



**HAL**  
open science

## Influence des fermentations alcoolique et malolactique sur la composition chimique des cidres à distiller en cours d'élaboration.

Herrero Marie

► **To cite this version:**

Herrero Marie. Influence des fermentations alcoolique et malolactique sur la composition chimique des cidres à distiller en cours d'élaboration.. Autre. Université de Caen, 2011. Français. NNT : . tel-00631021

**HAL Id: tel-00631021**

**<https://theses.hal.science/tel-00631021>**

Submitted on 11 Oct 2011

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE de CAEN BASSE-NORMANDIE**



**UFR : IUT de CAEN**



**ECOLE DOCTORALE NORMANDE de CHIMIE**

**THESE**

Présentée par

**Marie HERRERO**

Et soutenue

**Le 2 Septembre 2011**

En vue de l'obtention du

**DOCTORAT de l'UNIVERSITÉ de CAEN**  
**Spécialité : Chimie Théorique, Physique, Analytique**

Arrêté du 07 août 2006

**INFLUENCE DES FERMENTATIONS  
ALCOOLIQUE ET MALOLACTIQUE  
SUR LA COMPOSITION CHIMIQUE  
DES CIDRES A DISTILLER EN COURS D'ELABORATION**

M. Gilles de REVEL, Professeur, Université de Bordeaux (rapporteur)  
Mme Catherine RENARD, Directrice de Recherche, INRA d'Avignon (rapporteur)  
M. Juan José MANGAS, Docteur, SERIDA, Villaviciosa, Espagne  
M. Hugues GUICHARD, Docteur, ADRIA Normandie, Villers-Bocage  
M. Jérôme LEDAUPHIN, Maître de conférences, Université de Caen  
M. Daniel BARILLIER, Professeur Emerite, Université de Caen (directeur de thèse)



## REMERCIEMENTS

Je dois remercier **Daniel Barillier**, le Professeur responsable de ma thèse et **Jérôme Ledauphin** le maître de conférences qui m'a suivi pendant ces quatre ans. Connaissances et savoir-faire expérimentaux, ont été leurs principales qualités qui m'ont aidé pendant cette étude. Je dois aussi mentionner que leur expérience dans l'enseignement m'a bien servie durant mes vacances et mon service d'ATER au sein de l'IUT GC/GP de Caen.

Je remercie sincèrement **Hugues Guichard**, qui malgré son emploi du temps fortement chargé m'a aidé à la rédaction d'une partie des résultats ainsi que mes deux rapporteurs, **Gilles de Revel** et **Catherine Renard** grâce à qui j'ai amélioré ma réflexion. Ils ont pris de leur temps pour me faire part des corrections à apporter et j'ai ainsi pu produire une version améliorée du manuscrit.

Mes plus sincères remerciements sont pour l'ensemble du **personnel de la BU**, qui est toujours disponible, aimable et efficace et très compétant. Pendant ces 4 années de travaux, j'ai toujours pu compter sur les documentalistes.

Cette étude n'aurait pas pu se faire sans la participation précieuse des producteurs de Calvados. Je tiens donc à remercier chaleureusement **François et Stéphane Grandval** du Manoir de Grandouet, **Tangi Leroy** et **Henry Vauvrecy** de la Ferme de Billy et enfin **Gaétan Delamare** et **M. Terlier** de la distillerie Busnel.

Un remerciement pour **Olivier Cantat** du Géophen qui m'est venu en aide pour accéder aux données de MétéoFrance.

Un grand merci aussi à **Benoit Basset**, **Mélanie Lemoine** et **Nathalie Duparc**, nos trois techniciens qui étaient là pour m'apporter de l'aide. Leurs compétences et leur rigueur ont vraiment amélioré mon travail au laboratoire. C'est un plaisir de manipuler avec eux.

Enfin je remercie et non sans une sincérité certaine, **l'ensemble du personnel** du laboratoire pour la bonne ambiance, les repas animés et les pauses cafés-débat.



**INTRODUCTION ..... 9**

**CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE ..... 13**

**ELABORATION DU CIDRE ET DE L'EAU DE VIE DE CIDRE..... 14**

1. Le cidre de consommation .....	14
1.1. Production cidricole au Royaume-Uni.....	15
1.2. Production de cidre en Espagne .....	17
1.3. Production cidricole en France .....	18
1.4. Principales différences entre les productions anglaises, espagnoles et françaises .....	20
2. L'eau de vie de cidre.....	21
2.1. Le cidre à distiller .....	22
2.2. La distillation .....	22
2.3. Le vieillissement.....	22

**LES PRINCIPAUX PROCÉDÉS FERMENTAIRES RESPONSABLES DE LA TRANSFORMATION DU MOÛT DE POMMES EN CIDRE ..... 24**

3. La fermentation alcoolique.....	24
3.1. Les non- <i>Saccharomyces</i> .....	24
3.2. Les <i>Saccharomyces</i> .....	26
3.3. Conclusion.....	27
4. La fermentation malolactique .....	28
4.1. Les bactéries lactiques du cidre .....	29
4.2. La production d'acide lactique .....	31

**LES FACTEURS D'INFLUENCE DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE ET DE LA FERMENTATION MALOLACTIQUE ..... 33**

5. Les facteurs matériels et issus des pratiques cidricoles .....	33
5.1 Le fruit.....	33
5.2 Le système de presse.....	34
5.3 La macération .....	36
5.4 La température .....	37
5.5 Le sulfitage.....	37
5.6 La clarification.....	38
5.7 Les cuves .....	38
5.8 La maturation en bouteille .....	39

**CHANGEMENTS DANS LE MILIEU SUITE AUX FERMENTATIONS..... 40**

6. Changements issus de la fermentation alcoolique.....	40
6.1. Les paramètres de base .....	40
6.2. Les acides organiques .....	42

6.3. Le glycérol.....	44
6.4. Les composés volatils.....	46
7. Modifications chimiques lors de la fermentation malolactique.....	53
7.1. Les acides organiques.....	54
7.2. La composition volatile.....	55
8. Incidence de la chronologie des deux fermentations sur la composition du moût.....	58
8.1. Fermentations séquentielles.....	58
8.2. Fermentations simultanées.....	60

## **DÉRIVES ET EXCÈS DES DEUX PROCÉDÉS FERMENTAIRES..... 62**

9. Dérives et excès des deux procédés fermentaires.....	62
9.1. La piqûre lactique.....	62
9.2. La dégradation du glycérol et la piqûre acroléique.....	63
9.3. La maladie de la graisse.....	64
9.4. Le « framboisé ».....	64
9.5. La piqûre acétique.....	65
9.6. Les phénols volatils.....	65

## **CONCLUSION..... 67**

## **CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES..... 71**

### **MISE EN ŒUVRE DE L'ÉTUDE..... 72**

10. Producteurs et sites sélectionnés.....	72
10.1. Caractéristiques des sites de production.....	72
10.2. Echantillonnage, prélèvements des moûts.....	74
10.3. Analyse des échantillons prélevés.....	76

### **DOSAGE DES ACIDES ORGANIQUES..... 77**

11. Traitement des échantillons.....	77
12. Préparation de l'éluant et des étalons.....	77
12.1. Eluant.....	77
12.2. Etalons mères et ajouts dosés.....	78
13. Appareillage et méthode de dosage.....	78
14. Traitement des données chromatographiques.....	79

### **DOSAGE DU GLUCOSE ET DU FRUCTOSE..... 80**

15. Principe du dosage.....	80
-----------------------------	----

### **ANALYSE DE LA COMPOSITION VOLATILE..... 82**

16. Extraction des composés volatils.....	82
17. Analyse des composés volatils.....	82

17.1. Outils utilisés pour l'identification et la quantification des composés volatils en CPG/SM .....	84
<b><u>ANALYSES STATISTIQUES .....</u></b>	<b>89</b>
18. Analyses univariées .....	89
19. Analyse multivariée .....	90
<b><u>CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSIONS .....</u></b>	<b>91</b>
<b><u>MISE AU POINT ET JUSTIFICATION DES MÉTHODES ANALYTIQUES CHOISIES.....</u></b>	<b>92</b>
20. Dosage des acides organiques en chromatographie liquide .....	92
20.1. Paramètres chromatographiques.....	93
20.2. Etalonnage et mise en évidence d'un « effet de matrice ».....	95
21. Dosage des composés volatils par chromatographie en phase gazeuse ....	98
21.1. Extraction des composés volatils de l'échantillon .....	98
21.2. Analyse par GC/MS .....	99
21.3. Quantification relative des composés volatils dans les échantillons .....	101
<b><u>MODIFICATIONS CHIMIQUES DU CIDRE EN COURS DE FERMENTATION .....</u></b>	<b>104</b>
22. Les paramètres cidricoles .....	104
22.1. Les sucres fermentescibles.....	104
22.2. L'acide malique .....	113
22.3. L'acide lactique.....	124
22.4. Conclusion .....	126
23. Caractérisation de la composition volatile des cidres à distiller .....	127
23.1. Comparaison de la composition volatile dans le moût et le jus mûré .....	127
23.2. Changement de la composition de la matrice .....	135
<b><u>CONCLUSION GENERALE .....</u></b>	<b>167</b>
<b><u>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</u></b>	<b>171</b>
<b><u>ANNEXES.....</u></b>	<b>183</b>





## INTRODUCTION

Financée par la région Basse-Normandie et fortement soutenue par l'Interprofession Des Appellations Cidricoles (IDAC), cette étude se situe dans la suite logique des travaux entrepris par l'ERPCB (Equipe de Recherche en Physico-Chimie et Biotechnologies ; EA 1914) depuis une dizaine d'années et qui ont porté sur la caractérisation de la composition aromatique des Calvados « sortie alambic ».

Contrairement aux eaux-de-vie de vin, le Calvados a été peu étudié. Les premières études au laboratoire ont été orientées sur la composition fine de l'eau-de-vie « sortie alambic » et ont permis d'identifier et de quantifier les composés volatils constitutifs de son arôme (Ledauphin J. 2003; Ledauphin J. *et al.* 2004; Ledauphin J. *et al.* 2006; Ledauphin J. *et al.* 2010). Dès lors que ce travail de caractérisation fut réalisé, il était intéressant de pousser la curiosité un peu plus loin : l'objectif consiste à tenter de comprendre comment ces composés présents dans l'eau-de-vie jeune sont formés au cours de l'élaboration du cidre et pourquoi, en partant d'une matière première de même origine, l'eau-de-vie peut être au final si différente d'une production à une autre.

Trois producteurs d'eaux-de-vie de Calvados se sont portés volontaires pour collaborer à ces travaux. Des prélèvements de cidre à distiller en cours d'élaboration ont été effectués sur deux ans de campagne. Les producteurs sélectionnés pour cette étude représentent la forte diversité des échelles de production de cette eau-de-vie qui, d'un point de vue commercial, prend une dimension de plus en plus importante au niveau international. Un producteur fermier, un producteur artisanal et le plus grand industriel de Calvados se sont portés volontaires à l'étude en nous permettant de comparer l'évolution de leurs produits en liaison avec leurs protocoles d'élaboration bien distincts. Avec ces trois producteurs, ce sont aussi 2 Appellations d'Origine Contrôlée (Syndicat de promotion et de défense du cidre AOC Pays d'Auge) qui sont représentées, à savoir l'AOC « Calvados Pays d'Auge » et l'AOC « Calvados », et qui couvrent à elles seules 99% des ventes de Calvados.

Après avoir pris connaissance des composés qui étaient présents à la sortie de l'alambic dans la matrice fortement alcoolisée, une liste a pu être dressée comme base d'investigation de composés volatils dans les cidres. La

« matrice cidre » évolue beaucoup entre le pur jus de pomme qui sort du système de presse et le cidre sec utilisé pour la distillation. Les fermentations, sont les principales étapes responsables de cette transformation et ont été utilisées comme fil rouge de l'étude de l'évolution des composés volatils. Les sucres fermentescibles ont été suivis de manière à pouvoir quantifier l'avancement de la fermentation alcoolique. Il en est de même pour la conversion malolactique : le suivi de la consommation d'acide malique et de la production d'acide lactique a pu permettre de situer le cidre par rapport à l'avancement de ce procédé fermentaire.

Pour identifier et évaluer la proportion générée en composés volatils, une séparation et une quantification par Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CPG/SM) a été réalisée pour chaque prélèvement de cidre en cours d'élaboration. Les extraits ont été obtenus après un traitement préalable (pour se débarrasser notamment des sucres et macromolécules) par Extraction en Phase Solide suivie d'une phase de concentration. La consommation des sucres a été suivie par kit enzymatique par spectrophotométrie UV/Visible. Les acides malique et lactique, ont pour leur part été séparés et quantifiés par Chromatographie Liquide Hautes Performances couplée à une détection UV (CLHP/UV), après une courte défécation préalable du cidre.

