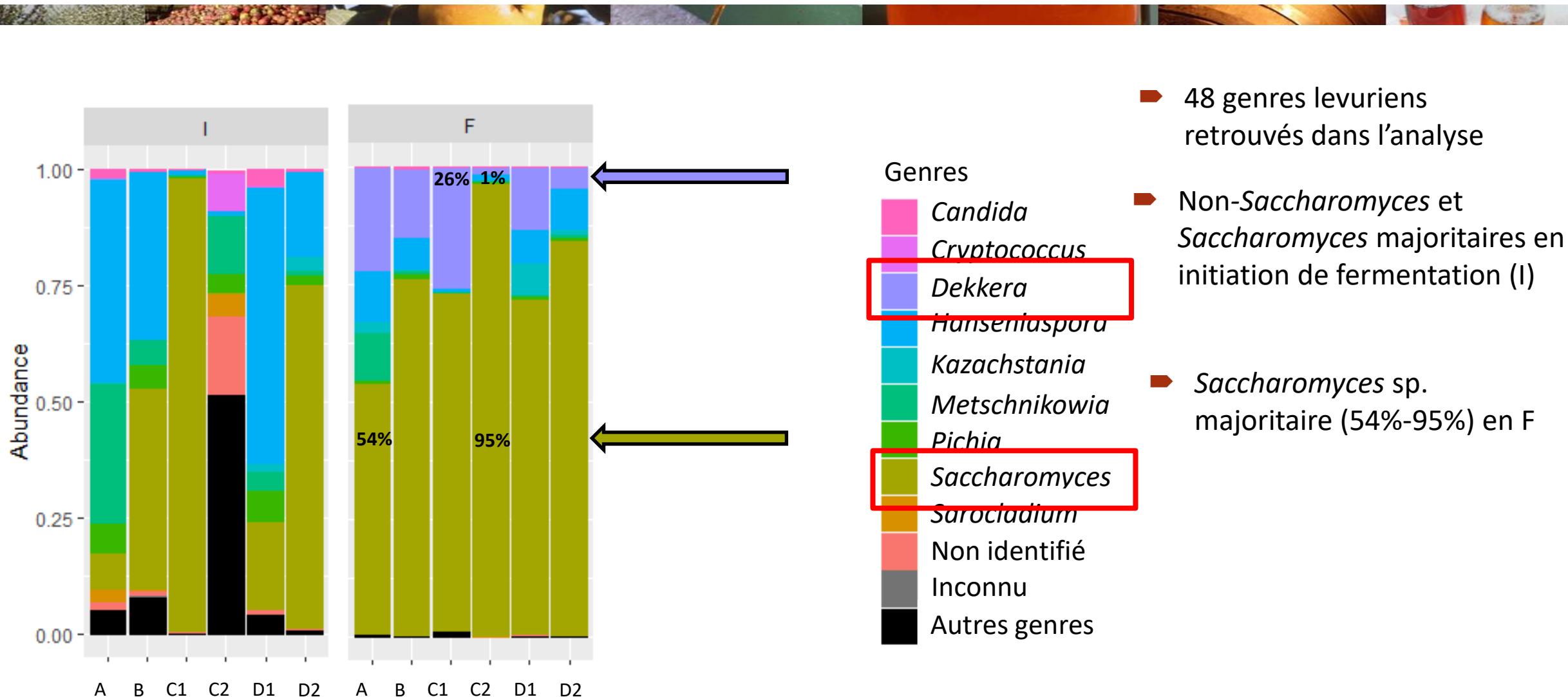
Profils bactériens particuliers pour les cuves du producteur C.

Proportion de bactéries lactiques moindre, prédominance de *Serratia* sp. et présence de *Zymomonas* sp.

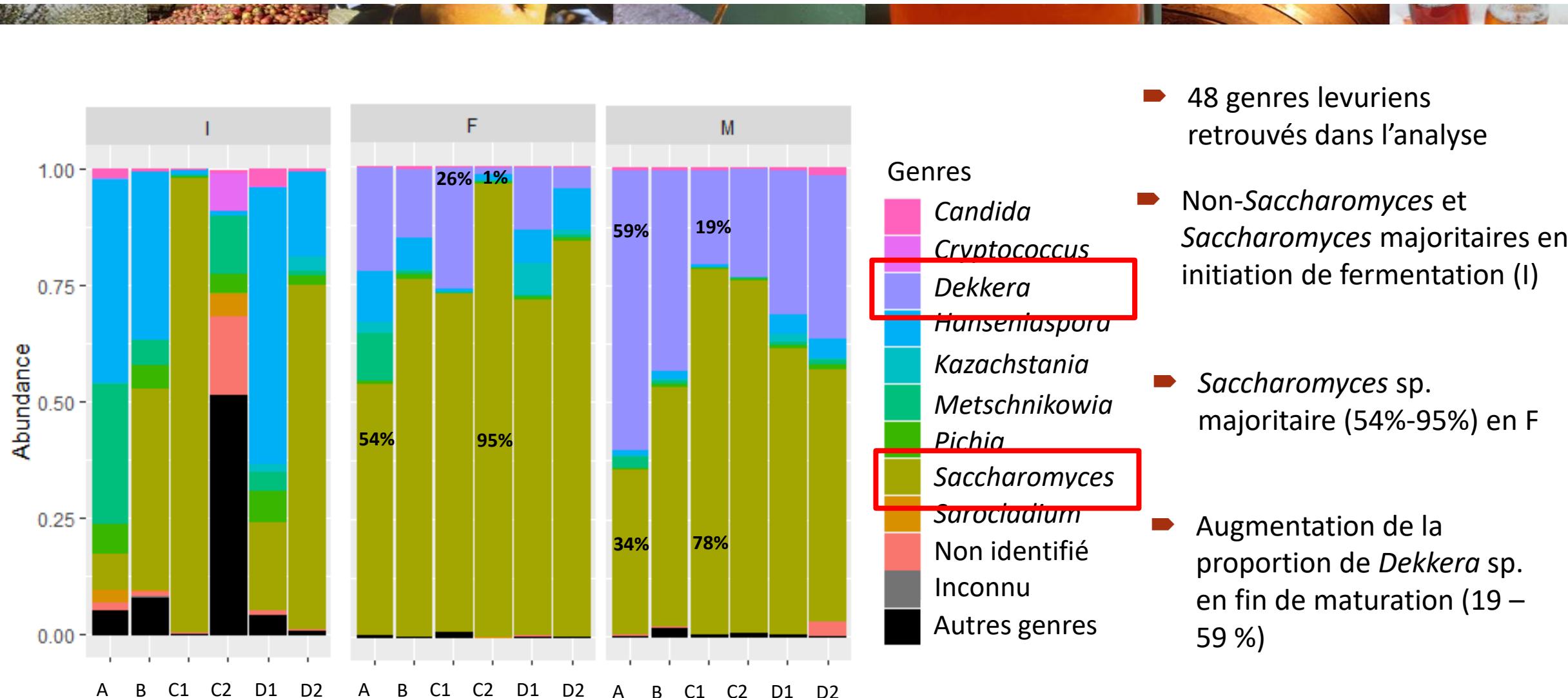
# Evolution de la diversité levurienne des six cidres à distiller



