



MoNARC : MODULATION DES NOTES AROMATIQUES DES CALVADOS

Dynamique des populations microbiennes dans le cidre de distillation



Source IDAC

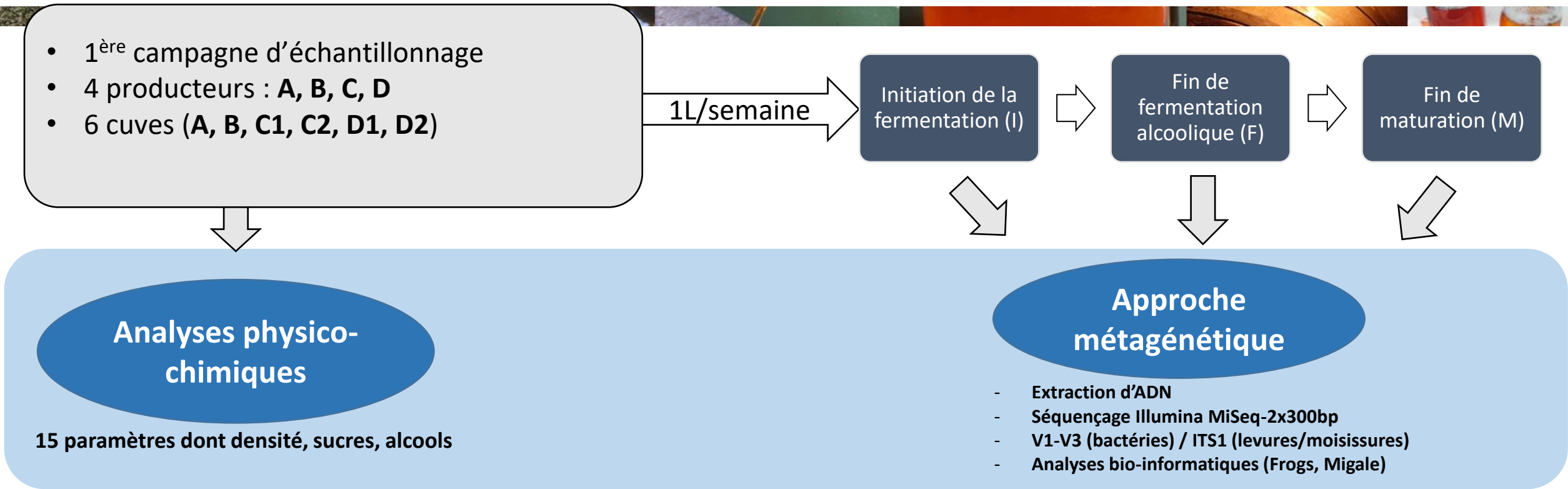


UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE



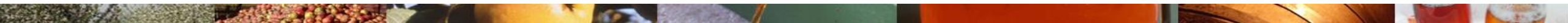
Source IDAC

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



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
D1	Octobre 2017	6 semaines	11 semaines	1200	Sud Manche
D2	Novembre 2017	7 semaines	22 semaines	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.

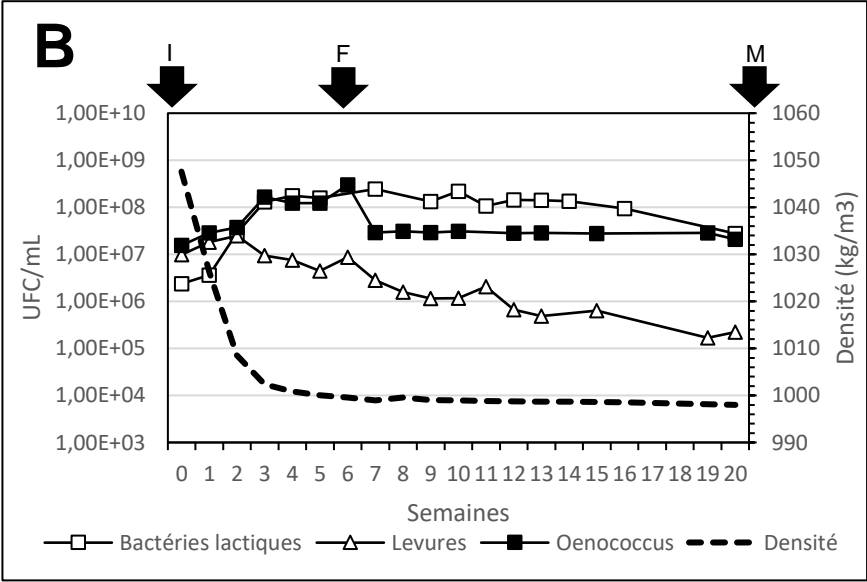
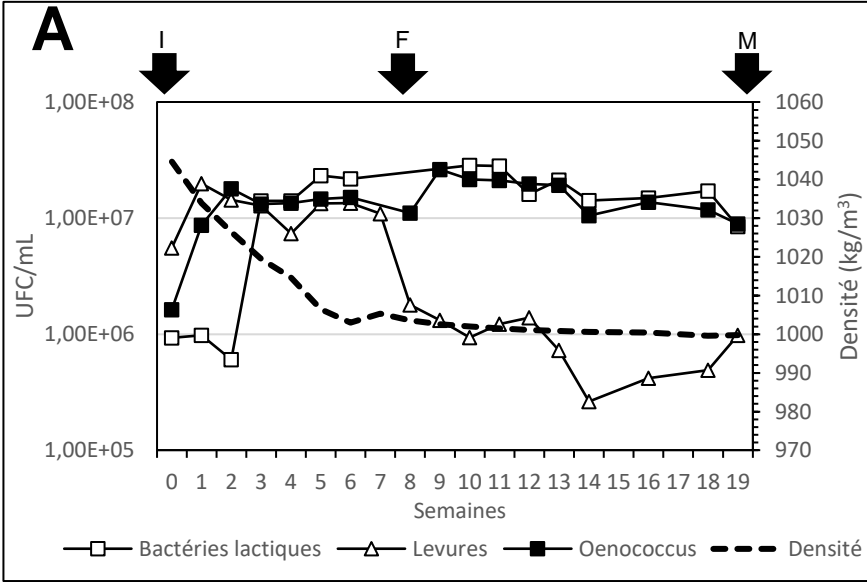


Paramètres		Densité ^b	Fructose ^b	Glucose ^b	Saccharose ^b	Sucres totaux ^b	TAV ^b	Glycérol ^b	pH ^a	Azote ^b	Acidité totale ^b	Acidité volatile ^b	Acide L-malique ^b	Acide L-lactique ^b	Acide D-Lactique ^{ab}
		(kg.m ⁻³)	(g.L ⁻¹)	(g.L ⁻¹)	(g.L ⁻¹)	(g.L ⁻¹ sucrose)	(% v/v)	(g.L ⁻¹)	(UpH)	(mg.L ⁻¹)	(g.L ⁻¹ H ₂ SO ₄)	(g.L ⁻¹ H ₂ SO ₄)	(g.L ⁻¹)	(g.L ⁻¹)	(g.L ⁻¹)
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

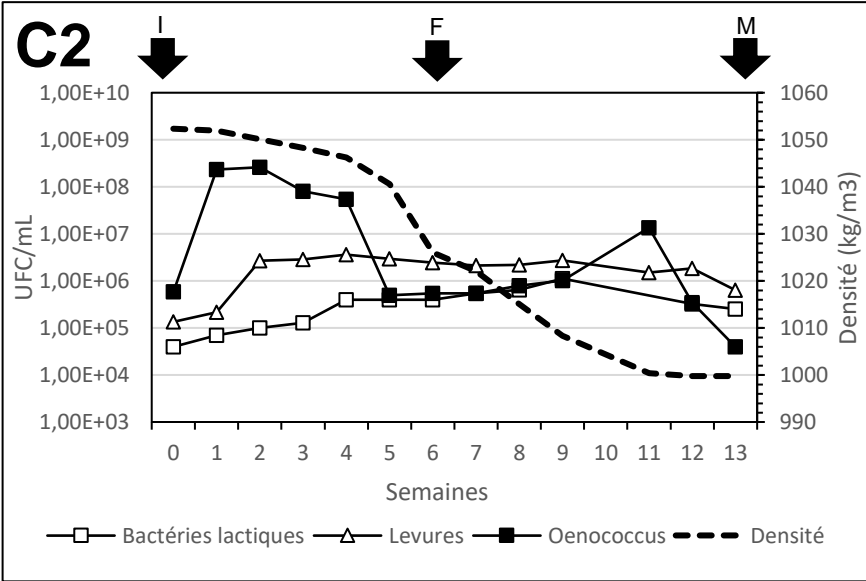
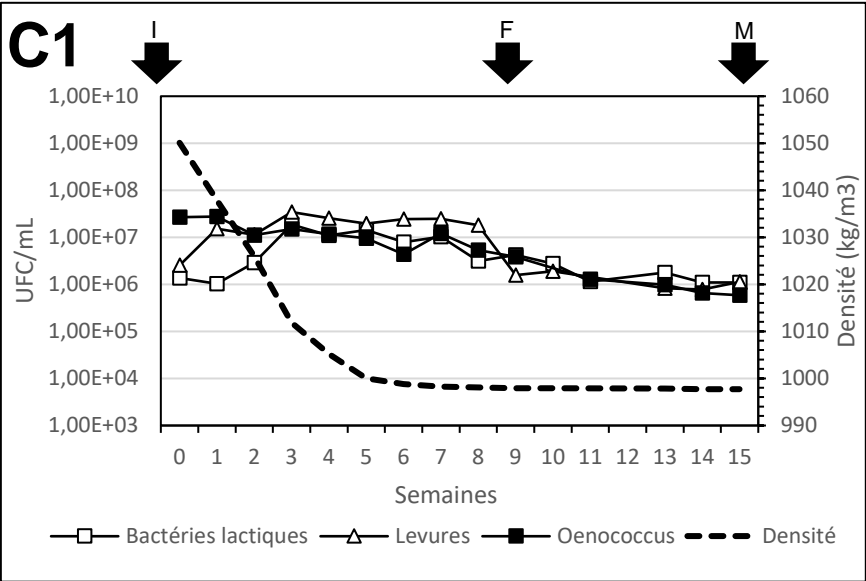
^a Test de Kruskal-Wallis entre cuves. Aucune différence n'est significative à l'exception du pH et de la teneur en acide D-lactique.

^b Test de Friedman entre I, F, M. Seul le pH n'est pas significativement différent.