La fermentation alcoolique ainsi que la transformation malolactique peuvent jouer un rôle non négligeable sur le bouquet aromatique. La question est de savoir quelle peut être l'influence de l'une et/ou l'autre sur l'apparition (ou la disparition) de certains composés ou encore sur leur abondance dans le cidre utilisé pour la distillation. *In fine*, l'objectif issu de ce travail est de connaître l'impact de ces transformations sur la qualité organoleptique du Calvados « Sortie-alambic ».

Pour répondre à cet objectif, des outils d'analyse chimique (qualitatifs et quantitatifs) et statistique nous ont permis de mettre en relation, de comparer et de discriminer les composés volatils des cidres à distiller en cours d'élaboration.

Dans un premier chapitre, consacré à « l'état de l'art » sur le sujet du présent mémoire, nous nous intéresserons plus particulièrement aux deux procédés fermentaires principaux impliqués dans l'élaboration du cidre à distiller : à savoir la fermentation alcoolique et la fermentation malolactique qui seront présentées au travers (1) de microorganismes responsables de ces transformations (leur métabolisme, leurs activités), (2) des facteurs influençant leur avancement et/ou leur tenue (3) des modifications chimiques du milieu (production d'acides organiques, de composés volatils) qui en découlent dans le cas notamment de cidres de consommation.

Le deuxième chapitre est consacré au volet instrumental du travail. Le matériel et les méthodes analytiques utilisées pour répondre aux problématiques de l'étude seront présentés.

Le dernier chapitre est consacré à l'analyse des résultats et aux réponses aux questions qui constituent l'objet de ces travaux. Nous aborderons cette discussion en réalisant tout d'abord une comparaison des paramètres chimiques du pur jus de pommes (sucres, acide malique et acide lactique) avec celle du cidre à distiller pour les différentes productions étudiées. Les modifications de ces paramètres au cours du temps (vitesse de consommation des sucres et de l'acide malique) seront aussi discutées. Enfin, une comparaison de l'apparition des composés volatils selon l'occurrence et la cinétique des fermentations sera proposée.



# Chapitre premier

<b>CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b>
--

## **1. Le cidre de consommation**

La production mondiale de cidre se partage majoritairement entre le Royaume-Uni (environ 600 millions de litres par an en 2006) (NACM 2010), la France (environ 160 millions de litres par an en 2009) et l'Espagne (environ 75 millions de litres par an en 2009) (Mercasa 2008).

Le cidre est néanmoins produit dans de nombreuses zones tempérées du monde comme en Irlande (environ 72 millions de litres par an en 2008) (ABFI *et al.* 2011), en Allemagne, en Suisse, en Argentine ou encore aux Etats-Unis (Lea A. 2008). Les différences importantes entre les pratiques cidricoles entre pays, voire entre deux régions, induisent la commercialisation de cidres aux caractéristiques organoleptiques très variées (Lea A.G.H. *et al.* 1995; Picinelli A. *et al.* 2000).

Dans tous ces pays, le cidre est à l'origine issu du ramassage, du lavage, du broyage puis du pressage des pommes. Un pur jus de pomme est alors obtenu ; il subit une fermentation durant laquelle les sucres présents sont convertis totalement ou partiellement en éthanol. Les cuves utilisées sont diverses à la fois par leur contenance (de quelques dizaines à plusieurs centaines d'hectolitres) et leur matériau (inox, résine alimentaire ou encore bois). Une petite précision doit être apportée ici quant aux deux façons de mener la fermentation alcoolique, étape primordiale. La fermentation spontanée est la conséquence de l'activité des microorganismes exclusivement endogènes au pur jus. A l'inverse une fermentation non spontanée pourra se faire sur un pur jus, stérilisé dans un premier temps, puis enrichi en microorganismes sélectionnés, afin de maîtriser la transformation des sucres en alcool.

Au cours du temps les modes de fabrication ayant néanmoins fortement divergés pour des raisons culturelles, un bilan des principales pratiques cidricoles dans les 3 pays produisant les plus grandes quantités de cidre est abordé ci-après.

### 1.1. Production cidricole au Royaume-Uni

La production de cidre au Royaume-Uni est partagée principalement entre 5 comtés (Herefordshire, Worcestershire, Gloucestershire, Somerset et Devon) (Lea A. 2008).

Selon l'association anglaise des producteurs de cidre (NACM – National Association of Cider Makers), le cidre anglais possède un titre alcoométrique (TA) compris entre 1,2 et 8,5%. Une grande diversité de cidres est disponible sur le marché anglais, on peut distinguer selon Jarvis (Jarvis B. 2003) 4 cidres bien différents (Figure 1) :

- Le cidre « de base »
- Les cidres à la pression (« draught cider »)
- Les cidres doublement fermentés (« double fermented cider »)
- Les cidres bouchés (« sparkling cider »)

Ces trois derniers types de cidres (à la pression, doublement fermentés et bouchés) sont fabriqués à partir du cidre « de base » (Figure 1) dont les principales caractéristiques sont données ci-après.

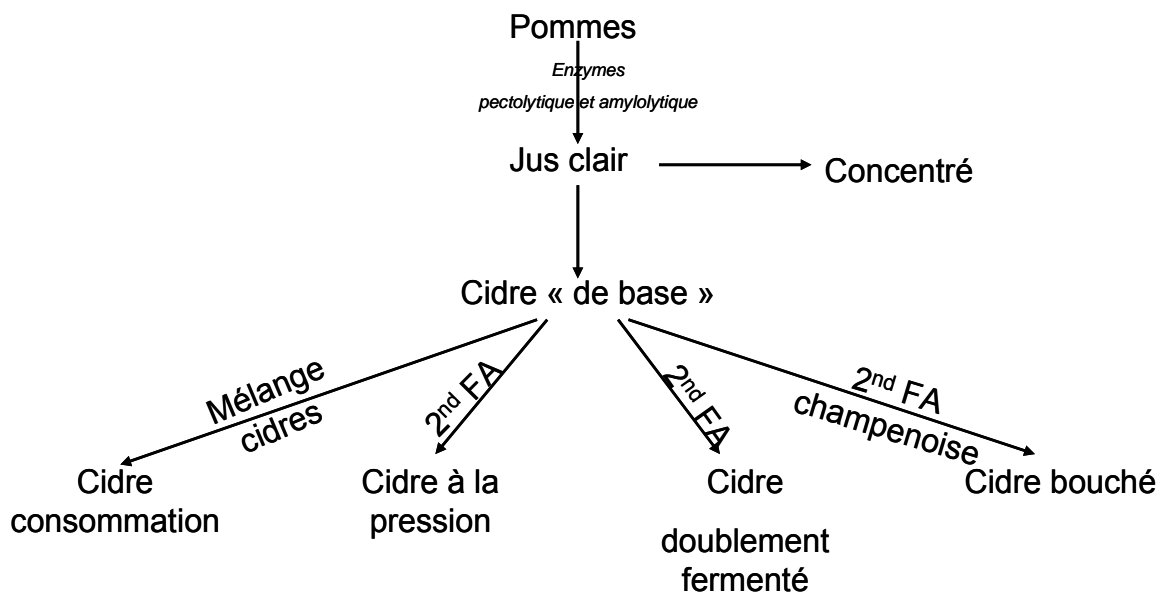


Figure 1 : Fabrication des divers cidres au Royaume-Uni

Le jus de pomme en sortie de presse subit généralement un traitement par le SO<sub>2</sub>. Au Royaume-Uni, il est possible d'utiliser du jus de pomme concentré dilué pour produire du cidre. Dans ce cas, c'est à partir d'une évaporation menée



sur ce jus clair que le concentré est élaboré et peut ainsi se conserver 2 à 3 ans au froid.

Pour l'obtention du cidre « de base », le jus clair précédemment obtenu par sulfitage, est placé en cuve pour y fermenter. Cette fermentation est contrôlée par ajout d'un inoculum de levures et de nutriments (phosphate d'ammonium, carbonate d'ammonium, glucose). La fermentation se poursuit entre 3 et 8 semaines, jusqu'à épuisement des sucres dans le milieu. La floculation (opération permettant d'éliminer les particules solides) des levures à froid permet de soutirer le cidre pour le transférer en cuve de maturation dans laquelle il y reste au minimum un an avant d'être utilisé pour élaborer d'autres cidres de consommation.

Son degré d'alcool peut atteindre 12%. Après centrifugation, il est mélangé à d'autres cidres pour en faire un cidre commercialisable dont le degré d'alcool peut varier entre 3,5 et 8% (Beech F.W. 1972; Williams A.A. 1974; Morrissey W.F. *et al.* 2004). Colorants, édulcorants, peuvent être additionnés au produit final pour répondre au modèle organoleptique recherché. Après ajout de CO<sub>2</sub>, le produit est mis en bouteille, cannette ou fûts (Jarvis B. 2004).

Pour la production de **cidre à la pression** (*draught cider*), une seconde fermentation est déclenchée en ajoutant des sucres fermentescibles et un inoculum de levures au cidre de base sec. Cette deuxième fermentation est plus faible que la première mais permet tout de même d'assurer la production de CO<sub>2</sub>, responsable du caractère « pétillant » et d'un léger voile de levures. La durée de vie de ce type de produit est relativement réduite, 4 à 6 semaines (Jarvis B. 2003).

Le **cidre doublement fermenté** (*double fermented cider*) subit aussi une double fermentation mais cette fois à partir de cidre de base non pas sec mais brut dont la fermentation n'est pas totalement achevée (6% d'alcool) et qui est préalablement stérilisé ou pasteurisé.

La seconde fermentation se fait après addition de sucres ou de jus de pommes et d'un inoculum de levures. Ce protocole permet la production de saveurs complexes (Jarvis B. 2003).

Le **cidre bouché** (*sparkling cider*) est obtenu traditionnellement par une double fermentation à la *mode champenoise*. Le cidre sec est embouteillé avec un peu de sucres fermentescibles et des levures propres à la production de Champagne. Une fois bouchées, les bouteilles sont couchées pour que la fermentation se poursuive pendant 1 à 2 mois à 15-18°C. Par la suite, elles sont rangées, pendant environ deux mois le « col vers le bas » et sont agitées chaque jour afin que le dépôt se fasse juste au dessous du bouchon. La maîtrise de la méthode repose dans la dernière étape durant laquelle, il est impératif de déboucher la bouteille pour éliminer le dépôt de levures sans aucune perte de liquide. L'ajout final de cidre ou de sucres avant de boucher une nouvelle fois la bouteille, permet d'obtenir des degrés de douceur différents. Une méthode alternative permet de faire cette seconde fermentation dans une cuve close ; après filtration le cidre est embouteillé (Jarvis B. 2003).

## 1.2. Production de cidre en Espagne

En Espagne, la production de cidre se partage quasi-exclusivement entre les provinces des Asturies (80% de la production) et le Pays Basque (Picinelli A. *et al.* 2000).

Ils sont élaborés avec un titre alcoométrique minimal de 4%. La fabrication du **cidre naturel** espagnol implique tout d'abord une clarification du jus de pomme en sortie de presse. Une fermentation spontanée a alors lieu en raison de la présence d'une flore indigène suffisamment importante. Trois types de cidre sont principalement commercialisés (Picinelli A. *et al.* 2000; Rodriguez Madrera R. *et al.* 2008) :

- le cidre naturel (« natural cider »),
- le cidre bouché (« sparkling cider »),
- le « *cidre des Asturies* » (« Sidra de Asturias »).

La macération de la pulpe recueillie après le broyage des pommes est une étape que l'on ne rencontre pas dans les autres protocoles européens. Elle peut durer jusqu'à 24h avant que le pressage ait lieu. L'autre particularité espagnole est que la vitesse de presse est relativement lente (quelques heures). La fermentation se poursuit jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de sucres dans le cidre. Généralement décrit comme sec et acide, le **cidre naturel** vendu n'a jamais reçu

de sucre, d'anhydride sulfureux ni de dioxyde de carbone (Picinelli A. *et al.* 2000; Garai-Ibabe G. *et al.* 2008).

Le **cidre bouché** (sparkling cider) est obtenu après fermentation complète de jus de pomme frais. Sec et acide, il est incrémenté de gaz carbonique pour valoriser la montée de la mousse qui est un atout de consommation majeur dans ce pays (Lea A.G.H. *et al.* 1995). Selon l'ajout de sucre lors de la mise en bouteille, le cidre bouché espagnol se décline sous plusieurs degrés de douceur (sec avec 20 g/L de sucres, demi-sec avec 30 à 50 g/L de sucres, et doux avec 50 à 80 g/L de sucres) (Suarez Valles B. *et al.* 2005; Rodriguez Madrera R. *et al.* 2008).

Les Asturies produisent un cidre bouché, « **Sidra de Asturias** », dont la production est contrôlée par un label équivalent à celui d'une Appellation d'Origine Contrôlée française. La production de ce dernier autorise l'ajout de SO<sub>2</sub> (moins de 200 mg/L) et de stabilisateurs en cours de fermentation ainsi que de sucre au produit final. Une deuxième fermentation dite « à la champenoise » est pratiquée après embouteillage (Rodriguez Madrera R. *et al.* 2008). La complexité du protocole pour mener à bien cette fermentation est responsable du déclin de la production de ce cidre à l'avantage de la production de cidre bouché (Jarvis B. 2003). Plusieurs **degrés de douceur** sont aussi proposés (sec, demi-sec et doux) (Rodriguez Madrera R. *et al.* 2008).