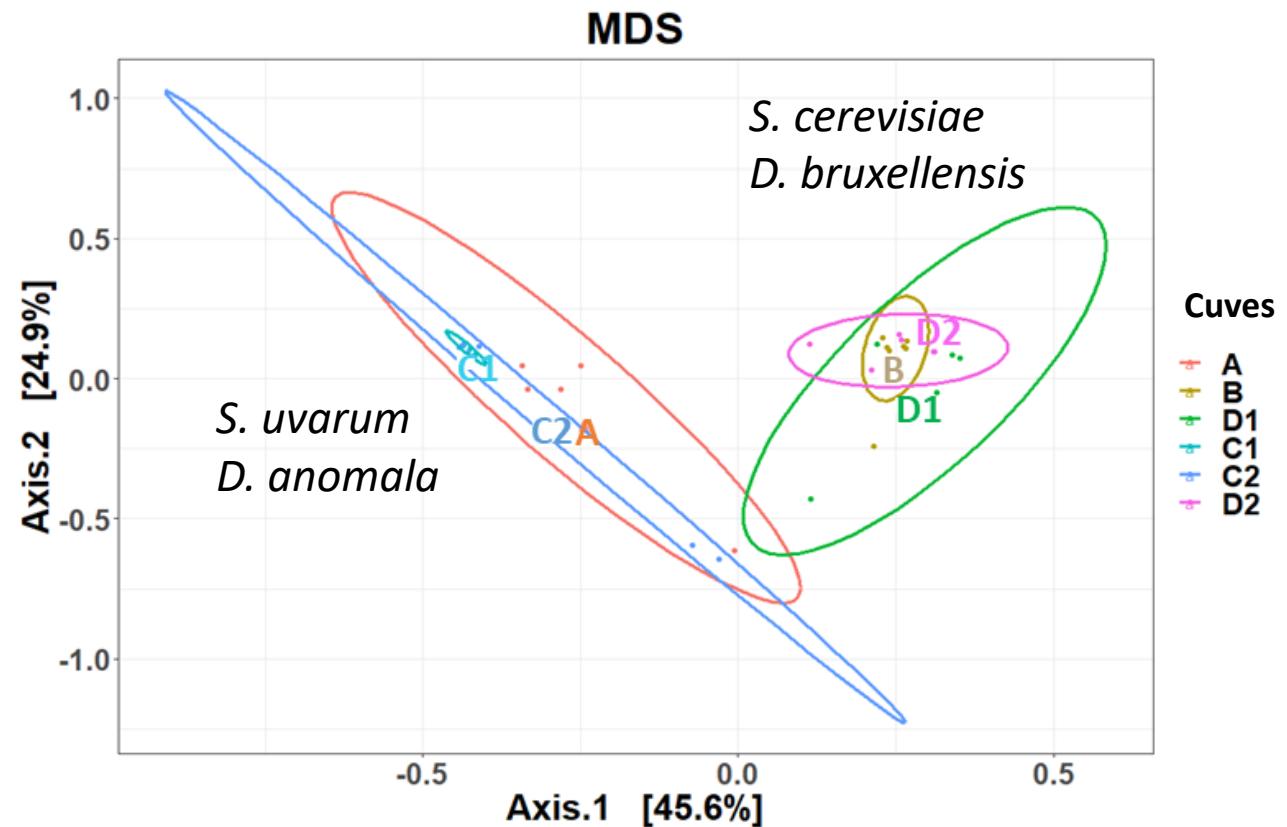
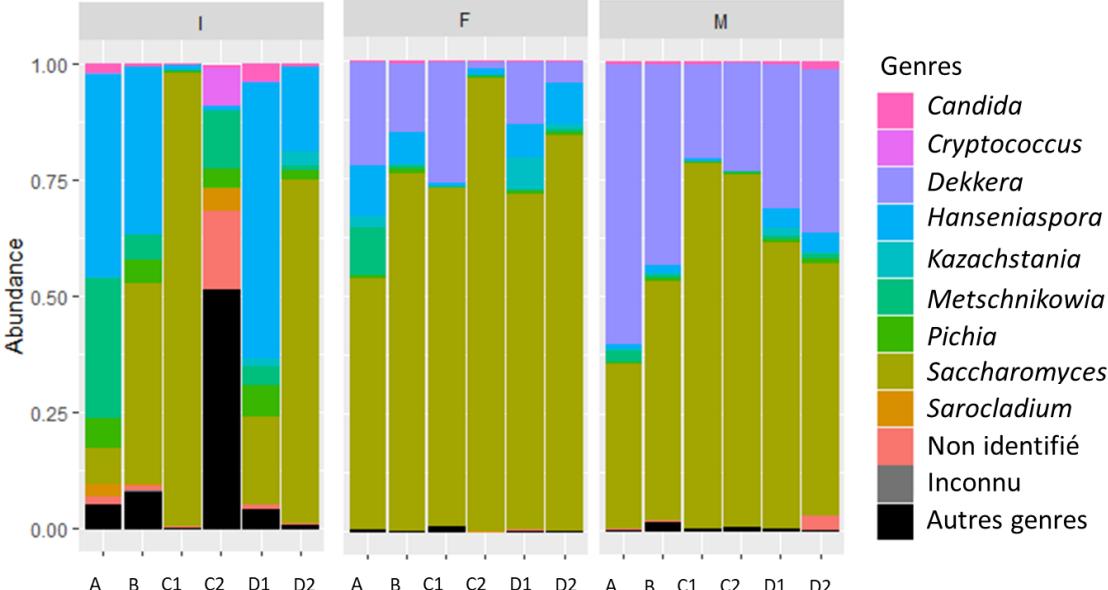
# Evolution de la diversité levurienne des six cidres à distiller