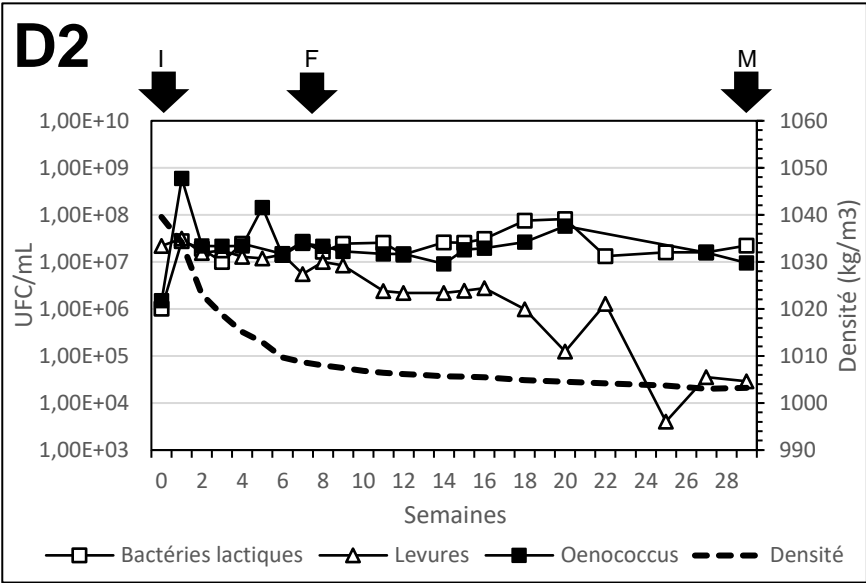
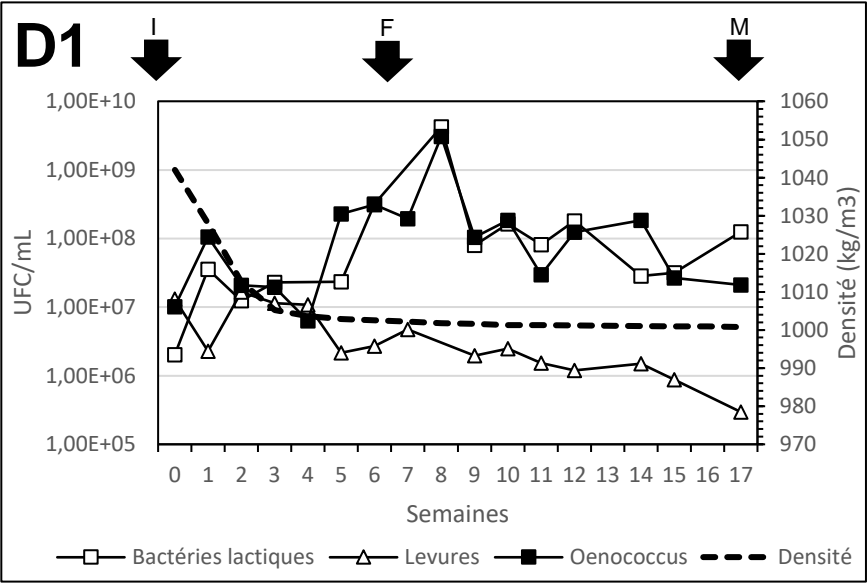
Evolution des populations de bactéries lactiques (□), levures (Δ), oenocoques (■) et de la densité dans les cuves des producteurs A et B.



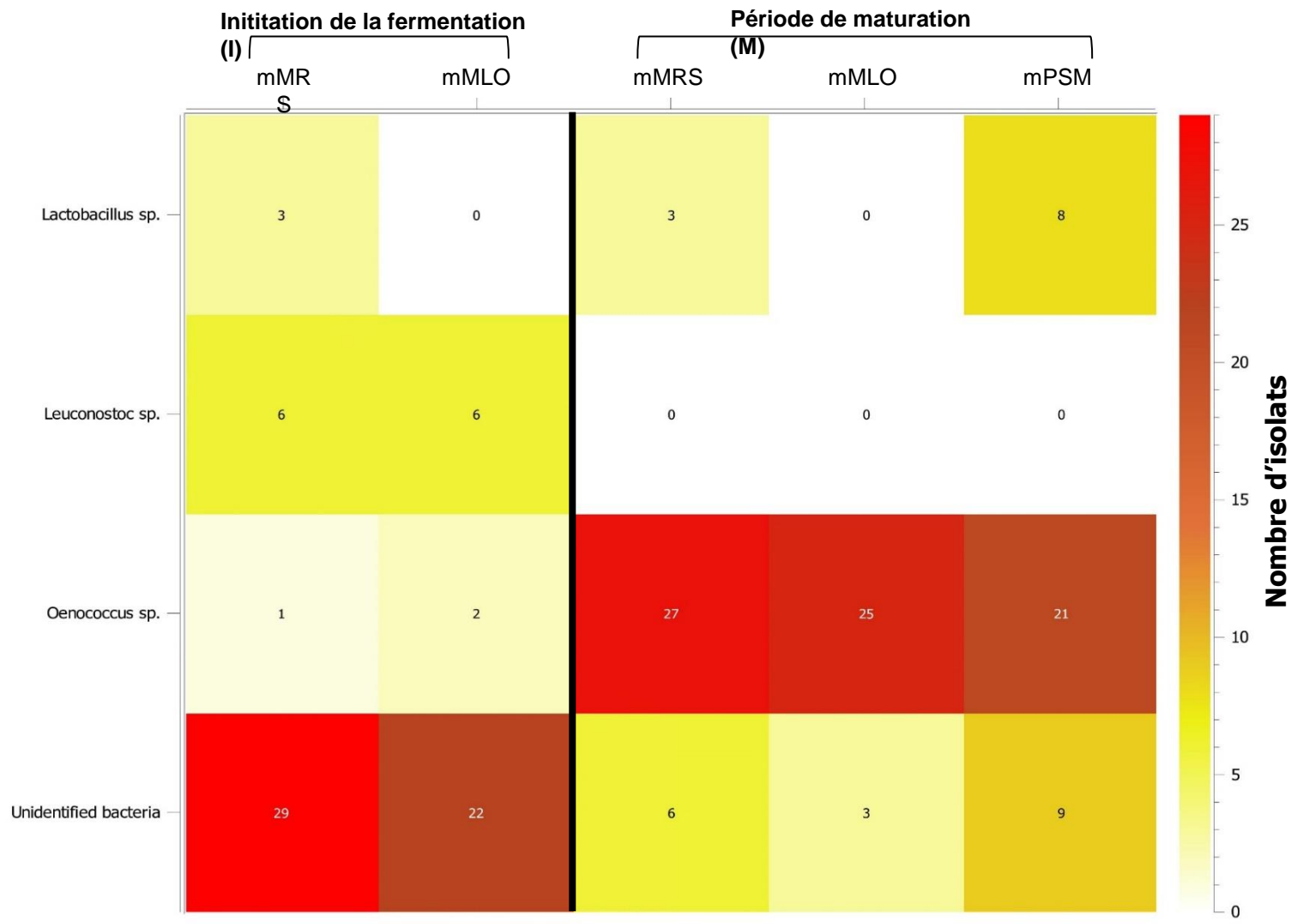
Evolution des populations de bactéries lactiques (□), levures (Δ), oenocoques (■) et de la densité dans les cuves du producteur C.



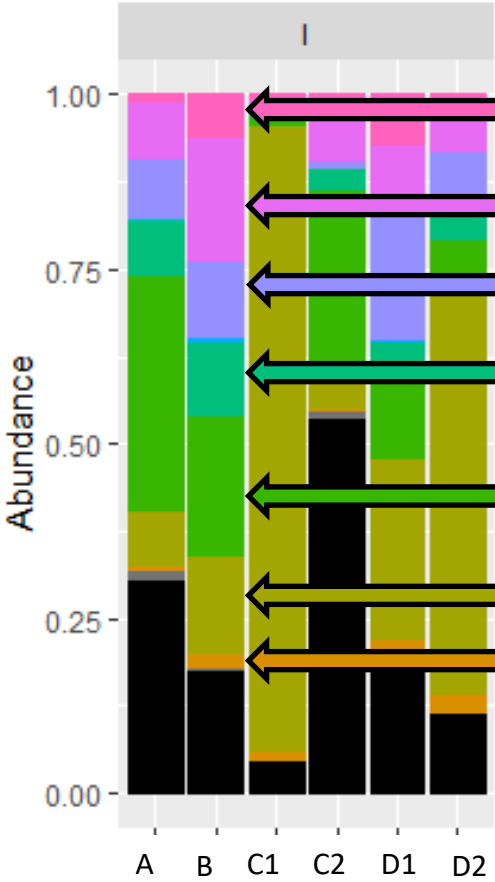
Evolution des populations de bactéries lactiques (□), levures (Δ), oenocoques (■) et de la densité dans les cuves du producteur D.



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



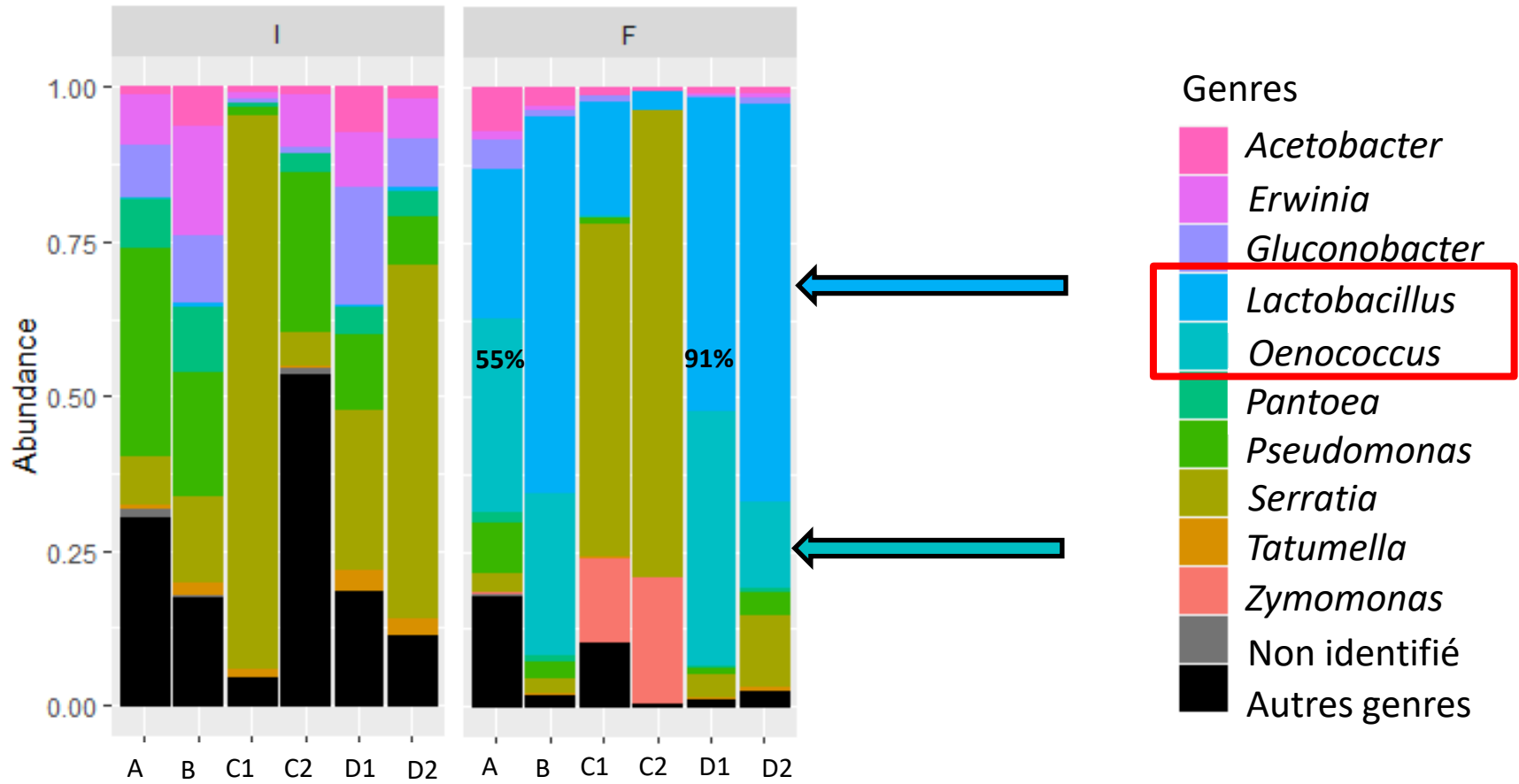
Evolution de la diversité bactérienne des six cidres à distiller