### 1.3. Production cidricole en France

En France, la production de cidre se répartit majoritairement entre les régions bretonne et normande. Les produits sont généralement vendus pour des titres alcoométriques compris entre 2 et 5% mais peuvent atteindre 8% pour certains cidres traditionnels. Les cidres de Normandie et de Bretagne possèdent des Indications Géographiques Protégées (IGP) qui délimitent l'aire de fabrication, mais aussi des produits plus spécifiques ayant obtenu une Appellation d'Origine Contrôlée : « Cidre AOC Cornouaille » pour la Bretagne et « Cidre AOC Pays d'Auge » pour la Normandie. On distinguera ici :

- Les cidres « IGP » de Normandie et de Bretagne.
- Les cidres « AOC »

La plupart des **cidres IGP** français subissent après pressage des pommes, une étape de clarification. Cette clarification peut être menée par décantation, filtration ou centrifugation mais le procédé de « cuvage » aussi appelé « keeving » est une exception française lors de la production de cidres. Selon Le Quéré *et al.* (Le Quéré J.M. *et al.* 2010) environ 50% des moûts à cidre français subissent un « cuvage ». Au bout de quelques jours de mise en cuve, les ions calcium du moût et les acides pectiniques (issus de l'attaque des pectines naturelles par les enzymes) vont s'agglomérer dans un premier temps avant de remonter et de former ce qui est appelé le « *chapeau brun* ». Cette opération est une clarification naturelle tout comme la décantation (aussi appelé débourage).

Il nous semble important d'apporter quelques précisions quant à la terminologie de cette étape. La filtration et la centrifugation sont des clarifications physiques basées sur des différences de poids (centrifugation) ou de taille (filtration) entre les particules solides (complexes polyphénols/pectines ou pectines/protéines) et le moût. La clarification d'un cidre peut être faite par :

- défécation (« chapeau brun »),
- flotation, ce qui nécessite l'intervention d'un agent chimique (tel que des enzymes ou des gélatines) et d'un flux de gaz (azote ou air) pour faire remonter les particules de trouble,
- gélification de la pectine (avec ajout d'enzyme polyméthylestérase).

Le moût clarifié est ensuite soutiré puis transféré dans une autre cuve où une fermentation lente puis une maturation se déroulent pendant 6 semaines à trois mois.

Pour l'élaboration de **cidre** et de **cidre bouché** (IGP de Bretagne et de Normandie), il est autorisé :

- de mélanger des cidres entre eux ou avec des moûts,
- de mélanger des cidres avec des moûts concentrés,
- d'ajouter du sucre pour favoriser l'effervescence naturelle du cidre bouché.

Plusieurs douceurs (brut contenant au plus 28 g/L de sucres, à doux avec plus de 35 g/L de sucres) sont alors commercialisées (Alonso-Salces R.M. *et al.* 2004). Les bulles peuvent être issues du métabolisme des levures quand elles en produisent suffisamment ; dans le cas contraire l'ajout de CO<sub>2</sub> peut se pratiquer

(Le Queré J.M. *et al.* 2006). Pour un aspect plus commercial, le cidre peut être vendu **pasteurisé** (J. Off. Repub. Fr. 1987).

Le protocole de production des deux **cidres AOC**, « Pays d'Auge » et « Cornouaille », est très similaire autant sur l'élaboration que sur la tenue des vergers. Les principales différences sont liées à l'aire géographique de production et aux variétés de pommes utilisées pour l'obtention du moût. Le « cuvage » est obligatoire pour les « cidres AOC Pays d'Auge » mais ne l'est pas pour les « cidres AOC Cornouaille ». Le produit voulant briguer l'AOC ne doit pas avoir subi d'ajouts de sucres, de levures, de SO<sub>2</sub> ou de moût de pommes concentré. Quand le cidre atteint le taux d'alcool recherché (entre 3 et 4,5% de volume acquis), il est embouteillé, il suivra une prise de mousse naturelle grâce à la présence de sucres résiduels et au métabolisme des levures. Le dégorgeage étant interdit, un dépôt de levure accusera d'un respect du cahier des charges (J. Off. Repub. Fr. 1963; J. Off. Repub. Fr. 2009).

#### **1.4. Principales différences entre les productions anglaises, espagnoles et françaises**

Les différences d'élaboration du cidre en Europe sont synthétisées dans le Tableau 1.

Les pommes utilisées dans les élaborations européennes sont relativement identiques d'un point de vue variétal, mais il faut bien comprendre que les conditions climatiques de chaque pays sont responsables des différences retrouvées pour les paramètres physico-chimiques et microbiologiques des pommes (acidité, sucres, abondance des microorganismes). La macération employée en France est d'une durée plus courte que celle opérée en Espagne (plusieurs heures). C'est lors de l'étape de clarification que la variété des protocoles est la plus importante à travers la filtration, la floculation, la centrifugation et le chapeau brun. Selon le produit final attendu, une seconde fermentation peut être réalisée, et pour ce faire, du sucre et des levures (utilisées dans l'élaboration du Champagne) sont ajoutés. Dans le cas des fermentations spontanées (Espagne et France), aucune addition de microorganismes n'est nécessaire. Bien que démocratisé en viticulture, le

sulfitage est interdit pour le cidre français, différence majeure d'élaboration avec le Royaume-Uni et l'Espagne (excepté pour le cidre naturel). Les produits commercialisés ont des degrés d'alcool et de douceurs différents, caractéristiques de l'ajout plus ou moins important de sucre ou de concentré dans le produit fini.

Tableau 1 : Principales caractéristiques des cidres de consommation anglais, espagnols et français

	UK		Espagne			France	
	Cidre de base	Autres cidres	Cidre naturel	Cidre bouché	<i>Cidre des Asturies</i>	Cidres AOC	Cidres IGP
Types de pommes (1, 2)	Douce-amères et acides		Acides et amères douces moyenne			Amères, Douce-amères (70%), douces et acidulées	Acides, amères et douce-amères
Macération	Non (3,4)		Oui (5)			Oui (2)	Non (2)
Clarification	Floculation à froid (6)		Oui (5)			Chapeau brun (2,8)	décantation, centrifugation ou filtration (2)
Fermentation	Simple (9)	Double (9)	Spontanée (7)		Double dont une champenoise (10)	Spontanée (8)	
Ajout levures	Oui (9)	Oui (9)	Non	Non	Oui (10)	Non	
Addition SO <sub>2</sub>	Oui (9)		Non (11)	Oui (12)	Oui (12)	Non	Oui
Addition sucres	Oui (9)		Non (11)	Oui (12)	Oui (10)	Non	Oui
Degré alcool	3,5 à 8,5 % vol. (11)		> 5% vol. (11)			3 à 4,5 % vol. (2)	3 à > 5 % vol. (2)
Douceurs proposées	Oui (3)	Non	Sec (5)	Doux, demi-sec et brut (12)		Non (2)	Doux, demi-sec et brut (8)

Avec 1 : (Lea A.G.H. *et al.* 1995), 2 : (J. Off. Repub. Fr. 1987), 3 : (Beech F.W. 1972), 4 : (Morrissey W.F. *et al.* 2004), 5 : (Alonso-Salces R.M. *et al.* 2006), 6 : (Jarvis B. 2003), 7 : (Alonso-Salces R.M. *et al.* 2006) 8 : (Alonso-Salces R.M. *et al.* 2004), 9 : (Jarvis B. 2004), 10 : (Suarez Valles B. *et al.* 2005), 11 : (Picinelli A. *et al.* 2000), 12 : (Rodriguez Madrera R. *et al.* 2008)

## 2. L'eau de vie de cidre

Autant le cidre est produit majoritairement en Angleterre, autant l'eau-de-vie qui en découle est élaborée en grande partie en France (régions normande et bretonne). En 2003, L'INAO, rapporte que plus de 19 000 hL d'alcool pur d'eau-de-vie de Calvados ont été commercialisés (73% AOC Calvados et 27% d'AOC Pays d'Auge). Les eaux-de-vie de cidre françaises peuvent être relativement différentes et sont vendues principalement sous les labels d'Appellation d'Origine Contrôlée pour la Normandie (AOC Calvados, AOC Calvados Pays d'Auge, AOC Calvados Domfrontais) et d'Appellation d'Origine Réglementée pour la Bretagne

(AOR Lambig de Bretagne). D'importantes productions d'eaux-de-vie de cidre peuvent aussi être rencontrées en Espagne ou aux Etats-Unis.

### 2.1. Le cidre à distiller

Le cidre destiné à la distillation est dépourvu de sucres. Les caractéristiques physico-chimiques sont peu restrictives, en effet d'après les cahiers des charges des différentes AOC, seule la teneur en sucres du pur jus initial fait l'objet de normes à respecter. En effet, pour le cidre menant aux AOC Pays d'Auge et Calvados, le moût non fermenté doit contenir plus de 78 g/L de sucres et pour celui menant à l'AOC Domfrontais 87 g/L. Dans les deux protocoles, aucun apport de levure ne doit être opéré.

L'eau-de-vie de cidre « jeune » est obtenue après distillation au moyen d'un alambic. Incolore, son titre alcoométrique avoisine les 70°; elle subit ensuite un processus de vieillissement en fût.

### 2.2. La distillation

Trois types d'alambic sont principalement utilisés pour la production d'eaux de vie de cidre : l'alambic à colonne (appelé encore alambic à rectification), l'alambic charentais (appelé aussi alambic à repasse) et l'alquitara (petit alambic à double chauffe) (Blanco Gomis D. *et al.* 2003; Rodriguez Madrera R. *et al.* 2006).

L'alambic à colonne ou l'alambic charentais peuvent être utilisés pour la fabrication de **Calvados AOC**, tandis que pour obtenir du **Calvados Pays d'Auge**, il est impératif que le cidre soit distillé dans un alambic charentais (J. Off. Repub. Fr. 2009).

Enfin pour le **Calvados Domfrontais** (fait à partir d'un mélange de cidre et d'un minimum de 30% de poiré) et le **Lambig** breton, c'est un alambic à colonne qui est employé (J. Off. Repub. Fr. 2009). Les espagnols peuvent utiliser aussi bien les alambics charentais, à colonne ainsi que l'alquitara.

### 2.3. Le vieillissement

L'eau de vie « sortie alambic » est incolore, transparente et riche en alcool (70°, v/v). Elle est placée en cuve de vieillissement pendant 2 ans au minimum.

Elle va acquérir une couleur brunâtre ainsi qu'une grande complexité aromatique par extraction des composés provenant du bois des fûts utilisés (Mangas J.J. *et al.* 1996). A travers les pores des douelles, son titre alcoométrique décroît d'environ 3 à 5 unités par an et l'eau-de-vie ne peut être marchande que lorsque celui-ci chute aux alentours de 40°.

En France, toujours dans l'optique de répondre aux exigences des différentes appellations d'origine (contrôlée ou réglementée), c'est à la sortie de l'alambic que l'eau de vie est évaluée par l'INAO (Institut National des Appellations d'Origine). Les analyses organoleptiques et physico-chimiques de base permettront de délivrer ou non les mentions « AOC » ou « AOR » en fonction du respect ou non de ces critères.

Avant embouteillage, la dernière étape consistera à assembler des eaux-de-vie d'âges divers mais issues d'une même AOC ou d'une même AOR. Le savoir-faire du maître de chais rentrera alors en jeu et après dégustation, il choisira suivant ses attentes, des proportions de plusieurs eaux-de-vie pour élaborer son eau-de-vie de pomme marchande.

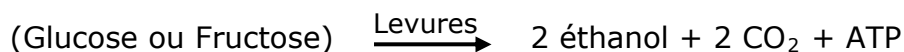


## LES PRINCIPAUX PROCÉDES FERMENTAIRES RESPONSABLES DE LA TRANSFORMATION DU MOUT DE POMMES EN CIDRE

Le passage du jus de pomme au cidre est le résultat de réactions chimiques et biochimiques trouvant leur origine dans l'activité de microorganismes tels que les levures fermentatives et oxydatives et les bactéries lactiques. Les deux transformations principales que sont la fermentation alcoolique et la fermentation malolactique sont présentées ci-après.

### **3. La fermentation alcoolique**

Les levures sont des champignons unicellulaires à l'origine de la production d'éthanol et de multiples composés aromatiques à partir de la dégradation des sucres fermentescibles du jus de pomme.



Elles peuvent être classées en deux catégories : celles appartenant au genre *Saccharomyces* (genre prédominant pendant la fermentation alcoolique) et celles n'y appartenant pas (non-*Saccharomyces*). Elles sont naturellement présentes sur le fruit mais peuvent être aussi apportées par le matériel utilisé lors de la fabrication du cidre (Suarez Valles B. *et al.* 2007). La consommation des sucres fermentescibles peut durer de 10 jours à 12 semaines afin d'obtenir un cidre tout à fait sec (dépourvu de sucres résiduels) (Jarvis B. 2003).