# Evolution de la diversité levurienne des six cidres à distiller



# Distribution des cuves en fonction de la composition levurienne des cidres



- Aucune différence visible entre les producteurs en fonction de la composition levurienne au niveau du genre
- Espèces de *Saccharomyces* et de *Dekkera* permettent de différencier les profils entre les producteurs A et C/B et D

# Diversité des communautés microbiennes lors de la fermentation du cidre de distillation



Première étude de la diversité microbienne cidricole par approche métagénétique (Misery *et al.*, 2021)

- L'analyse par métagénétique a révélé respectivement 40 et 48 genres bactériens et fongiques
- Genres majoritaires similaires à ceux obtenus par les approches culturales
- Dynamiques écosystèmes microbiens spécifiques du producteur
- Fermentation malolactique a lieu en même temps que la fermentation alcoolique

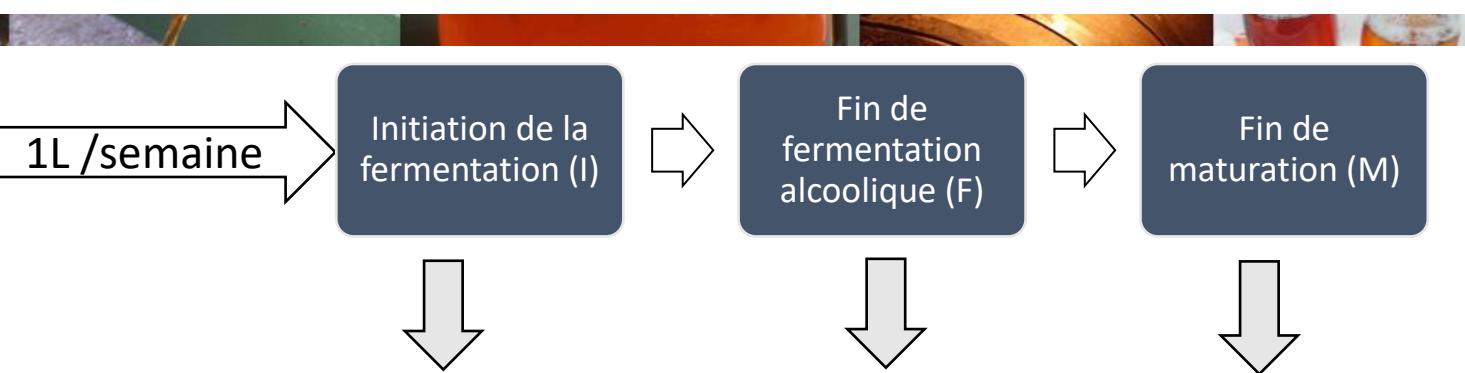


- Seuls 2 paramètres physico-chimiques significatifs sur 15 analysés
  - acide lactique
  - pH
- Intérêt du suivi des bactéries lactiques en combinaison avec le pH

Nouvelle campagne  
d'échantillonnage (2018)

# Schéma d'analyse des cidres de distillation (campagne 2017)

- 1<sup>ère</sup> campagne d'échantillonnage
- 4 producteurs : A, B, C, D
- 6 cuves (A, B, C1, C2, D1, D2)



## Analyses physico-chimiques

15 paramètres dont densité, sucres, alcools

## Approche métagénétique

- Extraction d'ADN
- Séquençage Illumina MiSeq-2x300bp
- V1-V3 (bactéries) / ITS1 (levures/moisissures)
- Analyses bio-informatiques

Cuves	Date d'initiation de la fermentation (I)	Durée de fermentation alcoolique (F)	Durée de la période de maturation (M)	Volume (hL)	Localisation
A	Octobre 2017	8 semaines	11 semaines	7500	Pays d'Auge, Calvados
B	Octobre 2017	<b>6 semaines</b>	14 semaines	1300	Pays d'Auge, Orne
C1	Octobre 2017	<b>9 semaines</b>	<b>6 semaines</b>	60	Cotentin, Manche
C2	<b>Novembre 2017</b>	6 semaines	7 semaines	60	Cotentin, Manche
D1	Octobre 2017	6 semaines	11 semaines	1200	Sud Manche
D2	Novembre 2017	7 semaines	<b>22 semaines</b>	1200	Sud Manche