- Genres
- Acetobacter
 - Erwinia
 - Gluconobacter
 - Lactobacillus
 - Oenococcus
 - Pantoea
 - Pseudomonas
 - Serratia
 - Tatumella
 - Zymomonas
 - Non identifié
 - Autres genres

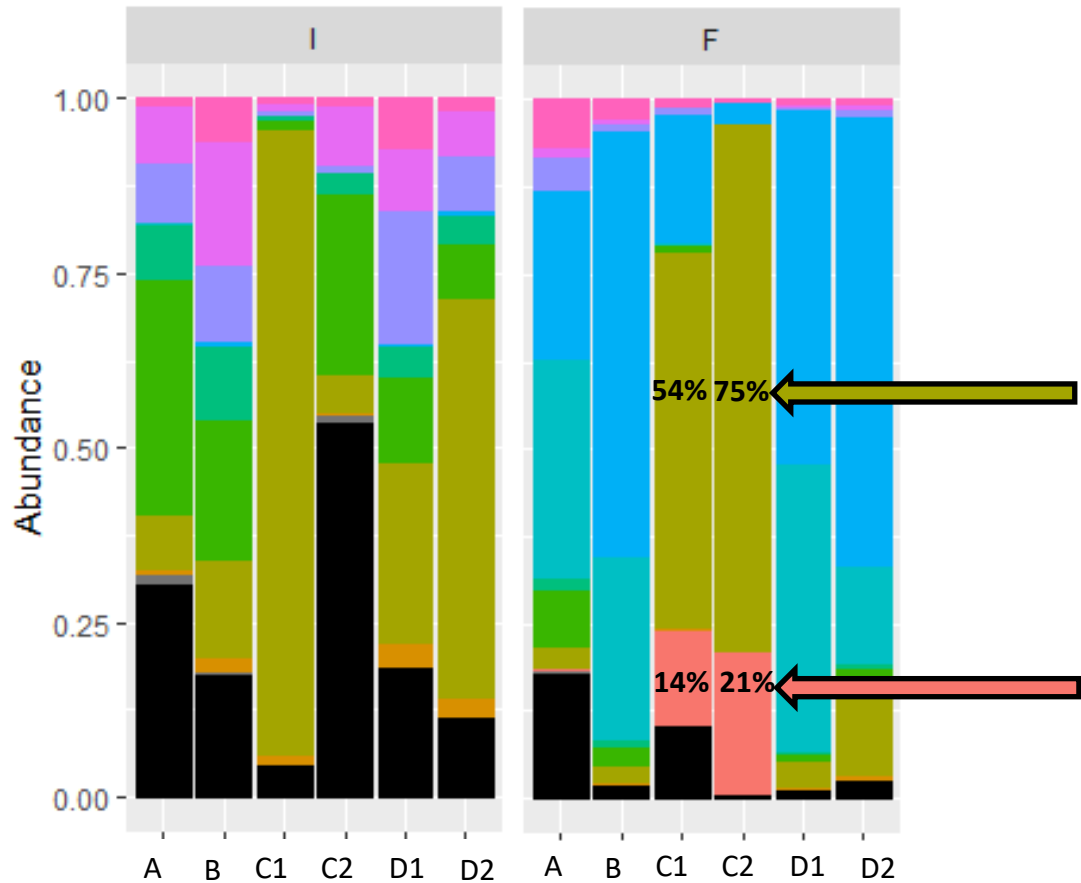
➤ Diversité importante en initiation de fermentation (I) (40 genres bactériens)

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%)

Evolution de la diversité bactérienne des six cidres à distiller



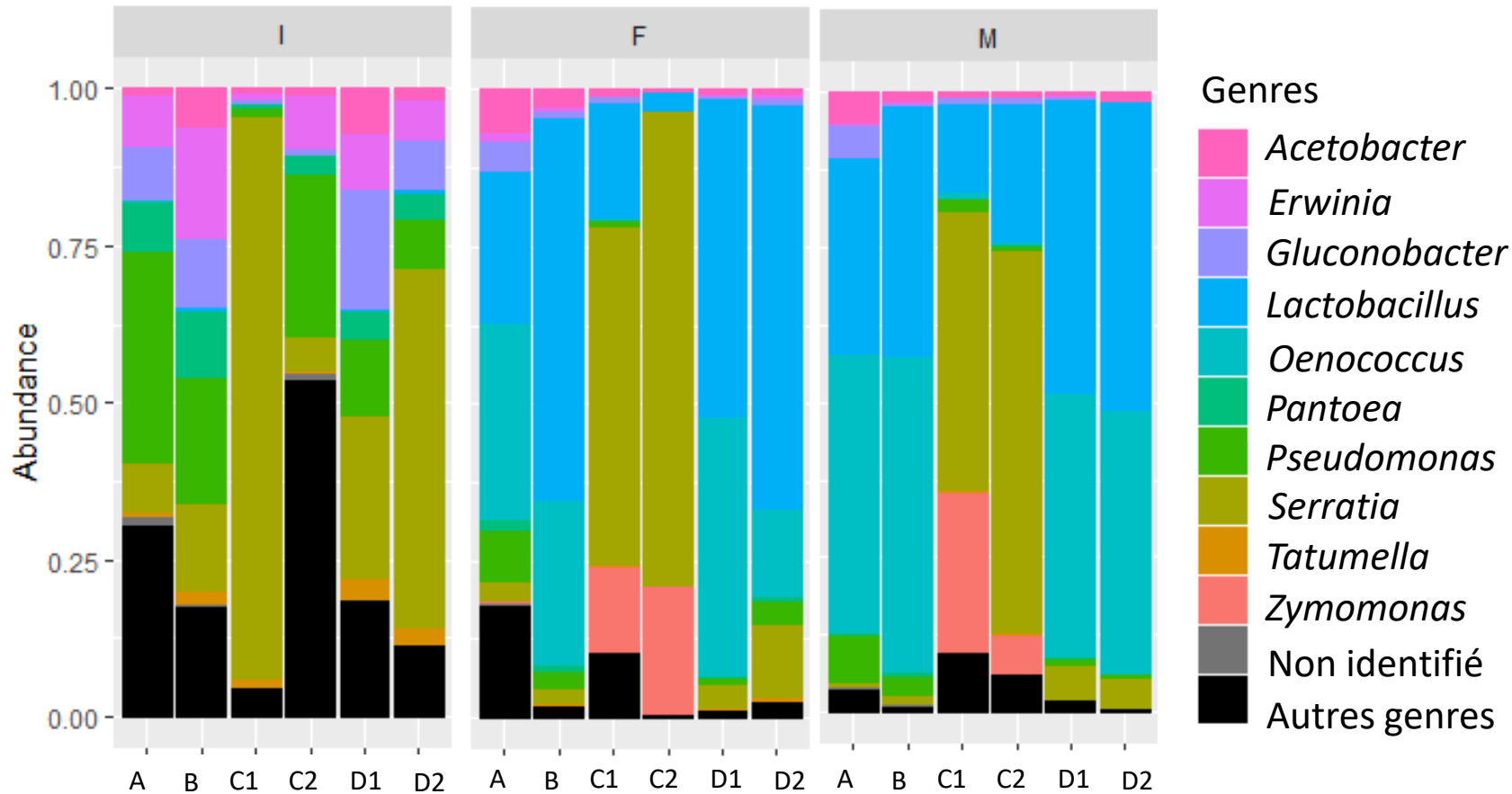
➤ Diversité importante en initiation de fermentation (I) (40 genres bactériens)

➤ Erosion de la diversité entre I et F

➤ Prédominance des bactéries lactiques (55% à 91%)