#### **3.1. Les non-*Saccharomyces***

De façon générale, les levures n'appartenant pas au genre *Saccharomyces* sont dominantes dans les premiers temps de la fermentation alcoolique (Xu Y. *et al.* 2006; Nogueira A. *et al.* 2008). Elles représentent généralement plus de 70% de la flore existante dans le pur jus de pomme si les conditions d'hygiène sont respectées (Beech F.W. 1993). Elles sont extrêmement diversifiées d'un point de vue taxonomique mais sont présentes majoritairement sous forme apiculée et appartiennent généralement au genre *Hanseniaspora* (*Kloeckera*) (Suarez Valles B. *et al.* 2007). Elles peuvent aussi être dotées d'un métabolisme oxydatif comme les souches de type *Metschnikowia pulcherrima* et *Pichia guilliermondii* (Suarez Valles B. *et al.* 2005). Ce dernier type de souche est parfaitement capable d'inhiber la croissance de levures *Saccharomyces* (*cerevisiae* et *bayanus*)

(Nguyen H.V. *et al.* 1998). Par ailleurs des travaux récents mettent en avant l'utilité de certaines souches quant à l'accroissement de la complexité du vin et à leur capacité à produire des arômes fermentaires surtout pour des degrés d'alcool faibles (2,5 à 5°) (Zott K. *et al.* 2008).

Dans les cidres les principales espèces d'*Hanseniaspora* rencontrées sont *H. valbyensis*, *H. uvarum*, *H. osmophila* (Suarez Valles B. *et al.* 2007). Par comparaison avec des souches de type *Saccharomyces cerevisiae*, elles consomment en anaérobiose peu de sucres fermentescibles (glucose et fructose) et génèrent donc peu d'éthanol. Xu *et al.* (Xu Y. *et al.* 2006) ont démontré que, pour un même jus de pomme stérilisé et pour une même quantité de souches ajoutée, l'addition de *Saccharomyces cerevisiae* permettait d'obtenir un titre alcoométrique de 11,5° et une concentration résiduelle en glucose d'environ 3,5 g/L alors que l'addition de *Hanseniaspora valbyensis* menait, quant à elle, à un titre alcoométrique ne dépassant pas 6° pour une concentration résiduelle encore élevée d'environ 30 g/L. La durée de vie des *Hanseniaspora* est relativement limitée (une dizaine de jours) ; elles meurent alors que le degré d'alcool atteint tout juste 1° à cause de leur faible tolérance à l'éthanol et parce que les nutriments deviennent peu disponibles (Nogueira A. *et al.* 2008). De plus, l'abondance de souches appartenant au genre *Saccharomyces* inhibe leur croissance et entraîne une forte nécrose de ces microorganismes (Xu Y. *et al.* 2006). Sur la Figure 2, on peut constater qu'à l'ajout des levures *Saccharomyces*, les levures *Hanseniaspora* tendent à mourir.

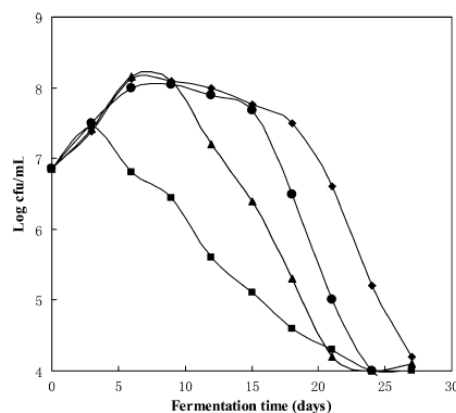


Figure 2 tirée de (Xu Y. *et al.* 2006): Croissance de *Hanseniaspora valbyensis* en culture pure (losanges) et en culture mixte avec *Saccharomyces cerevisiae* inoculées à  $2 \cdot 10^6$  CFU/mL après 3 jours (carrés), 9 jours (triangles) et 15 jours (cercles)

En début de fermentation alcoolique les *Hanseniaspora* sont accompagnées généralement, mais en faible quantité, de levures oxydatives des genres *Metschnikowia* ou *Pichia* voire même *Candida* (Coton E. *et al.* 2006; Pando Bedriñana R. *et al.* 2010). Tout comme les *Hanseniaspora* elles disparaissent rapidement lorsque la teneur en éthanol devient trop forte dans le milieu.

Dans les derniers temps de la fermentation alcoolique, il est possible d'observer à nouveau la prédominance de levures de type non-*Saccharomyces* comme des souches appartenant aux espèces *Brettanomyces/Dekkera* plus résistantes notamment à un fort taux d'alcool (Morrissey W.F. *et al.* 2004) ou possédant un métabolisme oxydatif (partie développée en page 62, 9 Dérives et excès des deux procédés fermentaires).

### **3.2. Les *Saccharomyces***

Lors de l'obtention du pur jus de pomme, les populations en *Saccharomyces* sont généralement très faibles par comparaison aux populations en *Hanseniaspora* (Pando Bedriñana R. *et al.* 2010). La population en *Saccharomyces* croît très fortement à la mort des non-*Saccharomyces* (Xu Y. *et al.* 2006). *S. cerevisiae* et *S. bayanus* sont les souches de *Saccharomyces* majoritairement rencontrées dans le cidre pendant la fermentation alcoolique. *S. kudriavzevii*, *S. pastorianus* et *S. nikatae* sont aussi présentes mais en population moins dense dans le milieu (Pando Bedriñana R. *et al.* 2010).

Les *Saccharomyces* sont dites fortement fermentaires par leur capacité importante à consommer le glucose et le fructose pour produire de l'éthanol. Elles sont résistantes à de fortes concentrations en éthanol, ce qui permet généralement la survie de souches de ce genre jusqu'à épuisement des sucres fermentescibles. Néanmoins, l'indisponibilité des nutriments (sucres, acides aminés, vitamines) et leur faible résistance aux paramètres physico-chimiques du milieu (acidité trop marquée, concentration en alcool excessivement importante) marque la fin de leur activité fermentaire (Dueñas M. *et al.* 1994; Herrero M. *et al.* 1999 b; Sanchez A. *et al.* 2010). A l'inverse, la présence de forte quantité d'acides gras à chaîne moyenne (acide octanoïque et décanoïque notamment) sous certaines conditions (peu d'éthanol et pH bas) inhibe le développement des *Saccharomyces* (Lafon-Lafourcade S. *et al.* 1984).

Les *Saccharomyces* sont dotées d'un métabolisme complexe qui ne s'arrête pas seulement à la production d'éthanol (Pollard A. *et al.* 1966). Les sous-produits obtenus à partir de ces souches seront développés au paragraphe 6 « Changements issus de la fermentation alcoolique ».

### **3.3. Conclusion**

Lors de la fermentation spontanée des cidres, la fermentation alcoolique peut être globalement divisée en 3 parties. La première étape correspond à une phase dite « apiculée » où les levures non-*Saccharomyces* seront prédominantes. Elle sera suivie par une phase dite « alcoogène » qui sera menée par des souches appartenant au genre *Saccharomyces* où une production forte d'éthanol sera observée. La fermentation alcoolique se terminera par une phase de faible production d'éthanol où des levures appartenant aux genres *Brettanomyces/Dekkera* pourront être prédominantes. Le Tableau 2 rassemble les principales souches de levures identifiées dans les cidres suivant les étapes de la fermentation alcoolique ainsi que l'origine des échantillons d'où elles ont pu être isolées.

Tableau 2 : Ensemble de levures rencontrées lors de la fermentation alcoolique spontanée durant l'élaboration de cidres

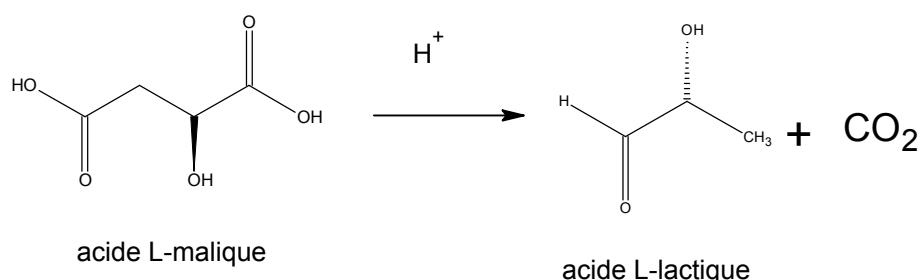
Genre	Espèce	Moût non fermenté	Milieu de fermentation alcoolique	Fin de fermentation alcoolique
<i>Hanseniaspora</i>	<i>uvarum</i>	F (1), E (5)	E (6)	
	<i>valbyensis</i>	F (1, 7), E (5)	E (5, 6)	E (5), F (7)
	<i>osmophila</i>	E (5)		
<i>Dekkera</i>	<i>anomala</i>			F (1), RU (4)
<i>Candida</i>	<i>oleophila</i>	F (1)		
	<i>sake</i>	F (1)		
	<i>stellata</i>	F (1)		
	<i>lusitaniae</i>	F (2)	F (2)	
	<i>pulcherrima</i>	E (3)		
	<i>vini</i>	E (3)		E (3)
	<i>parapsilopsis</i>	E (6)		
	<i>tropicalis</i>	F (1)		
<i>Metschnikowia</i>	<i>pulcherrima</i>	F (1), E (5,6)		
<i>Pichia</i>	<i>delftensis</i>	F (1)		
	<i>misumaiensis</i>	F (1)		
	<i>nakasei</i>	F (1)		
	<i>guillermondii</i>	E (6)		
	<i>membranae faciens</i>	E (3)		E (3)
<i>Saccharomyces</i>	<i>bayanus</i>	F (1), E (5)	E (6)	F (1), E (6)
	<i>cerevisiae</i>	F (1, 2), RU (4)	F (2), RU (4), E (3, 6)	F (1, 2), RU (4), E (3, 6)
<i>Kloeckera</i>	<i>japonica</i>			F (2)
	<i>apiculata</i>	E (3, 8), RU (4)	E (3), RU (4)	E (3)
<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>cidri</i>		E (3)	
	<i>florentinus</i>	E (3)	E (3)	
<i>Rhodotorula</i>	<i>rubra</i>	E (3)		E (3)
<i>Torulaspota</i>	<i>delbureckii</i>	E (3)	E (3)	

Avec E : pour Espagne, RU : pour le Royaume-Uni et F : pour la France,

1 : (Coton E. *et al.* 2006), 2 : (Laplace J-M. *et al.* 1998), 3 : (Dueñas M. *et al.* 1994), 4 : (Morrissey W.F. *et al.* 2004), 5 : (Suarez Valles B. *et al.* 2007), 6 : (Pando Bedriñana R. *et al.* 2010), 7 : (Nogueira A. *et al.* 2008), 8 : (Cabranes C. *et al.* 1997)

#### 4. La fermentation malolactique

La conversion de l'acide malique (acide majoritaire dans la pomme) en acide lactique est une des réactions majeures d'origine bactérienne pouvant avoir lieu lors de la transformation du moût en cidre.



La fermentation enzymatique malolactique est une réaction équimolaire entre l'acide malique consommé par les bactéries lactiques et l'acide lactique formé, dont le rendement peut atteindre les 90% (Pilone G.J. *et al.* 1976; Arthurs C.E. *et al.* 1999). Cette réaction nécessite la présence d'ion manganèse et s'opère à l'intérieur de la cellule, dont l'équilibre NAD<sup>+</sup>/NADH est respecté. Un dégagement

de CO<sub>2</sub> accompagne la formation d'acide lactique par décarboxylation de l'acide malique. La consommation du diacide malique au profit de la formation du monoacide lactique entraîne une augmentation du pH (Arthurs C.E. *et al.* 1999). Cet adoucissement du milieu et l'enrichissement en arômes font qu'elle est pour cela relativement recherchée par les producteurs (Bozoglu T.F. *et al.* 2004) d'un côté, mais dans l'autre cette augmentation de pH fragilise la matrice pouvant ainsi favoriser le développement de microorganismes indésirables.

Elle est très attendue et assez bien maîtrisée dans le domaine vinicole, alors que, dans le domaine cidricole, elle peut ne pas avoir lieu dans les cidres traditionnels en raison d'une trop faible présence de bactéries lactiques (Laplace J-M. *et al.* 1998). Les bactéries lactiques indigènes impliquées dans ce processus de fermentation se déclinent en plusieurs genres et espèces diversifiant ainsi la formation de sous-produits.