# Schéma d'analyse des cidres de distillation (campagne 2018)

- 1<sup>ère</sup> / 2<sup>ème</sup> campagne d'échantillonnage
- 4 producteurs : A, B, C, D, E, F
- 10 cuves (A, B, C1, C2, C3, D1, D2, E1, E2, F)

1L /semaine

Initiation de la fermentation (I)

Fin de fermentation alcoolique (F)

Fin de maturation (M)

## Analyses physico-chimiques

15 paramètres dont densité, sucres, alcools

## Analyse aromatique

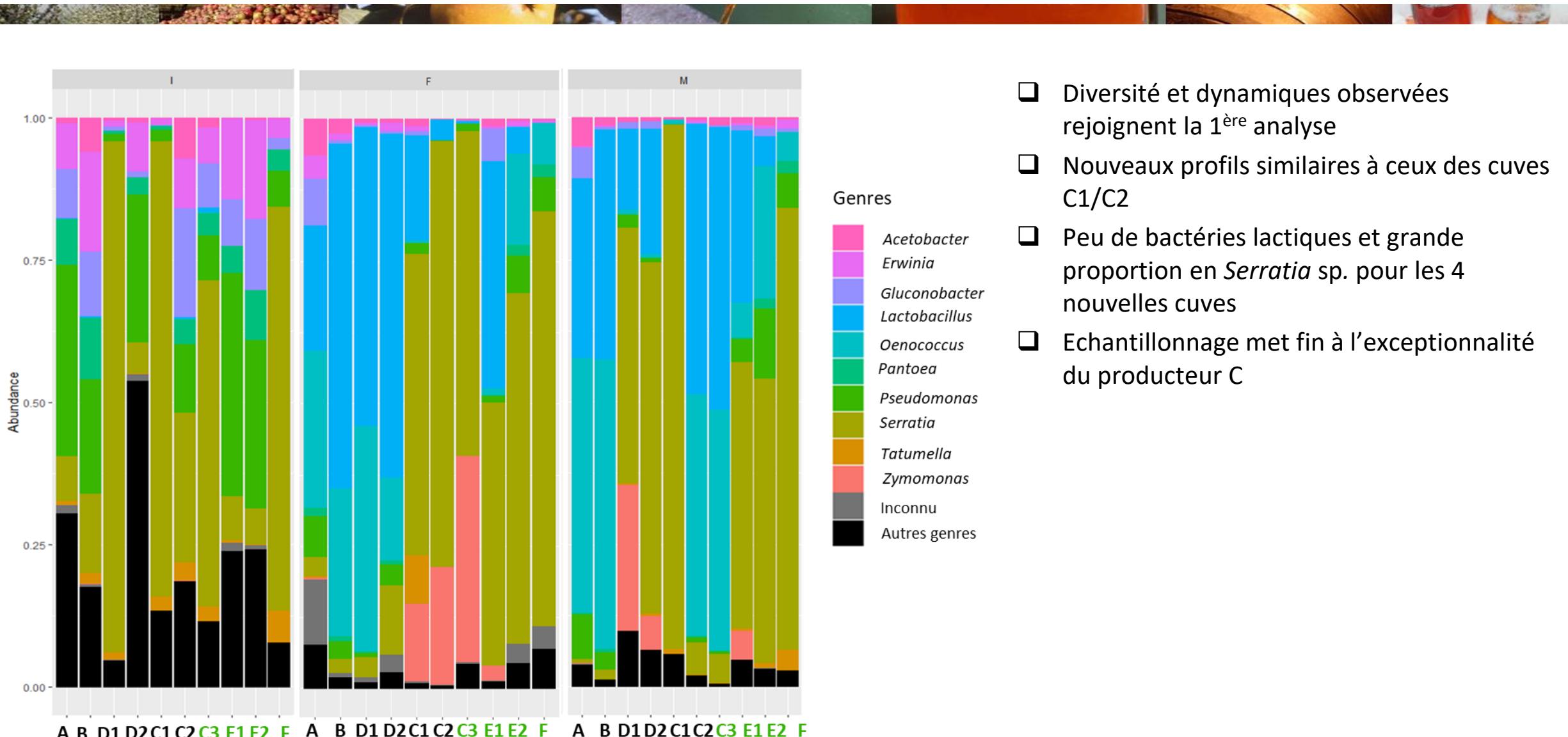
16 arômes analysés (cidres de distillation)  
45 arômes analysés (distillats)  
(GC-MS, GC-FID, HPLC-UV-DAD)

## Approche métagénétique

- Extraction d'ADN
- Séquençage Illumina MiSeq-2x300bp
- V1-V3 (bactéries) / ITS1 (levures/moisissures)
- Analyses bio-informatiques