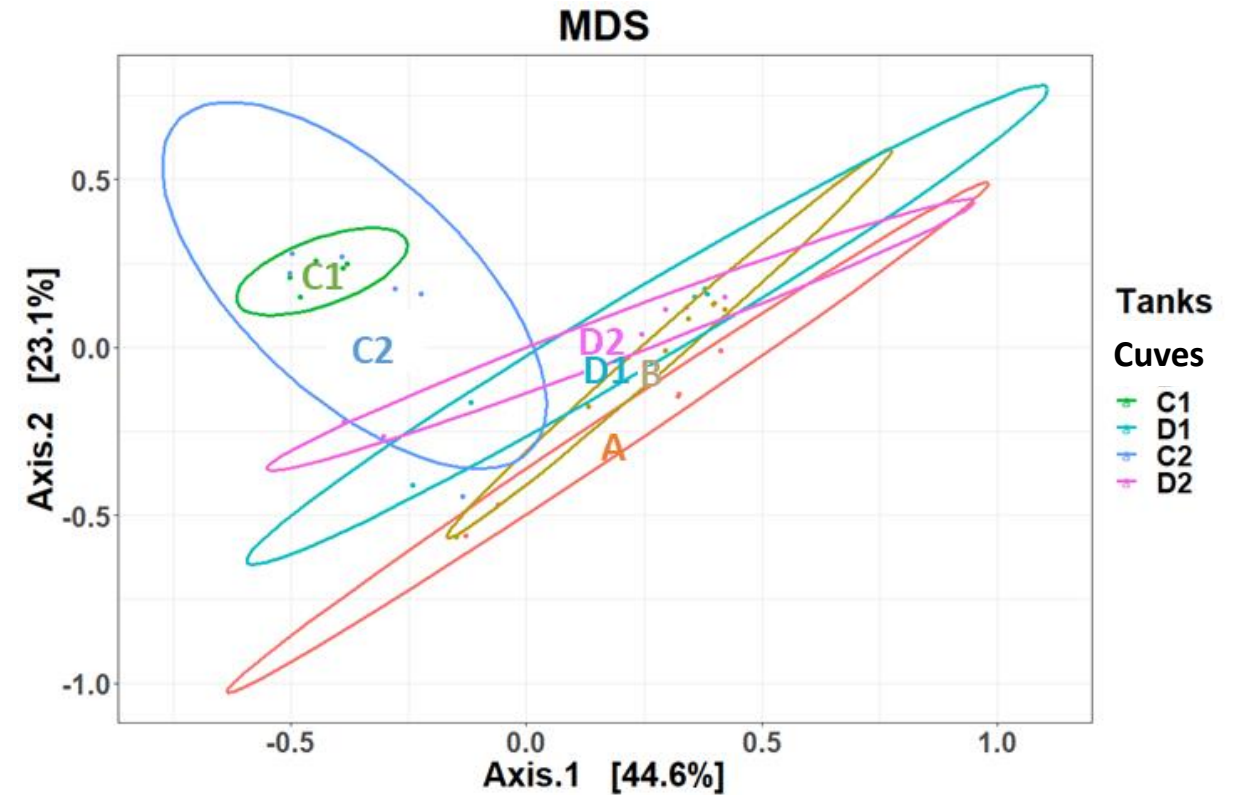
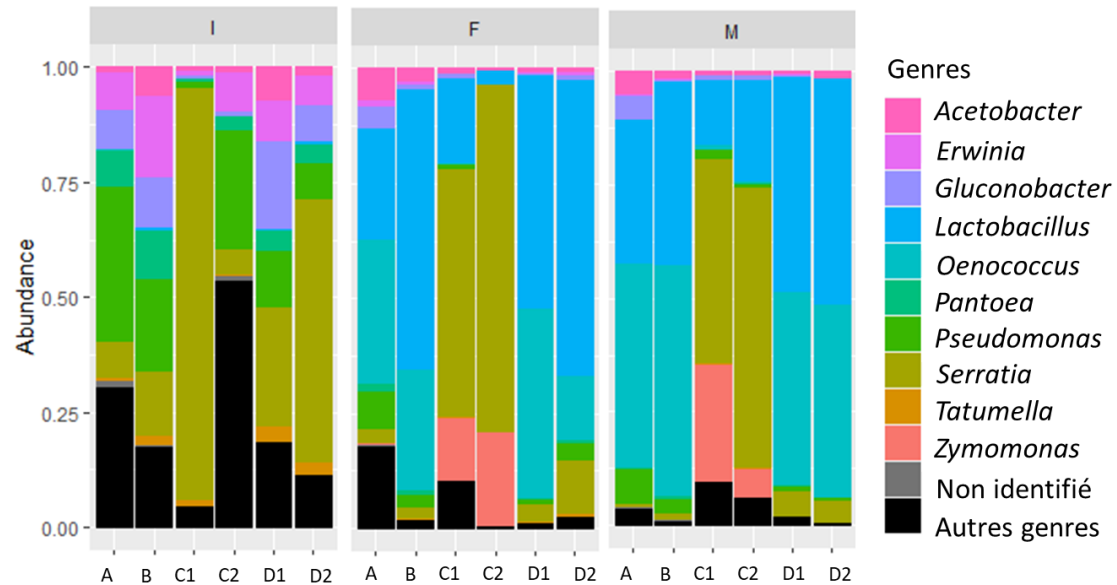
➤ Prédominance de *Serratia* sp. (54% à 75%) et *Zymomonas* sp. (14% à 21%)

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%)
- Faible variation de la composition bactérienne au point de maturation (M)

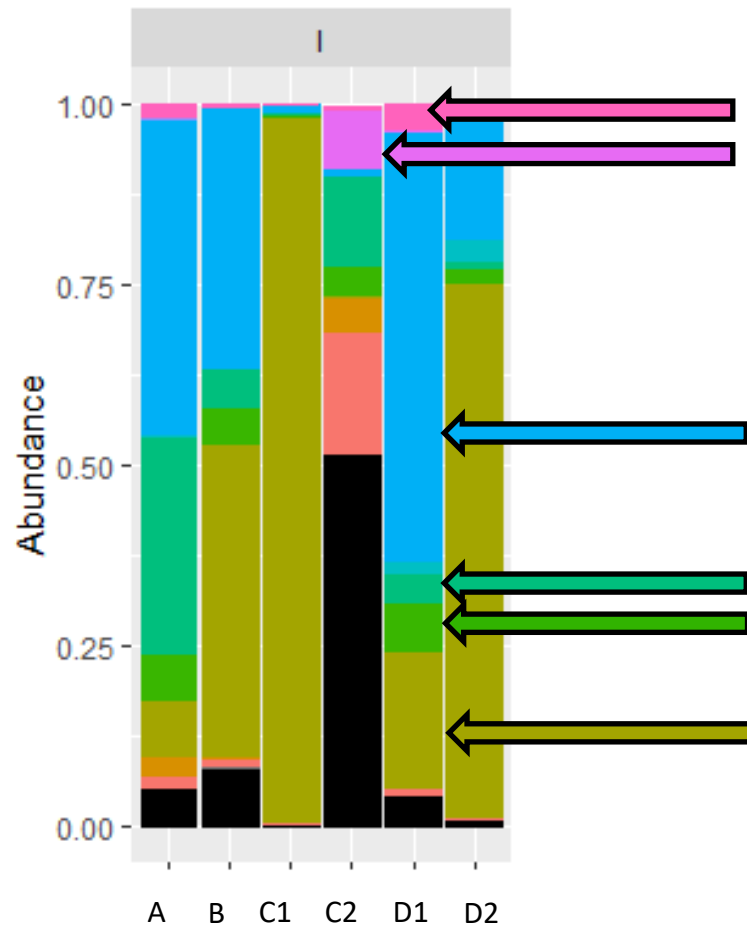
Distribution des cuves en fonction de la composition bactérienne des cidres



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



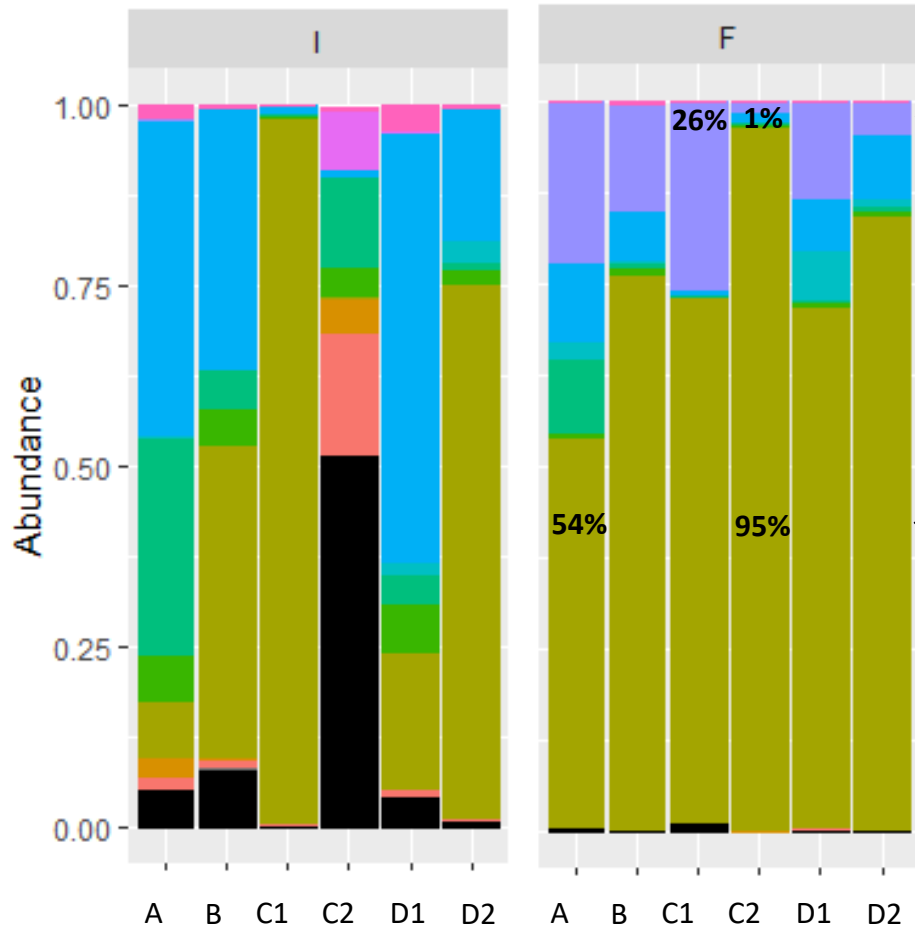
Genres



➤ 48 genres levuriens retrouvés dans l'analyse

➤ Non-Saccharomyces et Saccharomyces majoritaires en initiation de fermentation (I)