#### **4.1. Les bactéries lactiques du cidre**

Les bactéries lactiques présentent généralement un métabolisme des sucres peu efficace, mais ont la particularité d'être acidophiles. Plusieurs travaux ont montré que, dans le cidre, les bactéries lactiques majoritairement présentes lors de la fermentation malolactique appartiennent au genre *Lactobacillus* et *Oenococcus* ; les *Pediococcus* existent mais en proportion moins importante (Cabranes C. *et al.* 1991; Dueñas M. *et al.* 1994). Ces trois genres de bactéries possèdent toutes l'activité enzymatique malolactique (Arthurs C.E. *et al.* 1999). Sanchez *et al.* (Sanchez A. *et al.* 2010) ont plus précisément défini que les souches *Lactobacillus collinoides* et *Oenococcus oeni* sont les espèces dominantes lors de cette fermentation alors qu'il semblerait que l'implication de *Pediococcus parvulus* soit moins importante. En Espagne, seules *Oenococcus oeni* serait rencontrées lors de l'élaboration (Herrero M. *et al.* 2005). En effet, cette dernière espèce de bactéries lactiques est souvent considérée comme la plus adaptée pour la fermentation malolactique car elle est plus résistante au pH bas et à une teneur en alcool plus élevée. Le Tableau 3 rassemble les différentes bactéries lactiques qui ont été citées dans des travaux portant sur des fermentations malolactique spontanées.

Tableau 3 : Bactéries lactiques rencontrées dans les cidres britanniques (RU), espagnols (E) et français (F) en début et fin de fermentations malolactique

Genre	Espèce	Début FML	Fin FML
<i>Lactobacillus</i>	<i>collinoides</i>	E (1)	E (1)
	<i>casei</i>	E (1)	
	<i>brevis</i>	F (2, 3)	F (2), E (4)
	<i>acidophilus</i>	F (2)	
	<i>plantarum</i>	E (4), RU (5)	
	<i>yamanashiensis</i>	E (4), RU (5)	
<i>Oenococcus</i>	<i>oeni</i>	F (2, 3)	E (1, 4), F (2, 3)
<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides</i>	F (3)	
<i>Pediococcus</i>	<i>parvulus</i>	E (1)	
	<i>ethanodurans</i>	E (1)	

1 : (Sanchez A. *et al.* 2010), 2 : (Laplace J-M. *et al.* 1998), 3 : (Salih A.G. *et al.* 1988), 4 : (Dueñas M. *et al.* 1994), 5 : (Carr J.G. *et al.* 1970)

Lors de cette réaction enzymatique, différentes espèces de bactéries lactiques sont présentes. Par comparaison avec la flore levurienne fermentative (Tableau 2), la diversité est moins importante mais la distribution est tout aussi hétérogène d'un pays à l'autre.

L'éthanol n'est pas en soi un facteur limitant à l'apparition des bactéries lactiques puisque la majorité des souches présentes dans le cidre sont résistantes jusqu'à une teneur proche de 9% en alcool (Cabranes C. *et al.* 1996). Le pH, intimement lié à la concentration en acide malique, est le facteur prépondérant de déclenchement de la fermentation malolactique. En effet, l'acidité est un des paramètres essentiels de survie des bactéries lactiques et par voie de conséquence leur activité en dépend (Dueñas M. *et al.* 1994). Dès le début de la décarboxylation de l'acide malique en acide lactique, le pH du cidre augmente. C'est le pH initialement bas (inférieur à 3,8) (Pollard A. *et al.* 1966) qui implique que les bactéries lactiques utilisent l'acide malique comme substrat plutôt que les sucres ; en effet, leur pH optimal de consommation des sucres est de l'ordre de 5,5 (Cox D.J. *et al.* 1989).

Dans le vin, les travaux de Wibowo *et al.* ont mis en évidence qu'en dessous d'un pH de 3,5 ce sont les *Oenococcus oeni* qui prédominaient et au delà de ce même pH, les *Pediococcus* et les *Lactobacillus* semblaient prendre le relais (Wibowo D. *et al.* 1985).

Dans le cidre, l'évolution de la population en bactéries lactiques semble être moins bien connue : là où certains auteurs ont démontré que *Oenococcus oeni* est présent tout au long de la fermentation en chais (Laplace J-M. *et al.*

1998), d'autres mettent en avant des successions de plusieurs sous espèces au cours du temps (Sanchez A. *et al.* 2010).

Plusieurs facteurs peuvent être à l'origine d'une inhibition de la croissance des bactéries lactiques. Il a été observé qu'en présence de levures faiblement fermentatives comme les *Kloeckera apiculata*, la croissance des bactéries lactiques ne se fait pas (Cabranes C. *et al.* 1996). Par ailleurs, les acides gras issus du métabolisme des levures (Herrero M. *et al.* 2001) ainsi que la présence d'acétaldéhyde en trop grande quantité (supérieure à 100 mg/L) (Liu S.Q. *et al.* 2000) peuvent aussi empêcher cette croissance.

#### **4.2. La production d'acide lactique**

La production d'acide lactique peut être réalisée à partir de différents substrats (Sanchez A. *et al.* 2010) tels que les sucres ou d'autres acides organiques dont la structure est proche de celle de l'acide malique (acides citrique, succinique et tartrique) (Lonvaud-Funel A. *et al.* 1982).

La production d'acide lactique peut se faire par deux voies enzymatiques distinctes, une première faisant intervenir une enzyme (enzyme malolactique) (Lonvaud-Funel A. *et al.* 1982) et une seconde faisant intervenir un complexe multienzymatique qui engendrerait la formation d'intermédiaires réactionnels tels que l'oxalacétate et le pyruvate (Caspritz G. *et al.* 1983).

L'enzyme malolactique (EML) nécessite la présence du coenzyme NAD et d'ions  $Mn^{2+}$  se liant à l'enzyme pour permettre par la suite que le malate se fixe au complexe enzyme-NAD- $Mn^{2+}$  (Lonvaud-Funel A. *et al.* 1982). Des travaux d'Arthurs *et al.* ont mis en évidence que l'activité de cette enzyme est favorisée par la présence comme substrat de l'énantiomère L-malate plutôt que par celle du D-malate. Les deux énantiomères sont transportés dans la cellule à la même vitesse, ce n'est qu'une fois à l'intérieur que le D-malate nécessitera une étape de conversion pour pouvoir être décarboxylé lui aussi par l'EML (Arthurs C.E. *et al.* 1999).

Le complexe enzymatique (présent notamment dans *Leuconostoc mesenteroides*) met en jeu des intermédiaires réactionnels tels que l'oxalacétate (provenant du L-malate) puis le pyruvate avant de produire le L-lactate (Caspritz



G. *et al.* 1983). Ce complexe se décompose en une malate déshydrogénase, puis une oxalacétate décarboxylase puis une L-Lactate déshydrogénase (Lonvaud-Funel A. *et al.* 1982).

Il se peut qu'en présence d'une quantité insuffisante d'acide malique la décarboxylation ne puisse pas être obtenue (Bozoglu T.F. *et al.* 2004). Cette fermentation peut avoir lieu de façon séquentielle après achèvement de la consommation des sucres. De manière générale, à la fin de la fermentation alcoolique, le milieu riche en nutriments (grâce à l'autolyse des levures) est favorable à une production d'acide L-lactique (Pollard A. *et al.* 1966; Herrero M. *et al.* 1999 a). Néanmoins, la fermentation malolactique est le plus souvent réalisée en cours de fermentation alcoolique (transformations simultanées). Quand elle débute avant la fin de la consommation des sucres, ce substrat peut être utilisé par les bactéries lactiques pour produire en quantité importante les acides D-lactique et acétique (Herrero M. *et al.* 1999 c). La stœchiométrie molaire entre l'acide malique consommé et l'acide lactique formé n'est alors plus respectée (Sanchez A. *et al.* 2010). De manière générale, les deux transformations (fermentation alcoolique et fermentation malolactique) sont limitées quand elles sont menées en même temps (Dueñas M. *et al.* 1994).

Selon les bactéries lactiques présentes (homofermentaire ou hétérofermentaire), l'acide lactique n'est pas le seul produit formé (Pollard A. *et al.* 1966; Bozoglu T.F. *et al.* 2004). Les sous-produits obtenus à partir de ces souches seront développés au paragraphe 7 « Modifications chimiques lors de la fermentation malolactique ».

<b>LES FACTEURS D'INFLUENCE DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE ET DE LA FERMENTATION MALOLACTIQUE</b>
--

## **5. Les facteurs matériels et issus des pratiques cidricoles**

Les microorganismes responsables de la fermentation alcoolique et de la fermentation malolactique sont pour la plupart endogènes à la pomme. Il est donc compréhensible que le fruit lui-même soit le premier facteur influençant l'importance et l'efficacité des populations.

### **5.1 Le fruit**

L'état sanitaire des pommes est un élément déterminant pour mener à bien la fermentation alcoolique et la fermentation malolactique. Morrissey et *al.* (Morrissey W.F. *et al.* 2004) ont reporté qu'en présence d'un fruit sain le nombre de colonies de *Saccharomyces* était d'environ  $3.10^3$  UFC/mL, alors que dans un fruit pourri ce nombre peut augmenter jusqu'à  $5.10^6$  UFC/mL. Une forte proportion en *Saccharomyces* pouvant opérer une inhibition des levures du genre *Hanseniaspora* (voir paragraphe 3.1.), la fermentation alcoolique démarrera très rapidement mais limitera l'apparition de composés volatils liés au métabolisme des souches apiculées.

L'état sanitaire n'explique pas à lui seul les populations de microorganismes retrouvées dans les moûts de pommes. D'après Keller et *al.* (Keller S.E. *et al.* 2004) la variété de la pomme est tout aussi déterminante. Une pomme qui contiendrait plus de sucre et aurait un pH plus élevé (acidité totale basse) apporterait une population bactérienne plus importante qu'une pomme peu sucrée et acide.

Le Tableau 4, reprenant les expérimentations de Keller *et al.* (Keller S.E. *et al.* 2004), compare les populations microbiennes de différentes variétés de pommes, récoltées de diverses façons (au sol ou dans l'arbre) et dans un état sanitaire bien défini (sain ou blessé). Cette représentation met bien en évidence que pour une même variété de pomme, c'est toujours lors de la récolte au sol que la population microbienne est la plus importante. Quand la récolte est faite dans l'arbre, le fait que les pommes fraîches soient blessées ou pas a un effet

certain sur la population bactérienne. Quant aux pommes stockées, si une différence est visible dans l'abondance des microorganismes, Keller *et al.* expliquent que le temps de stockage (5 mois) est peut être insuffisant pour noter des différences plus importantes entre les fruits blessés et sains.

Tableau 4 : Influence de la récolte, de l'état sanitaire et du stockage des pommes sur la population microbienne

Récolte et traitement après récolte	Décompte sur plaque en aérobie (log CFU/g) ; <i>Brix</i>						
	Fuji	Gala	Golden Delicious	Granny Smith	Mc Intosh	Red Delicious	Red Rome
Fraîches, récolte dans l'arbre, blessées	2,21 <i>18,0</i>	2,06 <i>14,1</i>	1,6 <i>12,9</i>	1,47 <i>12,5</i>	1,4 <i>11,6</i>	2,97 <i>12,5</i>	1,72 <i>12,9</i>
Fraîches, récolte dans l'arbre, non blessées	2,33 <i>16,3</i>	2,21 <i>14,6</i>	2,11 <i>12,5</i>	2,54 <i>13,1</i>	2,32 <i>11,8</i>	1,74 <i>12,7</i>	1,74 <i>14,5</i>
Fraîches, récolte au sol, non blessées	5,81 <i>17,8</i>	5,63 <i>14,6</i>	4,53 <i>13,4</i>	5,01 <i>13,5</i>	4,46 <i>12,2</i>	4,86 <i>14,4</i>	4,24 <i>12,8</i>
Stockées, récolte dans l'arbre, blessées	2,72 <i>16,6</i>	1,69 <i>15,2</i>	2,12 <i>13,5</i>	1,77 <i>12,1</i>	1,96 <i>13,1</i>	3,3 <i>14,0</i>	2,28 <i>14,4</i>
Stockées, récolte dans l'arbre, non blessées	3,45 <i>15,1</i>	3,56 <i>14,4</i>	2,71 <i>12,7</i>	2,29 <i>14,4</i>	1,64 <i>11,3</i>	2,53 <i>14,4</i>	3,18 <i>12,4</i>

Tableau tiré des travaux de Keller *et al.* (Keller S.E. *et al.* 2004), en italique le °Brix

En faisant l'analyse du tableau ligne par ligne et en comparant, pour le même état, les variétés de pommes entre elles, il devient évident que la teneur en sucres et l'acidité du fruit sont vraiment deux paramètres fortement influant sur le patrimoine microbien. Plus les pommes sont douces et sucrées, plus la population en microorganismes endogènes peut être importante.

Par ailleurs, la teneur en azote des pommes peut aussi être vectrice de différences pour le développement des microorganismes. En résumé, le patrimoine microbien du cidre peut être très largement influencé par les variétés de pomme utilisées (Le Queré J.M. *et al.* 2010).