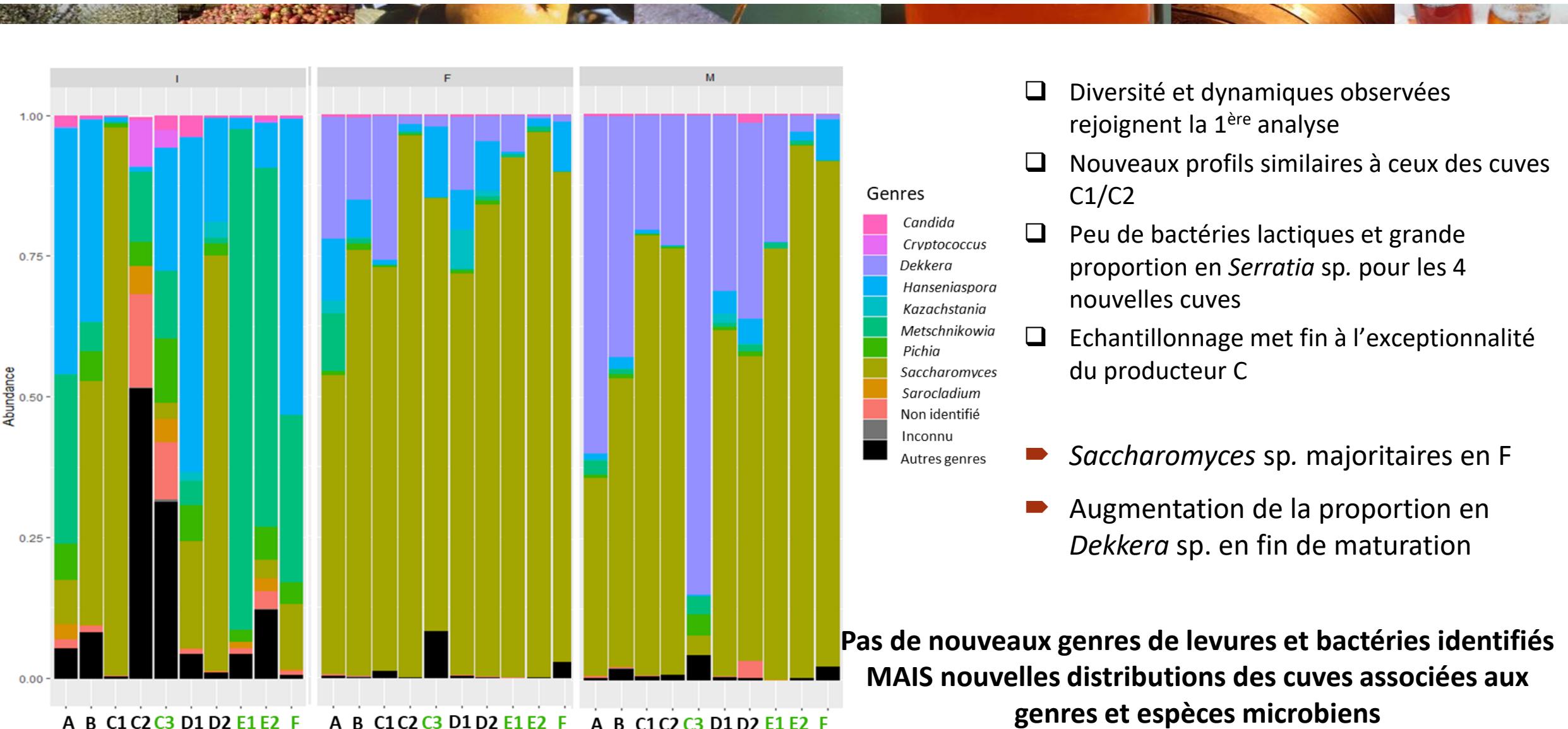
Cuves	Date d'initiation de la fermentation (I)	Durée de fermentation alcoolique (F)	Durée de la période de maturation (M)	Volume (hL)	Localisation
A	Octobre 2017	8 semaines	11 semaines	7500	Pays d'Auge. Calvados
B	Octobre 2017	6 semaines	14 semaines	1300	Pays d'Auge. Orne
C1	Octobre 2017	9 semaines	6 semaines	60	Cotentin. Manche
C2	Novembre 2017	6 semaines	7 semaines	60	Cotentin. Manche
C3	Novembre 2018	16 semaines	14 semaines	60	Cotentin. Manche
D1	Octobre 2017	6 semaines	11 semaines	1200	Sud Manche
D2	Novembre 2017	7 semaines	22 semaines	1200	Sud Manche
E1	Octobre 2018	11 semaines	12 semaines	60	Pays d'Auge. Calvados
E2	Novembre 2018	12 semaines	6 semaines	57	Pays d'Auge. Calvados
F	Novembre 2018	22 semaines	2 semaines	100	Bessin. Calvados