Evolution de la diversité levurienne des six cidres à distiller



Genres

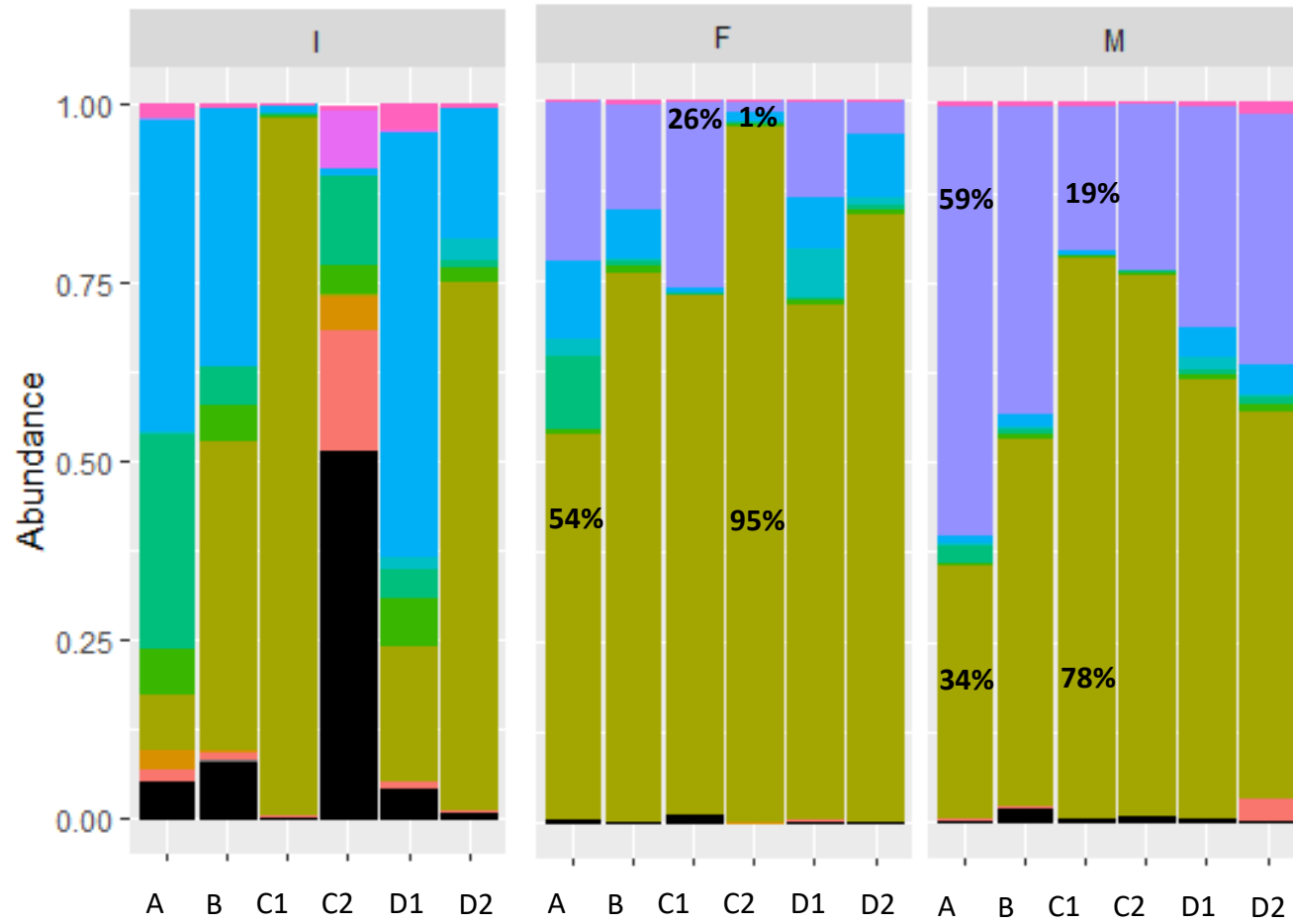
- Candida
- Cryptococcus
- Dekkera
- Hanseniaspora
- Kazachstania
- Metschnikowia
- Pichia
- Saccharomyces
- Sarocladium
- Non identifié
- Inconnu
- Autres genres

➤ 48 genres levuriens retrouvés dans l'analyse

➤ Non-Saccharomyces et Saccharomyces majoritaires en initiation de fermentation (I)

➤ Saccharomyces sp. majoritaire (54%-95%) en F

Evolution de la diversité levurienne des six cidres à distiller



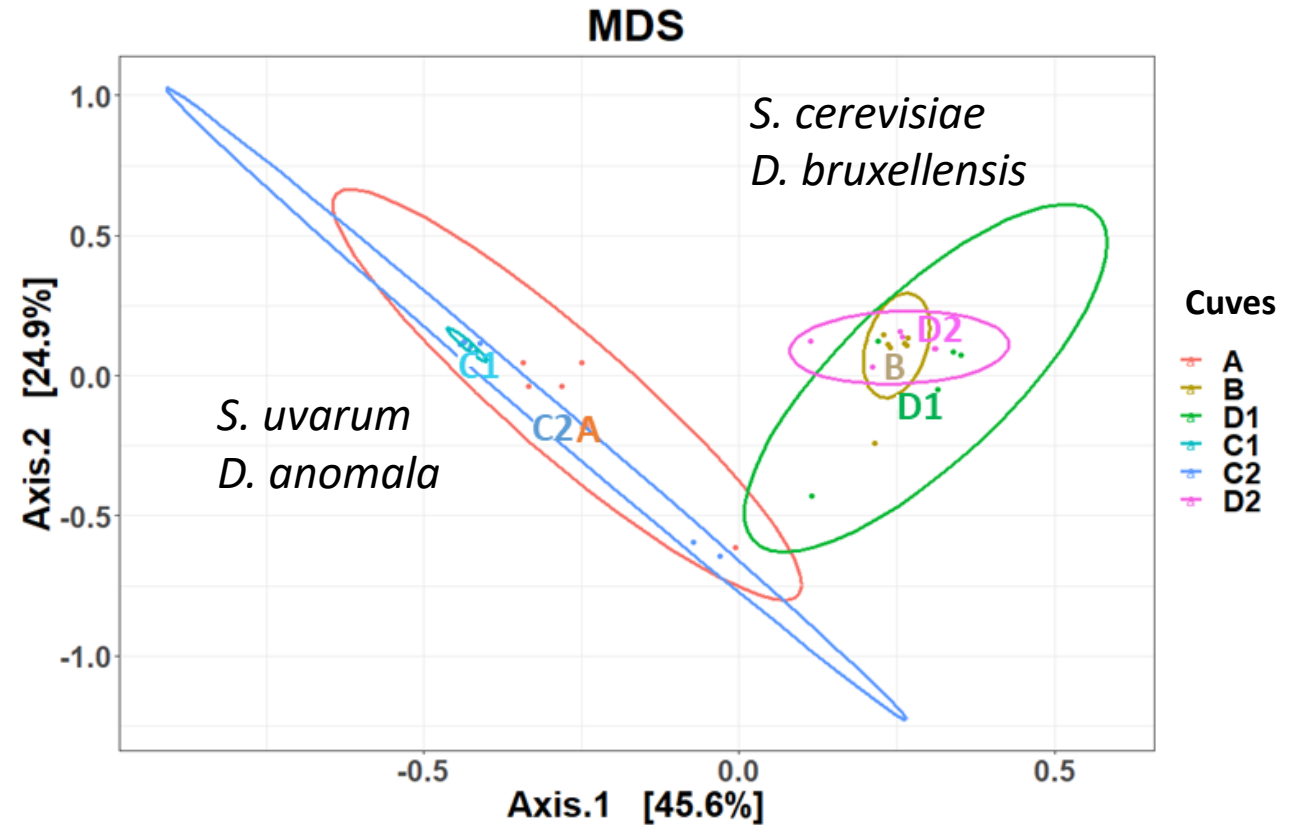
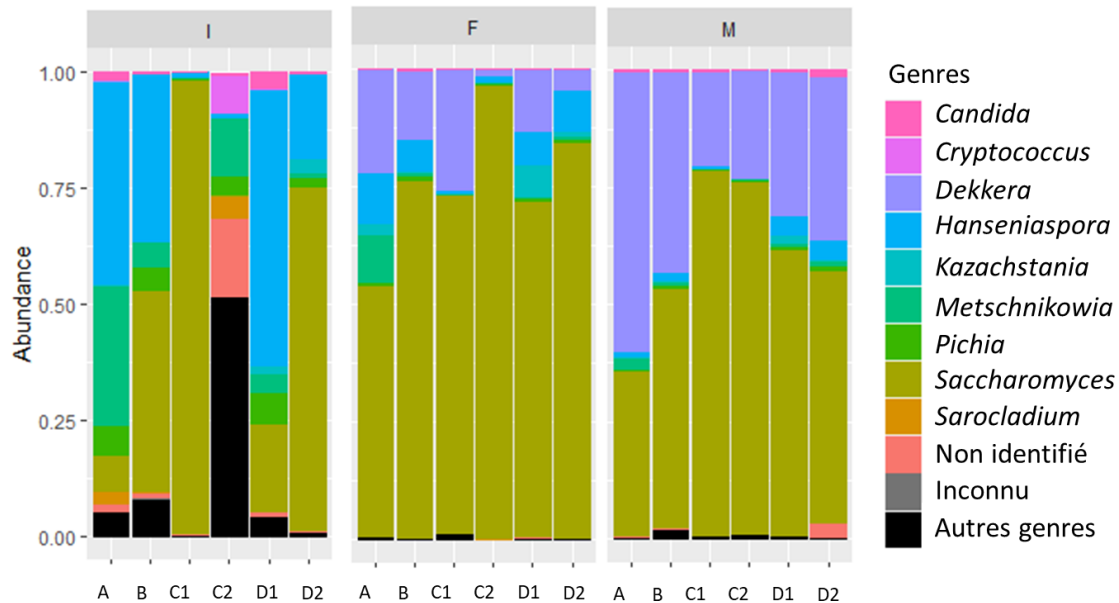
➤ 48 genres levuriens retrouvés dans l'analyse

➤ Non-*Saccharomyces* et *Saccharomyces* majoritaires en initiation de fermentation (I)

➤ *Saccharomyces* sp. majoritaire (54%-95%) en F

➤ Augmentation de la proportion de *Dekkera* sp. en fin de maturation (19 – 59 %)

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^{ère} 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

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
D1	Octobre 2017	6 semaines	11 semaines	1200	Sud Manche
D2	Novembre 2017	7 semaines	22 semaines	1200	Sud Manche

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

- 1^{ère} / 2^{ème} 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)