## 5.2 Le système de presse

Le système de presse utilisé est aussi un facteur important susceptible de modifier la qualité de la matière première lors de la fabrication du cidre. Une presse pneumatique est responsable d'une turbidité plus importante du pur jus (del Campo G. *et al.* 2003) en comparaison avec une presse traditionnelle. La presse pneumatique permet un contact plus réduit avec l'oxygène ambiant (temps de contact de l'ordre de quelques heures) alors que la presse traditionnelle favorise justement l'oxygénation du milieu, puisque cette opération plus lente nécessite plus de temps (temps de contact pouvant être supérieur à

24 heures). Une presse traditionnelle aurait ainsi tendance à favoriser la multiplication des microorganismes.

Par ailleurs comme en témoignent les résultats obtenus par Suarez Valles *et al.* (Suarez Valles B. *et al.* 2007)(Figure 3), un système de presse rapide favorise une large prédominance de non-*Saccharomyces* dans le moût initial alors qu'une presse traditionnelle plus lente est source d'obtention d'une forte population initiale en *Saccharomyces*.

En France, avec l'utilisation de presse continue (à bandes) et semi-continue (à piston), ce sont majoritairement des systèmes de presse rapide qui sont utilisés (Le Queré J.M. *et al.* 2010). Après cette étape, il s'ensuit une chronologie d'apparition de différentes espèces de levures (Figure 3) : pendant les 4 premiers jours environ les *non-Saccharomyces* prédominent, puis, passé ce délai ce sont les *Saccharomyces* qui prennent le relais (*bayanus* plus particulièrement). En fin de la fermentation, *S. cerevisiae* est généralement majoritaire.

En revanche, les presses lentes utilisées en Espagne avantagent la présence de *Saccharomyces* (*bayanus* et *cerevisiae*) dès l'obtention du moût (voir « presse » traditionnelle en Figure 3). Ces observations mettent clairement en avant que le temps de contact avec la surface de travail et l'oxygène est un élément clef pour la multiplication des levures *Saccharomyces* (Morrissey W.F. *et al.* 2004; Suarez Valles B. *et al.* 2007). Des observations similaires ont été faites sur les populations de bactéries lactiques qui sont aussi plus importantes lors de l'utilisation d'une presse traditionnelle lente (del Campo G. *et al.* 2003).

L'oxygène apporté lors de cette opération, et plus particulièrement en cas de presse sur plusieurs jours, va favoriser ainsi une production plus importante d'éthanol et d'acide acétique (Suarez Valles B. *et al.* 2007).

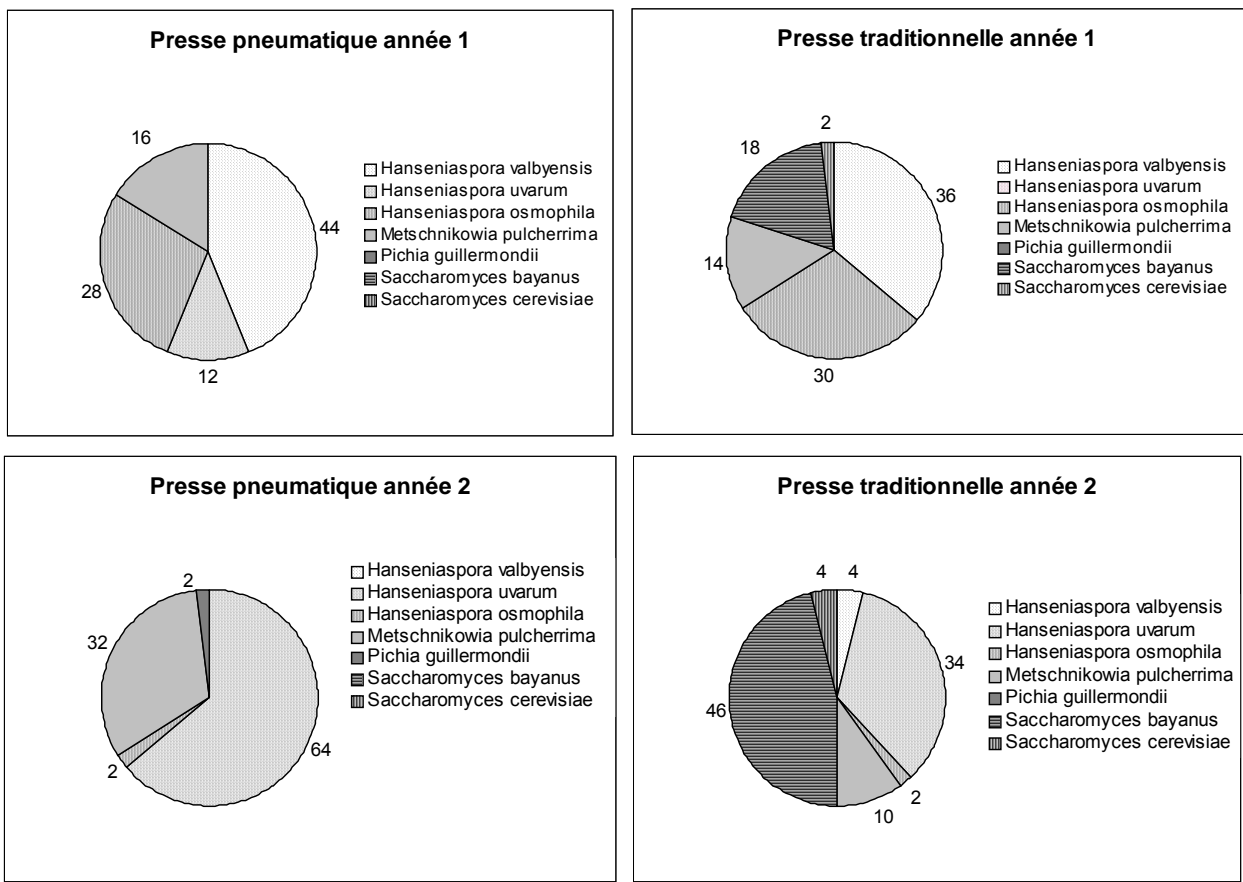


Figure 3 : Distribution des levures (%) au 1er jour de la fermentation de moûts de pomme

Moûts obtenus au moyen d'une presse rapide en 8H (Presse pneumatique, en haut) et moûts obtenus au moyen d'une presse lente en 3 jours (presse traditionnelle, en bas) selon Suarez Valles B. *et al.* (Suarez Valles B. *et al.* 2007). Etude réalisée sur deux années consécutives, 2001 (année 1) et 2002 (année 2)

### 5.3 La macération

La macération active les polyphénoloxydases (PPO) oxydant les polyphénols responsables du brunissement du produit (Alonso-Salces R.M. *et al.* 2005). La formation des alcools linéaires peut être d'origine bactérienne mais aussi pluri-enzymatique. Les lyxogénases, les hydroperoxydases et les alcool déshydrogénases convertissent les acides gras du jus en alcools linéaires et en aldéhydes (Blanco Gomis D. *et al.* 2002). C'est le contact prolongé avec l'oxygène qui active ces enzymes (Le Queré J.M. *et al.* 2010).

La macération s'accompagne d'un temps d'oxygénation plus important favorisant ainsi le développement des microorganismes sur le même principe qu'une presse lente.

#### 5.4 La température

Une fois le jus mis en cuve, la température du chai régit les vitesses de fermentation (Herrero M. *et al.* 1999 c). Dans le cas de la fermentation alcoolique, les levures sont très influencées par la température extérieure aux cuves.

A travers des variations de température, la contribution des *Saccharomyces* et des non-*Saccharomyces* est directement touchée (Xu Y. *et al.* 2006). Les conséquences d'une température trop basse peuvent être irréversibles pour le produit : faible rendement en éthanol, sucres résiduels métabolisables (Cabranes C. *et al.* 1996) et présence de glycérol (Suarez Valles B. *et al.* 2007). A l'inverse, des températures plus fortes, comme celles enregistrées au Brésil, peuvent conduire à une fermentation alcoolique achevée très rapidement en moins de 15 jours (Nogueira A. *et al.* 2007). Morrissey *et al.* (Morrissey W.F. *et al.* 2004) indiquent qu'à température de fermentation de l'ordre de 15°C les levures *Saccharomyces* prennent le dessus et mènent seules la fermentation des sucres en alcool. A l'inverse, les fermentations tardives (températures extérieures avoisinant 10°C) s'accompagnent d'apparitions successives de non-*Saccharomyces* puis de *Saccharomyces*.

Les bactéries sont aussi thermosensibles, la dégradation de l'acide malique est d'autant plus rapide que la température est forte (22°C) (Herrero M. *et al.* 1999 c; Sanchez A. *et al.* 2010). Par ailleurs, en présence de température plus importante (27°C), il a été observé que le rendement de consommation de ce même acide était diminué (Herrero M. *et al.* 1999 a). Les activités secondaires des bactéries lactiques (comme la réduction de l'acide quinique, la formation d'acétate d'éthyle, d'acétoïne, d'alcool supérieurs et d'acétaldéhyde) peuvent donc être aussi ralenties (Suarez Valles B. *et al.* 2005).

#### 5.5 Le sulfitage

Il est de plus en plus commun d'avoir recours à un contrôle des fermentations par addition d'anhydride sulfureux dans le cidre (Jarvis B. 2003) en raison de ses propriétés antioxydantes et antiseptiques. Cette opération a pour but d'inhiber la croissance des levures oxydatives et des bactéries susceptibles d'être à l'origine de dérives organoleptiques de type « animales ». Selon le pH du milieu, les

équilibres entre les formes présentes sont différents ( $\text{SO}_2$ ,  $\text{HSO}_3^-$  et  $\text{SO}_3^{2-}$ ) et l'efficacité varie donc (Jarvis B. 2004).

Le sulfitage modifie fortement la composition volatile des cidres (Herrero M. *et al.* 2003 a) et a pour principal défaut d'affecter le développement de certains genres de levures faiblement fermentaires comme les *Hanseniaspora* tout en favorisant la croissance des *Saccharomyces*, résistantes au sulfitage (Jarvis B. 2004). Une autre alternative à la croissance des levures et des bactéries indésirables peut consister à remplir les cuves sous gaz carbonique (Jarvis B. 2004).

## 5.6 La clarification

Le contrôle des populations de microorganismes peut être mené efficacement grâce à la clarification du moût. Ce procédé peut être réalisé avant la fermentation alcoolique, et dans ce cas, la quantité de nutriments disponibles sera moins importante et la vitesse de fermentation pourra s'en trouver réduite (Nogueira A. *et al.* 2008). Cette opération a pour but de ralentir les procédés fermentaires en diminuant la quantité de nutriments dans le milieu.

La clarification peut aussi être faite après un départ de la fermentation alcoolique quand environ 20 g/L de sucres fermentescibles ont déjà été consommés (Nogueira A. *et al.* 2008). Qu'elle soit faite de manière naturelle (e.g. décantation) ou enzymatique, la teneur en alcool supérieurs peut s'en trouver influencée (Vidrih R. *et al.* 1999).

## 5.7 Les cuves

Plusieurs travaux mettent en avant que le matériau des cuves est un élément tout aussi important pour le développement de populations de microorganismes. La structure poreuse des cuves en bois permet la rétention et donc la colonisation de nombreux microorganismes. De plus, il s'avère difficile de les éliminer par lavage et lors de leur réutilisation elles peuvent servir de réservoirs de levures et de bactéries (Swaffield C.H. *et al.* 1995). A l'inverse, l'utilisation de cuves en inox, moins poreuses, peut permettre une qualité constante du cidre car un rinçage de ce type de cuve peut être suffisamment efficace pour éviter une contamination microbienne (Swaffield C.H. *et al.* 1997). Cependant, l'utilisation de ces cuves métalliques par rapport aux cuves traditionnelles peut

entraîner une perte de certains microorganismes participant à la formation de composés importants pour la qualité organoleptique du cidre. Les travaux de del Campo *et al.* (del Campo G. *et al.* 2003) mettent aussi en avant une augmentation de la population de bactéries lactiques lors d'une utilisation de cuves en bois.

### **5.8 La maturation en bouteille**

La maturation en bouteille est aussi une pratique cidricole pouvant entraîner des modifications de la composition volatile selon les souches introduites pour la seconde fermentation en bouteille et la durée de vieillissement (Rodriguez Madrera R. *et al.* 2008).



Comme nous venons de le voir, les pratiques cidricoles influencent fortement le patrimoine microbien des cidres en cours d'élaboration (cf partie 5). Les souches de levures et de bactéries peuvent ainsi être de natures très variées (cf partie 3 : La fermentation alcoolique, et partie 4 : La fermentation malolactique) ce qui n'est pas sans conséquence sur les vitesses de fermentations ainsi que sur la composition du milieu (Leguerinel I. *et al.* 1989). De nombreux sous-produits, tels que les acides organiques et les composés volatils, feront ainsi leur apparition au cours de la fermentation alcoolique et de la fermentation malolactique pour donner au produit final ses principales qualités ou défauts gustatifs et olfactifs.

Le but n'est pas, dans cette partie, de faire un bilan complet de la composition des cidres mais bien de faire un état de l'influence de ces deux transformations majeures sur l'apparition ou la disparition d'acide organiques et de composés volatils. Ces changements de la matrice seront vus tout d'abord au travers des modifications de composition liées spécifiquement à la fermentation alcoolique (cf partie 6), puis celles spécifiquement liées à la fermentation malolactique (cf partie 7) pour enfin aborder les changements liés à la chronologie de ces deux transformations (cf partie 8).