# Dynamiques bactériennes des cidres à distiller

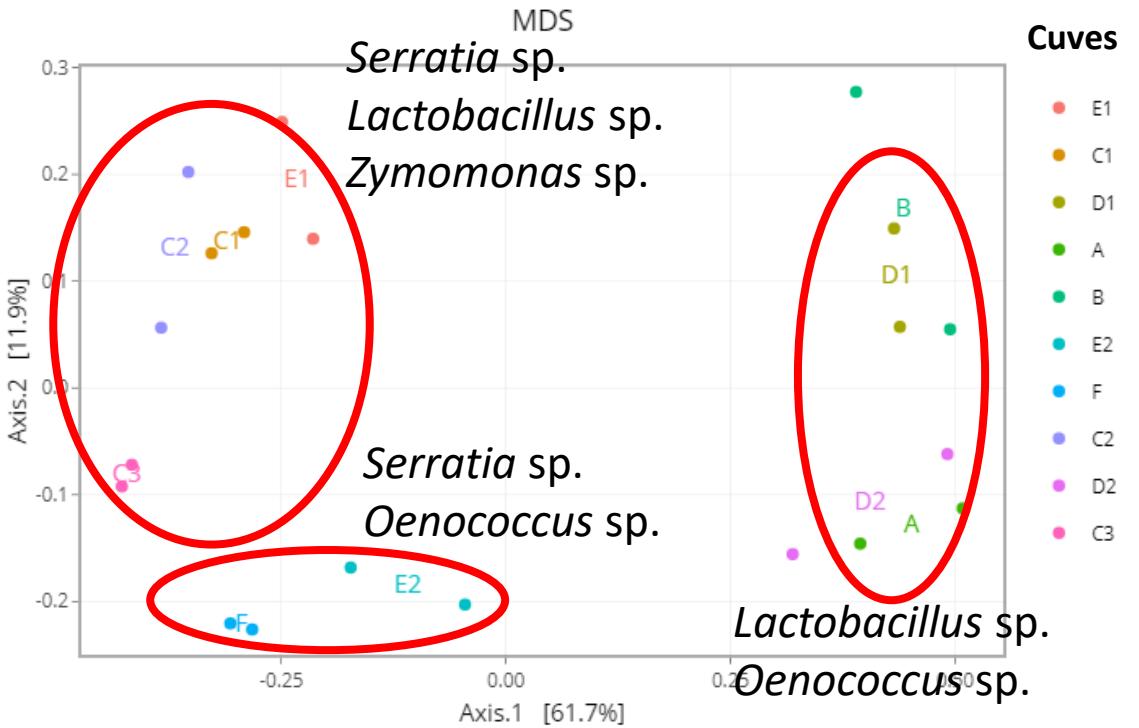


- Diversité et dynamiques observées rejoignent la 1<sup>ère</sup> analyse
- Nouveaux profils similaires à ceux des cuves C1/C2
- Peu de bactéries lactiques et grande proportion en *Serratia* sp. pour les 4 nouvelles cuves
- Echantillonnage met fin à l'exceptionnalité du producteur C

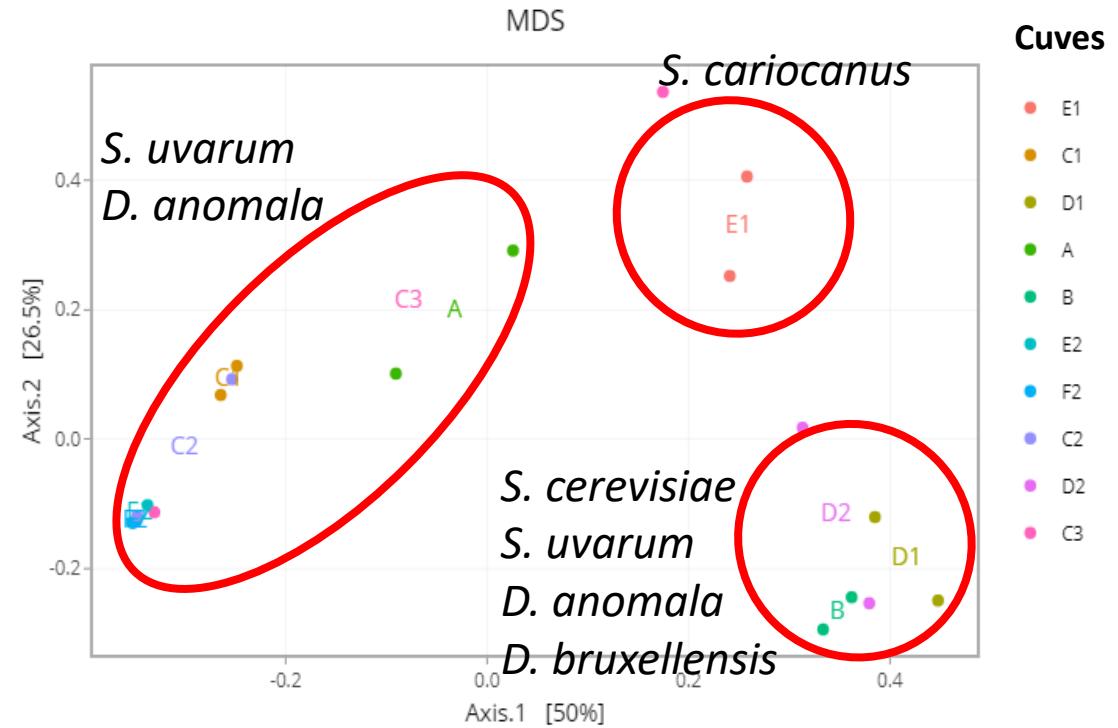
# Dynamiques levuriennes des cidres à distiller