Micro-distillation

Micro-distillation

**Analyses physico-
chimiques**

15 paramètres dont densité, sucres, alcools

**Analyse
aromatique**

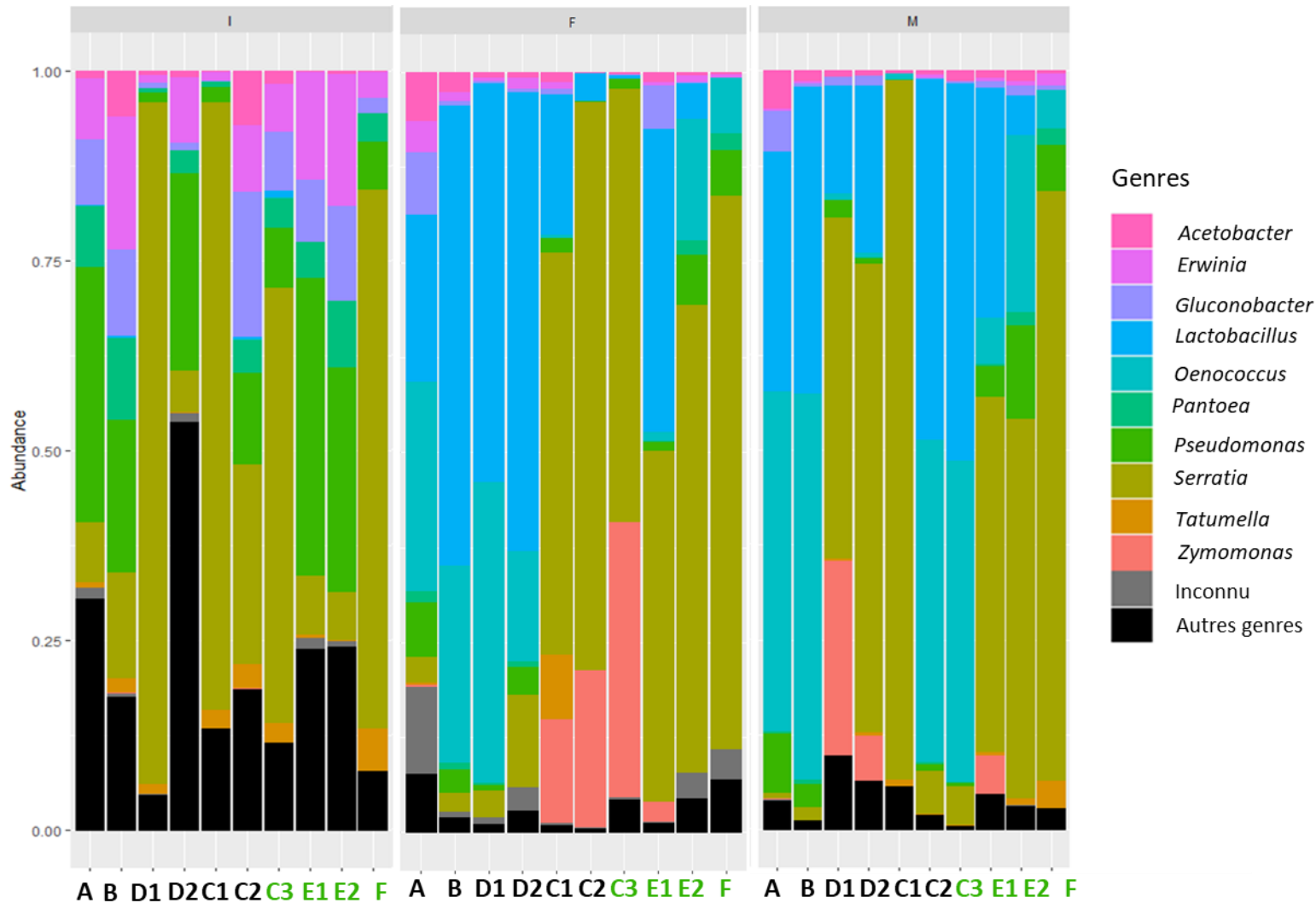
16 arômes analysés (cidres de distillation)
45 arômes analysés (distillats)
(GC-MS, GC-FID, HPLC-UV-DAD)

**Approche
métagénétique**

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

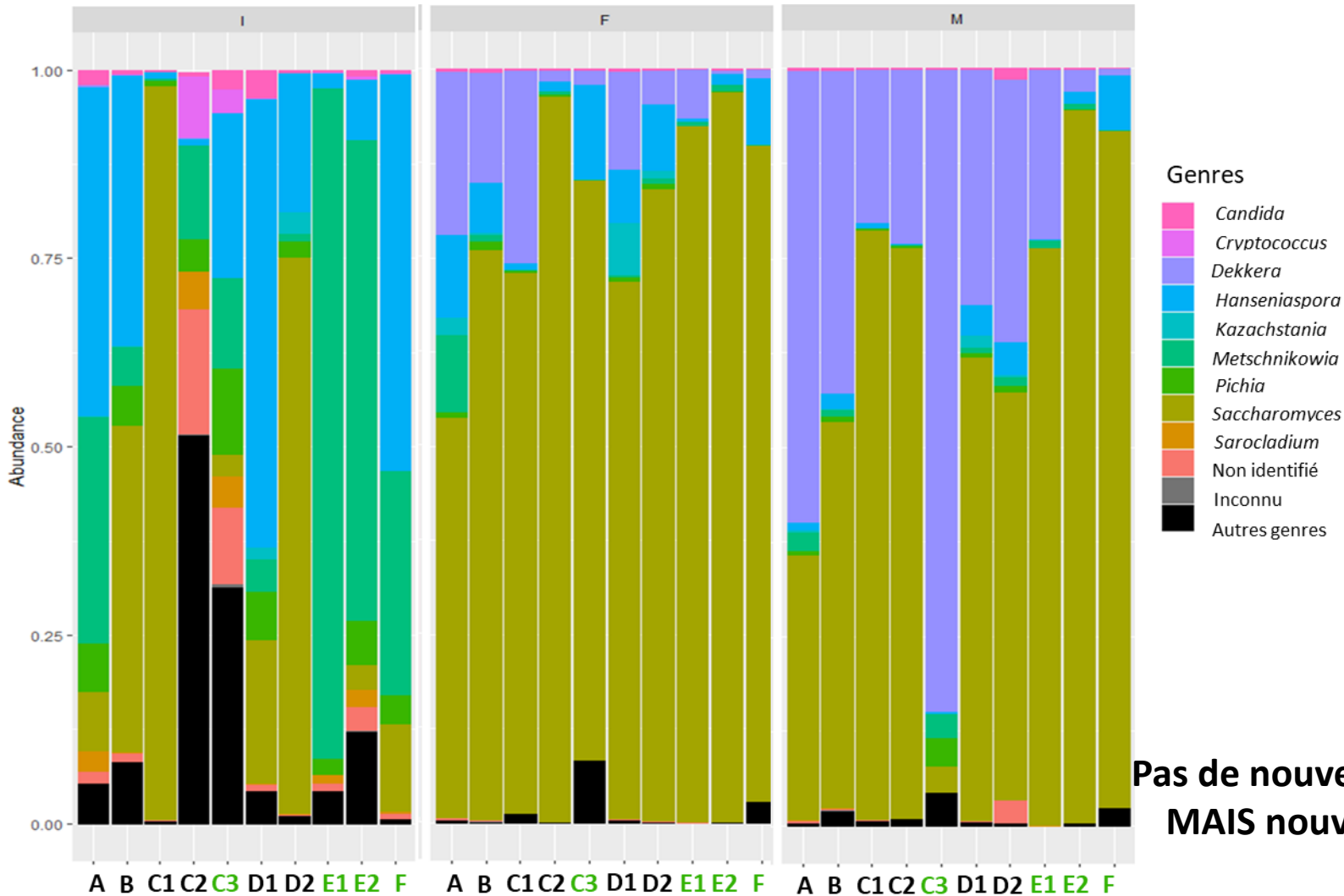
Cuves	Date d'initiation de la fermentation (I)	Durée de fermentation alcoolique (F)	Durée de la période de maturation (M)	Volume (hL)	Localisation
A	Octobre 2017	8 semaines	11 semaines	7500	Pays d'Auge. Calvados
B	Octobre 2017	6 semaines	14 semaines	1300	Pays d'Auge. Orne
C1	Octobre 2017	9 semaines	6 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^{ère} 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

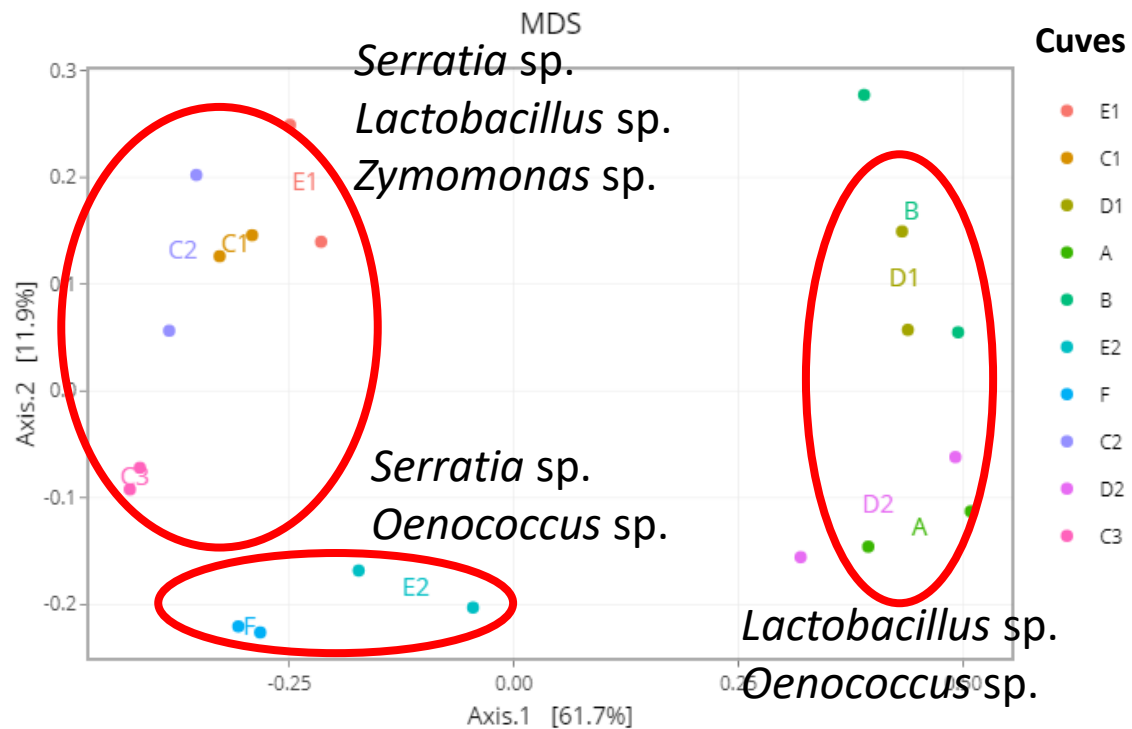
Dynamiques levuriennes des cidres à distiller