## **6. Changements issus de la fermentation alcoolique**

### **6.1. Les paramètres de base**

La teneur en éthanol, en sucres fermentescibles et la concentration de glycérol sont les paramètres de base principalement modifiés lors de cette fermentation.

La teneur en sucres initiale est dépendante des variétés de pommes utilisées (Tableau 5) et des proportions de chacune (Keller S.E. *et al.* 2004). Dans la partie précédente traitant des facteurs d'influence, nous avons pu voir, qu'en plus des variétés de pommes brassées, leur état sanitaire avait toute son importance. Le Tableau 5, tiré des travaux de Blanco Gomis *et al.* (Blanco Gomis D. *et al.* 1998), montre la diversité des teneurs en sucres dans les pommes

utilisées pour la fabrication des cidres de consommation. Le challenge est de marier des pommes sucrées apportant un fort potentiel de fermentation alcoolique et acides pour éviter un « emballement » de cette réaction par les microorganismes indésirables.

Tableau 5 : concentration (en g/kg) de sucres dans des variétés de pommes espagnoles utilisées pour l'élaboration de cidres de consommation

Variétés	Etat sanitaire	[Saccharose]	[Glucose]	[Fructose]
Callaos	Abimées	15,0 à 18,7	18,0 à 19,1	44 à 46,8
	Non abimées	9,9 à 15,4	16,7 à 19,7	42,9 à 46,0
Duron Arroes	Non abimées	7,3 à 30,1	12,0 à 17,4	33,3 à 41,1
Meana	Abimées	29,6	11,0	56,6
	Non abimées	21,4 à 33,0	6,4 à 11,9	41,3 à 49,7
Picon Rayada	Abimées	9,5 à 16,1	15,9 à 20,6	56,7 à 75,0
	Non abimées	8,0 à 9,1	17,8 à 21,7	49,8 à 56,2
Roxao	Abimées	9,4 à 15,1	20,3 à 22,4	49,5 à 63,0
	Non abimées	7,4 à 10,7	22,5 à 26,5	48,1 à 50,0

Données extraites des travaux de Blanco-Gomis *et al.* (Blanco Gomis D. *et al.* 1998)

Le fructose représente environ 70% des sucres présents dans le jus de pomme (Blanco Gomis D. *et al.* 1988; Wang D. *et al.* 2004). Selon la souche levurienne majoritaire, la consommation de glucose pourra être préférée à celle de fructose (Wang D. *et al.* 2004). La concentration de sucres dans le moût reportée est le plus souvent supérieure à 80 g/L (Wang D. *et al.* 2004; Nogueira A. *et al.* 2008). Le produit final peut contenir jusqu'à 9% d'éthanol et avoir une masse volumique proche de 1000 g/L (Herrero M. *et al.* 2005).

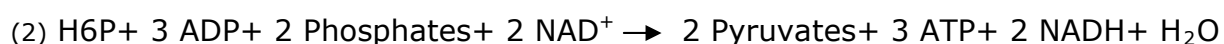
La consommation des sucres peut se faire à différentes vitesses (Tableau 6). De manière générale, c'est le protocole français qui est le plus lent avec une centaine de jours au minimum nécessaires. Les cidres espagnols répondent plutôt à des vitesses de fermentation rapides tout comme les cidres brésiliens. Il est indéniable que les températures extérieures sont le facteur qui a le plus d'influence. Dans la fabrication brésilienne (Nogueira A. 2003), on remarque que le contrôle de vitesse permet tout de même de doubler le temps nécessaire à la consommation des sucres (15 jours à 27 jours).

Tableau 6 : Durées de la fermentation alcoolique retrouvées dans la littérature

Fermentation lente		Fermentation rapide	
80 – 120 jours	(1)	1 – 3 semaines	(6)
30 – 60 jours	(2)	7 – 15 jours	(3)
27 jours	(3)	11 jours (ferm. séquentielles)	(5)
160 jours	(4)	4 -6 jours (ferm. simultanées)	(5)

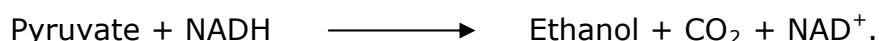
Avec (1) : (Nogueira A. *et al.* 2008) pour le cidre espagnol, (2) : (Michel A. 1988) pour le cidre français, (3) : (Nogueira A. 2003) pour le cidre brésilien, (4) : (Laplace J-M. *et al.* 1998) pour le cidre français, (5) : (Herrero M. *et al.* 1999 b) pour le cidre espagnol, (6) : (Cabranes C. *et al.* 1996) pour le cidre espagnol

Lors de la fermentation alcoolique les levures utilisent les hexoses (glucose et fructose) pour produire l'éthanol. Ils subissent tout d'abord une première réaction enzymatique (1) de phosphorylation grâce à des hexokinases ou glucokinases. Les glucose 6-phosphate et fructose 6-phosphate formés sont alors convertis (2) lors de la glycolyse en pyruvate. Pour une molécule d'hexose deux molécules de pyruvate sont obtenues au cours des réactions suivantes :



Avec H6P : Hexose 6-phosphate

En milieu anaérobie, le pyruvate sera rapidement transformé en éthanol suivant deux réactions enzymatiques. La pyruvate décarboxylase opérera tout d'abord une décarboxylation du pyruvate en acétaldéhyde puis l'alcool déshydrogénase réduira l'acétaldéhyde en éthanol pour donner le bilan réactionnel suivant :



La voie de synthèse de l'éthanol à partir des sucres est largement prépondérante mais elle est accompagnée de réactions secondaires comme celles menant à la formation de plusieurs acides organiques ou du glycérol.

## 6.2. Les acides organiques

L'acide pyruvique, est généralement considéré comme un carrefour du métabolisme cellulaire. Comme nous l'avons vu précédemment sa dégradation enzymatique par les levures conduit dans la majorité des cas à la production d'éthanol. Herrero *et al.* (Herrero M. *et al.* 1999 a) ont montré que sa

concentration augmente fortement jusqu'au milieu d'une fermentation alcoolique menée exclusivement par *Saccharomyces cerevisiae*. Cette concentration pouvant atteindre 0,6 g/L dans les cidres tend à fléchir par la suite (Whiting G.C. 1976).

Le pyruvate peut être aussi dégradé par l'action de plusieurs enzymes *via* le cycle de Krebs pour former de l'acide succinique. Ce dernier acide qui peut être présent en quantité relativement faible dans la pomme peut trouver aussi son origine lors de la fermentation alcoolique par une consommation d'acide malique par les levures (Herrero M. *et al.* 1999 a).

Les levures sont aussi susceptibles de produire une faible quantité d'acide lactique. Cette synthèse, dont le point de départ est aussi l'acide pyruvique, est majoritairement orientée vers la formation d'acide D-lactique grâce à une lactate désydrégénase (Lonvaud-Funel A. *et al.* 1982).

L'acide acétique quant à lui n'est pas uniquement produit par les bactéries acétiques, il peut être produit à de faibles concentrations par les levures pendant la fermentation alcoolique (Bartowsky E.J. *et al.* 2008).

L'acide shikimique est l'intermédiaire de la réduction bactérienne de l'acide quinique, présent dans le jus de pommes (Jarvis B. 2004), en acide dihydroshikimique pendant la fermentation alcoolique (Suarez Valles B. *et al.* 2005).

Les acides gras peuvent jouer un rôle important lors de la fermentation alcoolique. Ils peuvent en effet jouer le rôle d'inhibiteur vis-à-vis de certaines souches de levures (voir paragraphe 3.2) mais aussi d'intermédiaires de formation de composés volatils (aldéhydes ou alcools) selon Blanco-Gomis *et al.* (Blanco Gomis D. *et al.* 2001). Présents naturellement dans le fruit, la longueur de leur chaîne ainsi que leur nombre d'insaturations peuvent être variables suivant les variétés de pommes utilisées (Blanco Gomis D. *et al.* 2001; Arias Abrodo P. *et al.* 2005). Même si une grande diversité existe, Blanco-Gomis *et al.* (Blanco Gomis D. *et al.* 2002) ont démontré que les jus de pommes à cidre sont constitués majoritairement d'acides gras saturés (palmitique et stéarique). Les acides gras insaturés, beaucoup moins présents, sont eux dominés par la présence d'acide oléique. Leur quantité globale est d'environ 10 mg.L<sup>-1</sup> dans les jus de pommes à cidre (voir figure ci-jointe).

Tableau 7 : Concentrations en acides gras trouvés dans des jus de pommes à cidres douces ou amères selon Blanco-Gomis *et al.* (Blanco Gomis D. et al. 2002)

fatty Acid	sweet		sharp			
	Coloradona	Verdialona	Durona de Tresali	Raxao	Solarina	Xuanina
caprylic (C8)	0.60 ± 0.03	0.45 ± 0.04	0.24 ± 0.03	0.56 ± 0.04	0.49 ± 0.05	0.34 ± 0.06
capric (C10)	0.27 ± 0.01	0.20 ± 0.04	0.24 ± 0.04	0.16 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.11 ± 0.03
lauric (C12)	0.23 ± 0.05	0.23 ± 0.03	0.22 ± 0.02	0.31 ± 0.04	0.17 ± 0.02	0.14 ± 0.03
myristic (C14)	0.43 ± 0.07	0.46 ± 0.02	0.53 ± 0.03	0.62 ± 0.02	0.31 ± 0.02	0.19 ± 0.06
pentadecanoic (C15)	0.15 ± 0.06	0.23 ± 0.04	0.23 ± 0.03	0.24 ± 0.03	0.20 ± 0.03	0.30 ± 0.02
palmitic (C16)	4.90 ± 0.26	4.59 ± 0.15	4.03 ± 0.38	2.46 ± 0.84	5.69 ± 0.27	4.18 ± 0.22
palmitoleic (C16:1 <sup>AA</sup> )	0.09 ± 0.01	0.13 ± 0.02	0.06 ± 0.03	0.12 ± 0.05	0.11 ± 0.01	0.06 ± 0.04
stearic (C18)	4.60 ± 0.06	5.18 ± 0.43	4.66 ± 0.35	4.29 ± 0.09	4.93 ± 0.31	3.12 ± 0.26
oleic (C18:1 <sup>AA</sup> )	0.38 ± 0.09	0.29 ± 0.03	0.44 ± 0.03	0.33 ± 0.09	0.29 ± 0.03	0.28 ± 0.05
linoleic (C18:2 <sup>AA,12</sup> )	0.22 ± 0.09	0.10 ± 0.04	0.09 ± 0.01	0.07 ± 0.03	0.06 ± 0.03	0.07 ± 0.01

Le cidre après fermentation alcoolique contient une proportion d'acides gras relativement identique mais de longueurs de chaîne bien différentes. Il est dominé par des acides gras saturés plus courts tels que les acides hexanoïque, octanoïque et décanoïque (voir Tableau 8).

Tableau 8 : Concentrations en acides gras trouvés dans des cidres selon Blanco-Gomis *et al.* (Blanco Gomis D. et al. 2001)

fatty acid	1996 harvest		1997 harvest		1998 harvest	
	mg/L	%	mg/L	%	mg/L	%
caproic (C6)	3.2	24.2	1.5	13.2	3.0	19.7
caprylic (C8)	2.8	21.2	2.0	17.5	2.0	13.2
capric (C10)	3.5	26.5	3.6	31.6	5.3	34.9
lauric (C12)	0.7	5.3	0.5	4.4	0.7	4.6
myristic (C14)	0.6	4.5	0.4	3.5	0.5	3.3
pentadecanoic (C15)	0.1	0.8	0.1	0.9	0.1	0.7
palmitic (C16)	1.4	10.6	1.7	14.9	2.1	13.8
palmitoleic (16:1)	0.1	0.8	0.2	1.8	0.1	0.7
stearic (C18)	0.3	2.3	0.5	4.4	0.5	3.3
oleic (C18:1)	0.2	1.5	0.4	3.5	0.7	4.6
linoleic (C18:2)	0.2	1.5	0.4	3.5	0.1	0.7
linolenic (C18:3)	0.1	0.8	0.1	0.9	0.1	0.7
total	13.2		11.4		15.2	

La présence des acides gras de moyenne chaîne dans les moûts inhibe l'avancement de la fermentation alcoolique (Lafon-Lafourcade S. *et al.* 1984). En effet, la toxicité de ces acides gras augmente avec l'acidité du milieu. L'acide décanoïque plus long est plus inhibiteur que l'acide octanoïque (Viegas C.A. *et al.* 1989).