# Distribution des cuves en fonction de la composition microbienne

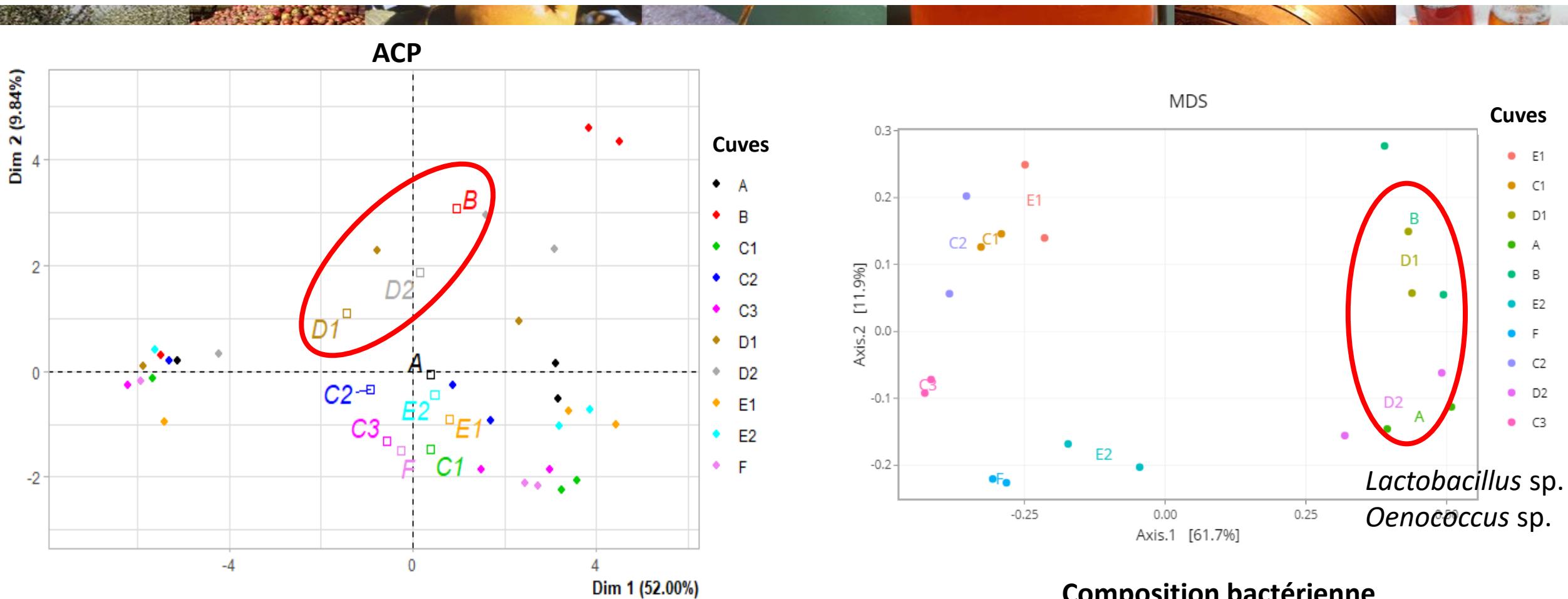


Les cuves se distinguent par leurs proportions en *Serratia* sp., *Zymomonas* sp., *Lactobacillus* sp. et *Oenococcus* sp.



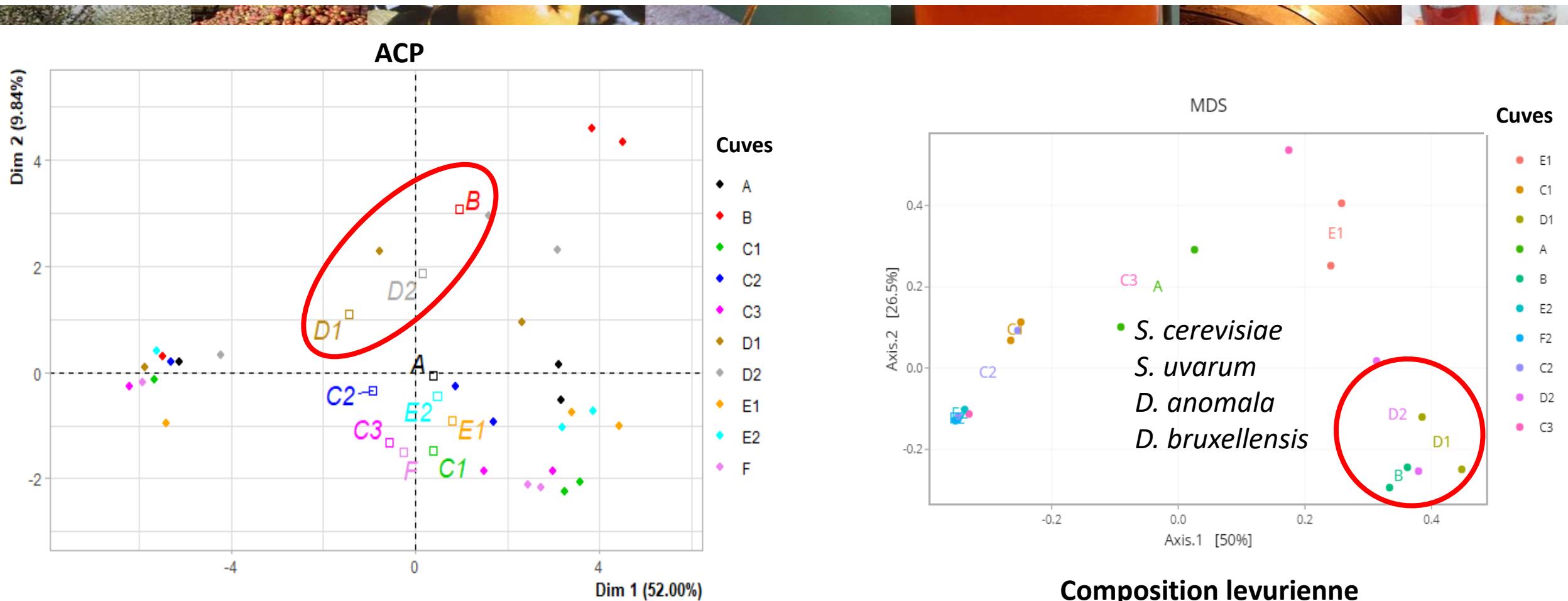
La différence observée entre les cuves des producteurs réside dans la diversité des espèces de *Saccharomyces* sp. et *Dekkera* sp.