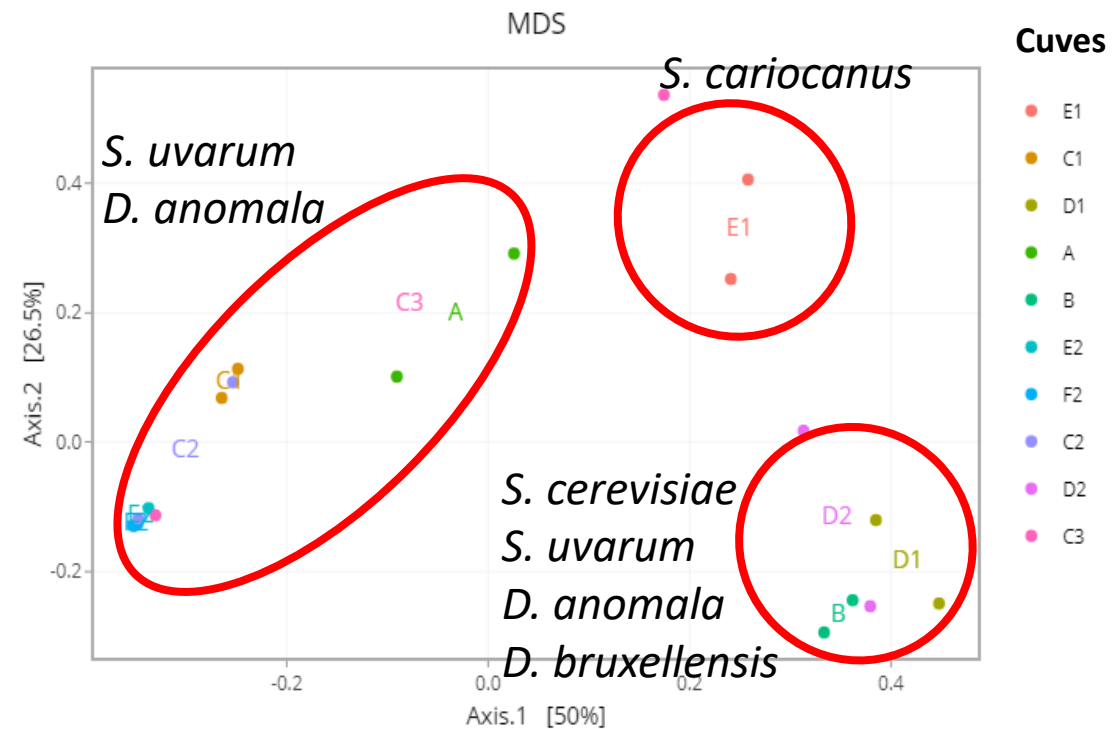
- ☐ Diversité et dynamiques observées rejoignent la 1^{ère} analyse
- ☐ Nouveaux profils similaires à ceux des cuves C1/C2
- ☐ Peu de bactéries lactiques et grande proportion en *Serratia* sp. pour les 4 nouvelles cuves
- ☐ Echantillonnage met fin à l'exceptionnalité du producteur C
- *Saccharomyces* sp. majoritaires en F
- Augmentation de la proportion en *Dekkera* sp. en fin de maturation

**Pas de nouveaux genres de levures et bactéries identifiés
MAIS nouvelles distributions des cuves associées aux genres et espèces microbiens**

Distribution des cuves en fonction de la composition microbienne

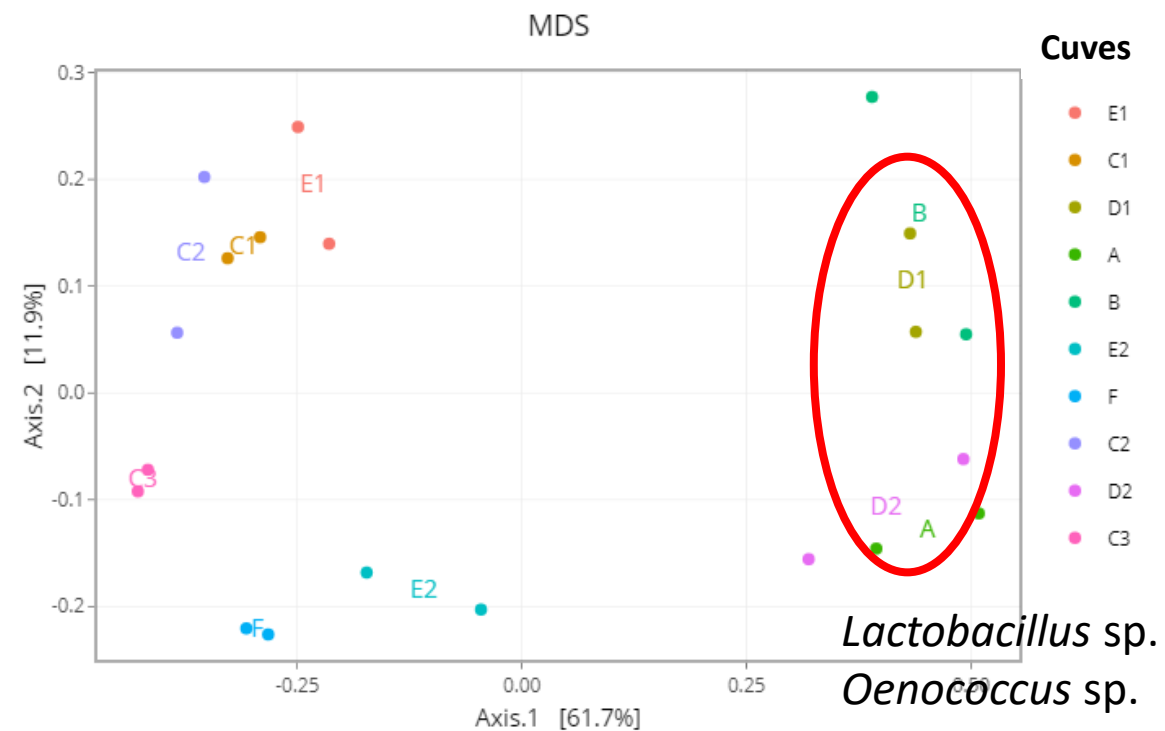
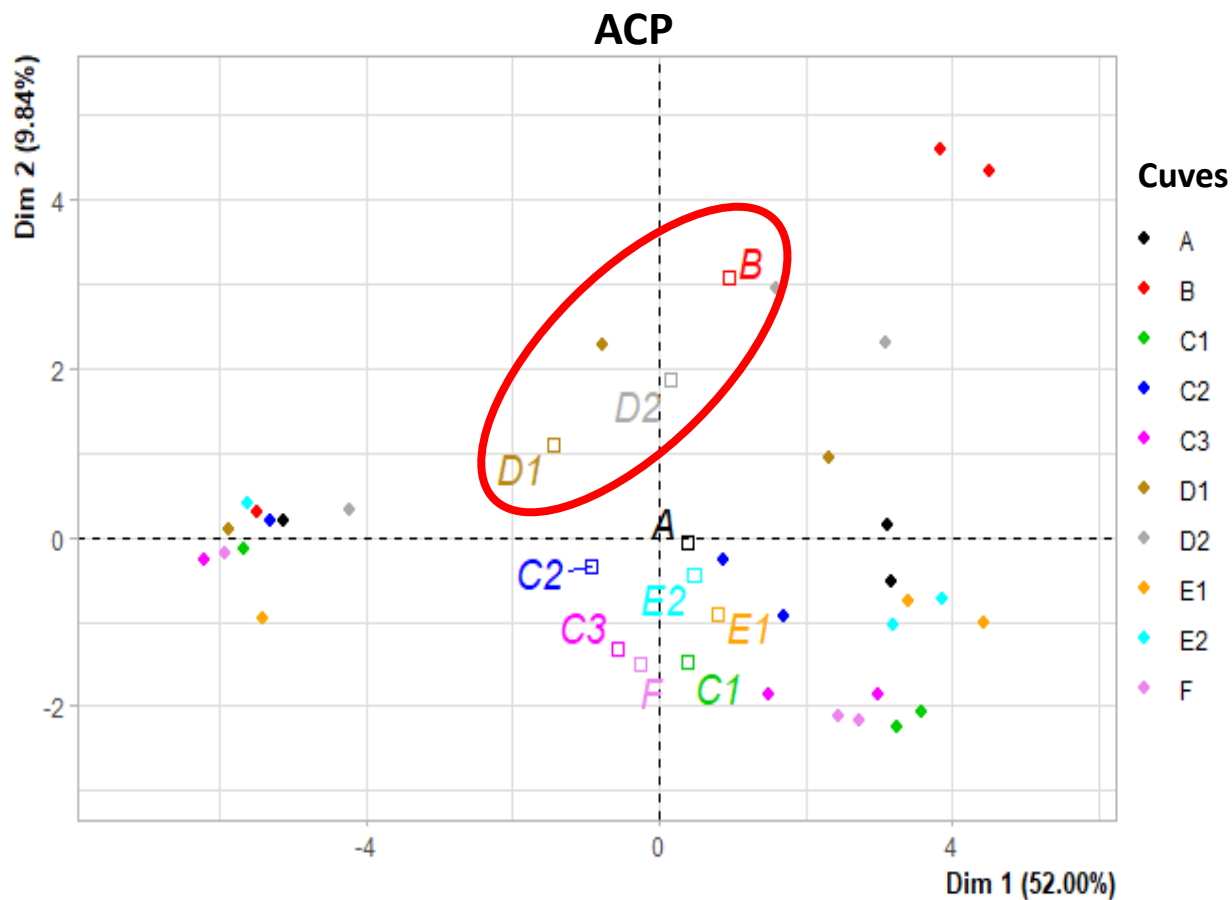


Les cuves se distinguent par leurs proportions en *Serratia sp.*, *Zymomonas sp.*, *Lactobacillus sp.* et *Oenococcus sp.*



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

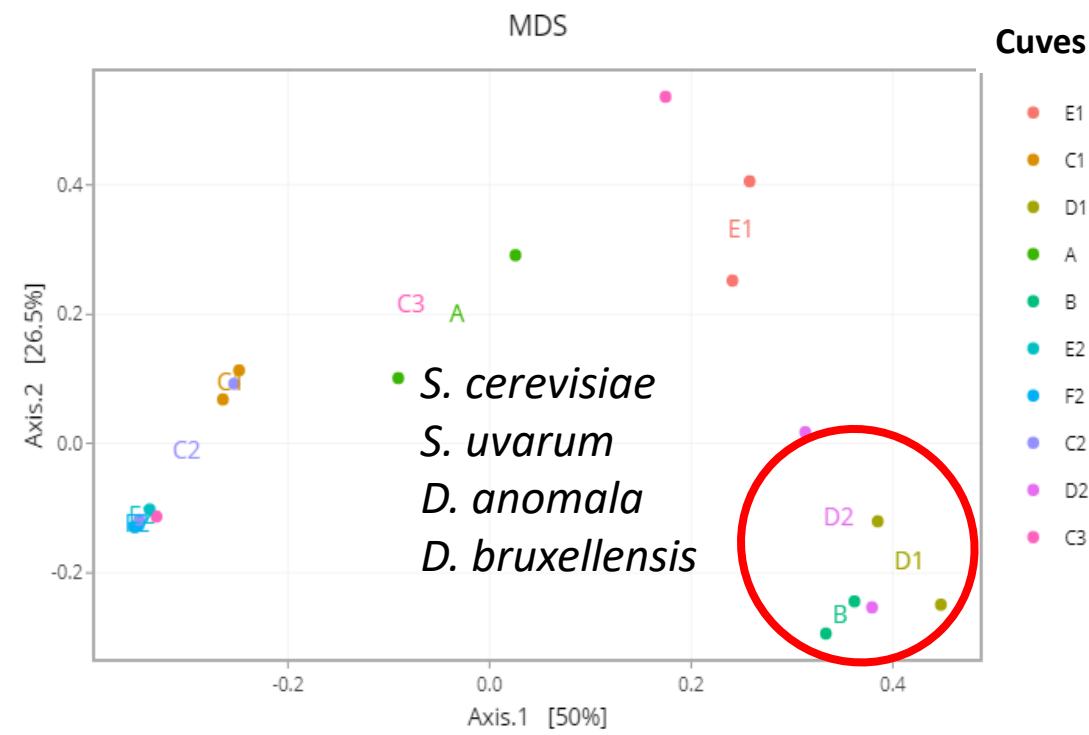
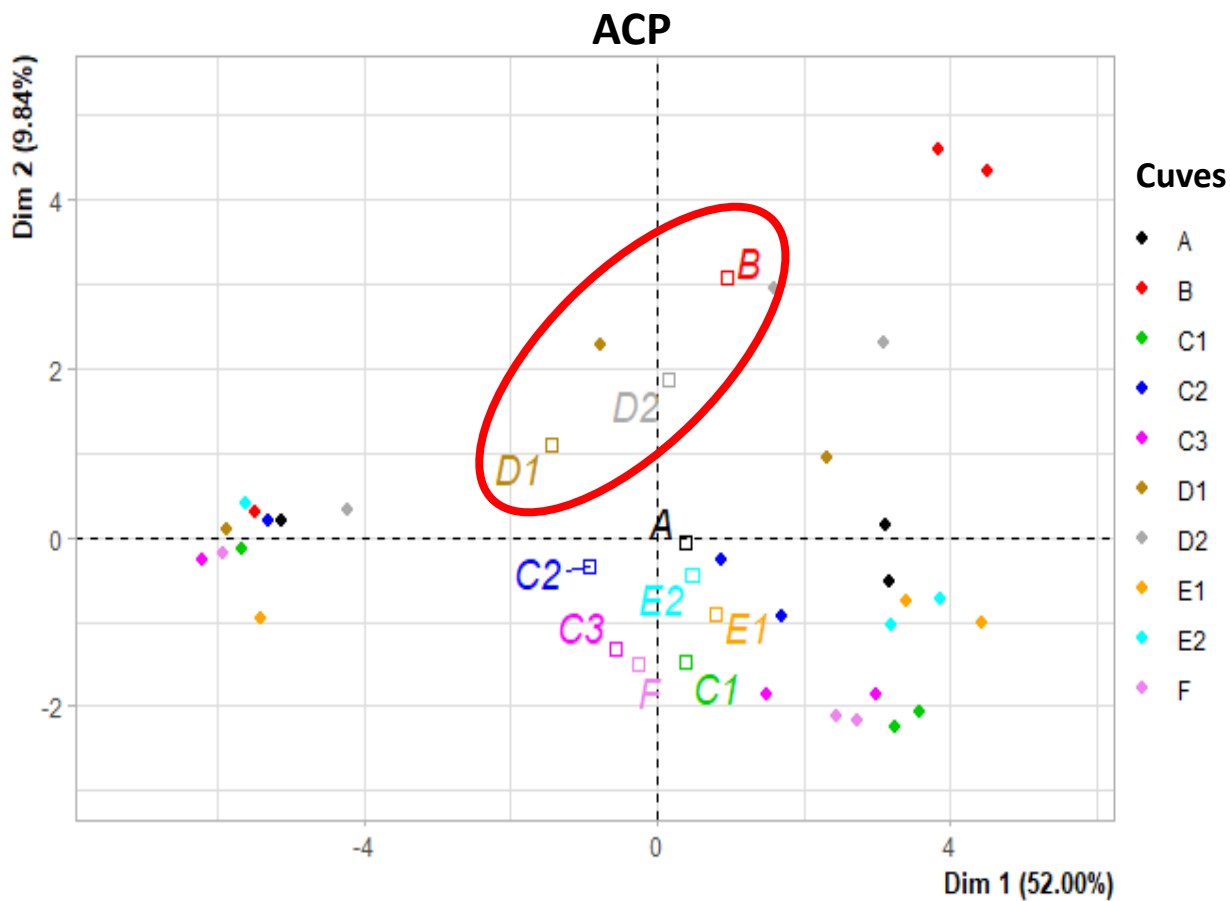
Distribution des cuves selon la composition aromatique des 10 cidres de distillation



Composition bactérienne

- ➡ 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

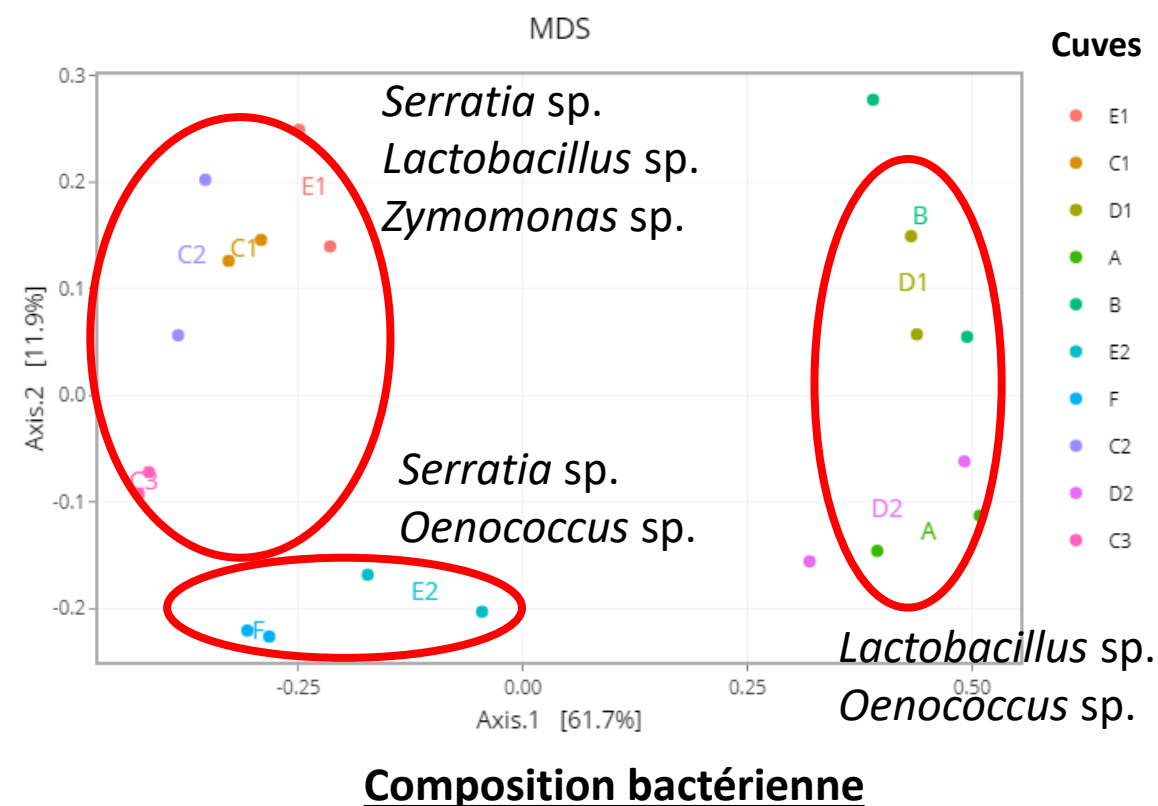
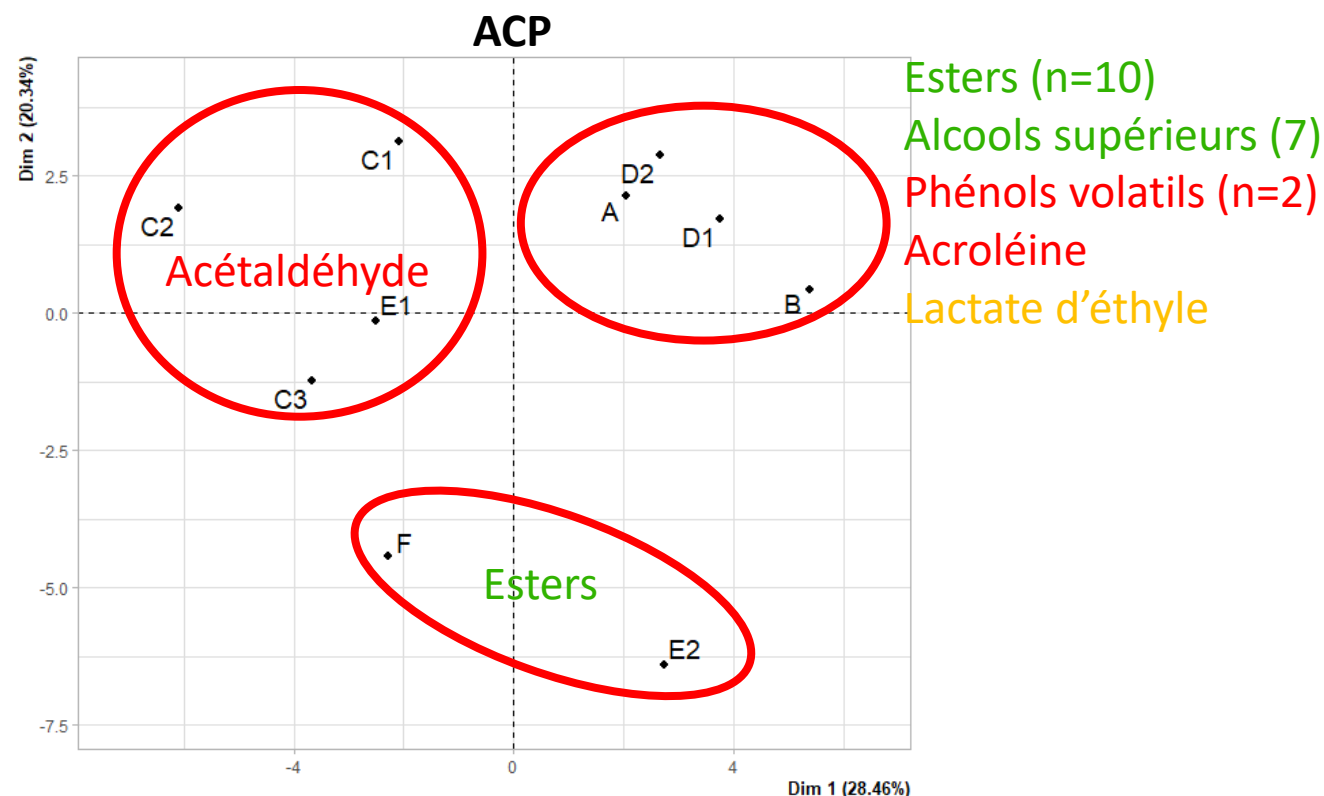
Distribution des cuves selon la composition aromatique des 10 cidres de distillation



Composition levurienne

- 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

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'hexyle 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

Partenaires



Entreprises



Financeurs



Expertise & Prestataires

INRAE, AgroParis Tech, ESA, ARAC



MoNARC : MODULATION DES NOTES AROMATIQUES DES CALVADOS



Source IDAC



Source IDAC