# Distribution des cuves selon la composition aromatique des 10 cidres de distillation



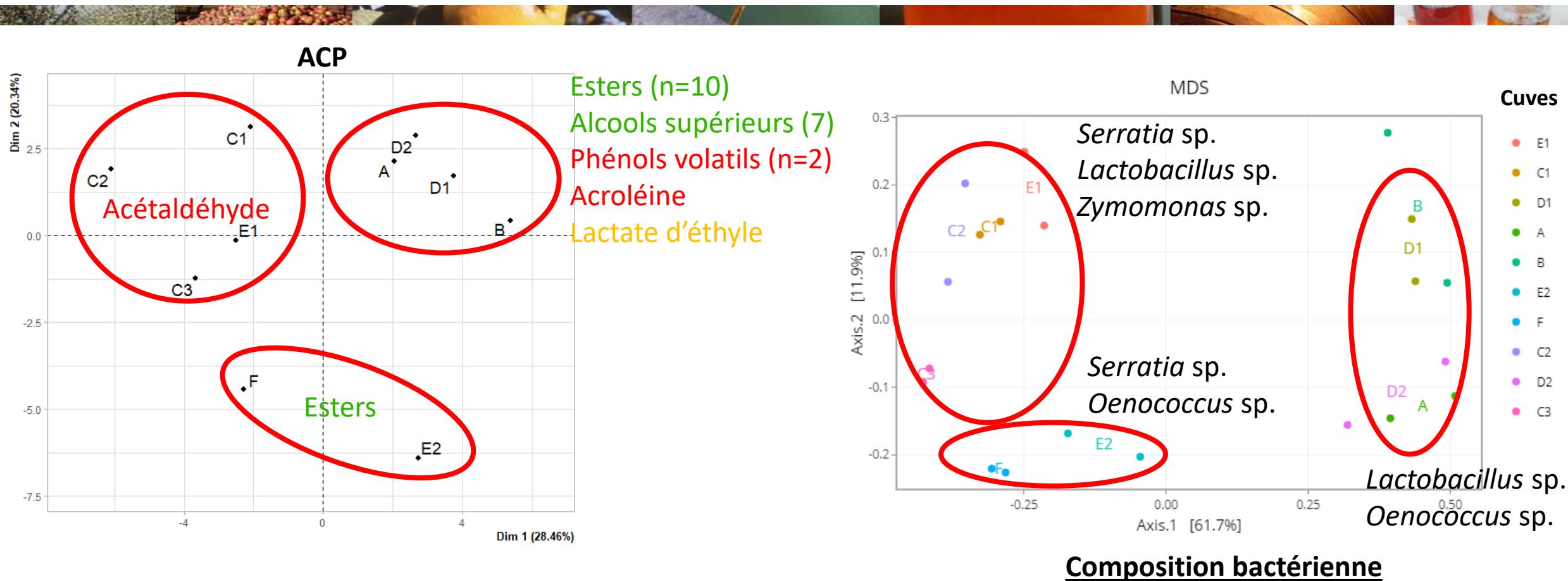
- Cuves B/D1/D2 : teneur plus élevée en hexanol-1, éthyl-2-méthylbutyrate, lactate d'éthyle
- Cuves B/D1/D2 : proportion plus importante de bactéries lactiques et composition levurienne diverse

# Distribution des cuves selon la composition aromatique des 10 cidres de distillation



- Cuves B/D1/D2 : teneur plus élevée en hexanol-1, éthyl-2-méthylbutyrate, lactate d'éthyle
- Cuves B/D1/D2 : proportion plus importante de bactéries lactiques et composition levurienne diverse

# Distribution des cuves selon la composition aromatique des 10 micro-distillats



Mêmes groupes entre la composition aromatique et la composition/dynamiques microbiennes

Complexité aromatique des cuves A/B/D1/D2 est à mettre en rapport avec la proportion de bactéries lactiques

# Réseaux probables entre abondance microbienne et quantification aromatique

## 3 types de "co-occurrences"

- ▶ Bactéries/bactéries
  - ▶ *Oenococcus oeni*/*Secundilactobacillus collinoides*
- ▶ Bactéries/levures
  - ▶ *Oenococcus oeni*/*Saccharomyces cerevisiae* et *Dekkera* sp.
  - ▶ *Secundilactobacillus collinoides*/*Kazachstania* sp., *Pichia* sp., *Saccharomyces* sp. et *Dekkera* sp.
- ▶ Micro-organismes/arômes
  - ▶ *Oenococcus oeni*/12 composés aromatiques
  - ▶ *Dekkera* sp./phénols volatils et l'acidité volatile
  - ▶ *Hanseniaspora uvarum*/isobutyrate d'éthyle
- ▶ Pas de "co-occurrence" entre les espèces de *Saccharomyces* et les arômes étudiés sauf acétate d'héxyle et *Saccharomyces cerevisiae*

# Bilan sur les écosystèmes microbiens et qualité aromatique des cidres de distillation



- ▶ Diversité/arômes :
  - ▶ Diversité à l'espèce pour les levures : *Saccharomyces* sp. et *Dekkera* sp. (phénols volatils et esters)
  - ▶ Diversité au genre pour les bactéries : *Serratia* sp., *Zymomonas* sp., *Lactobacillus* sp. et *Oenococcus* sp.
- ▶ Forte correspondance entre la diversité aromatique et la diversité bactérienne
- ▶ Plus grande complexité aromatique lorsque la FML a eu lieu

# MoNArC : Modulation des Notes aromatiques des Calvados

## Entreprises



DOMAINE  
DU  
COQUEREL



## Expertise & Prestataires

INRAE, AgroParis Tech, ESA, ARAC

## Partenaires



UNICAEN  
UNIVERSITÉ  
CAEN  
NORMANDIE

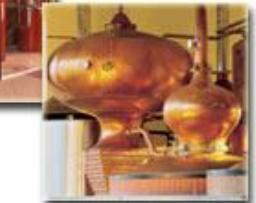


## Financeurs





# MoNARC : MODULATION DES NOTES AROMATIQUES DES CALVADOS



Source IDAC