### 6.3. Le glycérol

Le glycérol est un des composés majoritaires formés lors de la fermentation alcoolique des cidres et peut atteindre plusieurs g/L (voir Tableau

9). Son apparition est concomitante à celle de l'acide pyruvique, tous les deux étant issus du glucose-6-phosphate (voir paragraphe 6.1). Le glucose-6-phosphate produit du glyceraldehyde-6-phosphate à l'origine de la formation de pyruvate et de la dihydroxyacétone qui est le précurseur de la formation de glycérol. Néanmoins, l'équilibre entre le glyceraldéhyde-6-phosphate et la dihydroxyacétone est fortement à l'avantage du phosphate ce qui explique l'orientation majoritaire de la fermentation vers la production de pyruvate puis d'éthanol (Scanes K.T. *et al.* 1998). La production de glycérol peut être renforcée par une augmentation de la température (Blanco Gomis D. *et al.* 1988; Suarez Valles B. *et al.* 2007). Elle peut aussi varier de façon importante suivant les espèces de levures présentes. Cabranes *et al.* (Cabranes C. *et al.* 1996), rappellent en effet que certaines souches apiculées produisent du glycérol en quantité plus importante que *Saccharomyces cerevisiae*.

Tableau 9 : Concentrations de glycérol rapportées en g/L dans les cidres espagnols de consommation

Références	[glycérol] g/L	Température (°C) de fermentation	Ecart-type et nombre d'échantillons	Détails fermentation
(Cabranes C. <i>et al.</i> 1996)	4,60	12	$\sigma = 0,44$ ; n=6	Fermentation de pur jus
	5,46	18	$\sigma = 1,77$ ; n=6	
(Suarez Valles B. <i>et al.</i> 2007)	4,0	12-15	$\sigma = 0,4$ ; n=2	Presse pneumatique, pur jus
	4,6	12-15	$\sigma = 0,2$ ; n=2	Presse traditionnelle, pur jus
(Picinelli A. <i>et al.</i> 2000)	3,04	NI	$\sigma = 0,25$ ; n=4	Cidres commerciaux
(del Campo G. <i>et al.</i> 2003)	0,055 <sup>(1)</sup>	15	$\sigma = 0,005$ ; n=4	Presse traditionnelle, pur jus, pas de SO <sub>2</sub> rajouté
	3,00 <sup>(2)</sup>	15	$\sigma = 0,22$ ; n=4	
	4,00 <sup>(3)</sup>	15	$\sigma = 0,82$ ; n=4	
	4,05 <sup>(4)</sup>	15	$\sigma = 0,13$ ; n=4	
	3,01 <sup>(5)</sup>	15	$\sigma = 0,09$ ; n=4	

Avec teneurs dans (1) pur jus, (2) après 15 jours de fermentation, (3) 35 jours, (4) 48 jours et (5) 64 jours.

La présence de glycérol dans les cidres est synonyme de rondeur en bouche et de douceur sans pour autant avoir, en raison de sa faible volatilité, un rôle direct sur la qualité aromatique (Picinelli A. *et al.* 2000; del Campo G. *et al.* 2003). Il peut être utilisé à son tour comme source de carbone par les levures et les bactéries et être à l'origine de la synthèse de sous-produits (voir paragraphe 9.2 : Dérives et excès des deux procédés fermentaires).

#### 6.4. Les composés volatils

Lors de la fermentation alcoolique de nombreux composés sont produits comme métabolites secondaires. Les esters apportent plutôt des notes fruitées et florales, les alcools supérieurs (fort nombreux à être produits) apportent des « arômes de fond » et les composés phénoliques peuvent aussi bien générer des notes aromatiques intéressantes ou désagréables. Les composés volatils retrouvés dans les cidres appartiennent majoritairement à ces trois classes chimiques.

##### *Les alcools*

Les **alcools supérieurs** sont, pour leur part, directement issus de l'action des levures. Ils sont majoritairement représentés dans les cidres par les isopentanol (2- et 3-méthylbutanol) (Mangas J.J. *et al.* 1996) suivis par l'isobutanol, le propanol, le butanol ou encore l'hexanol.

Deux voies métaboliques peuvent mener à la formation des alcools supérieurs lors de la fermentation alcoolique : la transformation des sucres ou bien celle des acides aminés en  $\alpha$ -cétoacides. Les  $\alpha$ -cétoacides subissent une décarboxylation pour former des aldéhydes. Les aldéhydes sont alors réduits en alcools correspondants (Lambrechts M.G. *et al.* 2000). Une majorité des alcools supérieurs (environ 75%) est susceptible de provenir du métabolisme des acides aminés alors que les autres (environ 25%) sont issus du métabolisme des sucres (Ribereau-Gayon J. *et al.* 1975).

Le 3-méthylbutanol qui représente environ 80% des isopentanol (2- et 3-méthylbutanol) dans les cidres (Schumacher K. *et al.* 1998) est susceptible de provenir en grande partie de la leucine *via* la formation de 3-méthylbutanal. Dans le même ordre d'idée, le 2-méthylbutanol peut résulter de la transformation de l'isoleucine ; l'isobutanol de la valine et le propanol de la thréonine (Lambrechts M.G. *et al.* 2000).

Etant donné que la production d'alcools supérieurs est visiblement une caractéristique individuelle des souches de levures (Giudici P. *et al.* 1990), des différences de composition volatile et plus particulièrement d'alcool supérieurs sont notées par les auteurs selon les souchesensemencées dans le vin. Les travaux de Rankine (Rankine B.C. 1967) montrent que pour l'espèce *Saccharomyces* deux catégories sont identifiables, celles qui ont un fort potentiel

à produire des alcools supérieurs et celle qui en ont un plus faible. Gil *et al.* ainsi que Herraiz *et al.* (Herraiz T. *et al.* 1990; Gil J.V. *et al.* 1996) ont mis en avant que les *Saccharomyces* avaient une plus grande capacité que les non-*Saccharomyces* à produire des alcools supérieurs dans le vin.

L'oxygénation et la proportion d'acides aminés disponibles sont autant de paramètres pouvant influencer leur profil d'évolution (Leguerinel I. *et al.* 1989; Vidrih R. *et al.* 1999; Rodriguez Madrera R. *et al.* 2008). Sous des conditions oxydatives, les levures à faible capacité fermentative (*Pichia sp.*, *H. anomala* et *Candida sp.*) produisent plus d'alcool de fusel à partir des sucres fermentescibles (Zoecklein B.W. *et al.* 1995). Les observations de Mauricio *et al.* (Mauricio J.C. *et al.* 1997) confirment cette règle : les concentrations d'éthanol, d'alcool isoamylique, d'isobutanol, de phényléthanol, sont plus importantes en condition semi-aérobie.

D'après les travaux effectués sur le vin, les composés azotés tels que les acides aminés (composés azotés très majoritaires dans le moût) influencent la formation des alcools supérieurs par voie anabolique (Schulthess D. *et al.* 1978).

Enfin il faut signaler que la présence des alcools supérieurs et leur concentration influencent grandement l'analyse sensorielle du produit, apportant des notes plutôt désagréables de type « solvant » (Williams A.A. 1974; Calleja A. *et al.* 2005; Versini G. *et al.* 2009).

Le **2-phényléthanol** qui n'est pas à proprement parler un alcool supérieur, mais plutôt un alcool aromatique, est présent dès la phase initiale de fermentation (Vidrih R. *et al.* 1999). Il est généralement considéré dans les boissons fermentées comme provenant de la transformation de la phénylalanine *via* la formation de phényléthanal (Lambrechts M.G. *et al.* 2000). Il peut atteindre une concentration supérieure à 100 mg/L (Mangas J.J. *et al.* 1996) dans certains cidres, il confère au produit une odeur florale agréable de rose (Xu Y. *et al.* 2007).

Le Tableau 10, synthétise les concentrations en alcools supérieurs retrouvées dans différents cidres de consommation. On peut remarquer que certains



composés sont fortement présents par rapport à d'autres. Par exemple les alcools isoamyliques (2- et 3-méthylbutanol) peuvent dépasser la centaine de mg/L là où les alcools à 3 ou 4 carbones dépassent rarement 50 mg/L. Enfin, le 2-phényléthanol peut être rencontré autour de la centaine de mg/L aussi. L'ensemble de ces composés peut contribuer à la note aromatique de fond du produit car les concentrations en alcools supérieurs sont relativement élevées (supérieures au mg/L) si on les compare à celles rencontrées pour d'autres composés volatils.

Tableau 10 : concentrations (en mg/L) en alcools supérieurs rencontrés dans les cidres de consommation

Références ; Nb échantillons (n)		[Propanol]	[Butanol]	[isobutanol]	[isopentanol]	[2-phényléthanol]
(Williams A.A. 1974)		5,0	5,0	25,0	80,0	50,0
(Rodriguez Madrera R. <i>et al.</i> 2008) ; n=5		18,9 (0,8)	7,37 (0,1)	50,1 (2,0)	228,1 (10,3)	46,1 (4,2)
		14,5 (0,2)	7,4 (0,1)	49,0 (2,1)	231,1 (14,9)	50,8 (4,4)
(Vidrih R. <i>et al.</i> 1999) ; n=3	Pommes Gala macérées	18,3 (0,9)	22,3 (2,1)	16,8 (0,6)	91,4 (3,8)	2,4 (0,1)
	Pommes Gala non macérées	15,4 (1,1)	15,9 (1,9)	7,1 (0,3)	67,6 (1,8)	2,1 (0,3)
	Pommes Gluster non macérées	2,1 (0,2)	2,1 (0,2)	14,5 (0,6)	64,7 (3,6)	1,3 (0,2)
Leguerinel I. <i>et al.</i> 1989, n=40	Moût avec 34g/L de fructose résiduel	4,67 (1,8)		2,7 (1,1)	16,0 (5,1)	
	Moût avec 17g/L de fructose résiduel	5,45 (2,0)		3,73 (2,1)	23,34 (11,2)	
(Suarez Valles B. <i>et al.</i> 2007) ; n=2	Année 1 (2 types de presse)	7,5 (0,5)	6,5 (0)	23,5 (2,5)	166,5 (24,5)	94,5 (26,5)
	Année 2 (deux types de presse)	9,5 (1,5)	5,0 (0,5)	51,0 (1,6)	200,0 (53,0)	55,5 (10,5)
Picinelli A. <i>et al.</i> 2000 ; n=4		22,3 (6,90)	5,4 (1,45)	31,9 (5,5)	79,0 (10,5)	99,5 (26,0)
del Campo G. <i>et al.</i> 2003) ; n=4	Mise en cuve	5,6 (0,2)	5,9 (0,1)	0	0,7 (0,1)	
	Après 15 jours	8,25 (1,0)	17,72 (6,6)	34,5 (28,4)	11,8 (0,6)	
	Après 30 jours	10,7 (0,7)	12,6 (0,5)	31,4 (5,3)	15,9 (1,5)	
	Après 45 jours	11,8 (2,2)	12,2 (0,1)	35,0 (5,9)	15,9 (1,70)	
	Après 60 jours	12,6 (3,3)	12,1 (0,1)	33,9 (8,7)	15,9 (1,9)	

L'écart type de la série d'échantillons est indiqué entre parenthèses

### Les esters

Les esters sont les composés volatils majoritaires dans le cidre après l'éthanol (Valappil Z.A. *et al.* 2009). Ils se caractérisent par une très forte présence d'acétate d'éthyle qui peut représenter à lui seul entre 55 et plus de 90 % des esters totaux (Lilly M. *et al.* 2000; Xu Y. *et al.* 2006).

Plusieurs autres acétates accompagnent la formation d'acétate d'éthyle lors de la fermentation alcoolique. Ces composés sont supposés être issus de l'acétylation (estérification par l'acide acétique) de molécules d'alcool correspondantes au moyen d'acétyltransférases comme ont pu le démontrer Lilly *et al.* (Lilly M. *et al.* 2000) pour l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*. La forte proportion en acétate d'éthyle dans les boissons fermentées peut ainsi être expliquée par la prédominance en éthanol par rapport aux autres alcools (en l'absence de bactéries acétiques). La présence d'alcools supérieurs est donc importante en vue de la transformation de 3-méthylbutanol (alcool isoamylique) en acétate de 3-méthylbutyle (acétate d'isoamyle), d'hexanol en acétate d'hexyle, de butanol en acétate de butyle, ou encore de 2-phényléthanol en acétate de 2-phényléthyle. La quantité d'acétates produite par les levures semble être fortement influencée par la nature des souches menant la fermentation alcoolique : les *Saccharomyces* produisent visiblement moins d'acétates que les non-*Saccharomyces*. Xu *et al.* (Xu Y. *et al.* 2006) ont comparé les potentiels de *Hanseniaspora valbyensis* et *Saccharomyces cerevisiae* à former des composés volatils ; ils ont pu démontrer que *H. valbyensis* permettait d'obtenir de plus fortes concentrations en acétate d'éthyle et en acétate de 2-phényléthyle alors que *S. cerevisiae* permettait de garder plus d'alcool isoamylique et d'isobutanol libres (non estérifiés) (Tableau 11). Ceci tend à démontrer que les *Saccharomyces* semblent moins bien convertir les alcools en acétates correspondants. Cette idée a été confirmée pour des fermentations de jus de raisin par Plata *et al.* (Plata C. *et al.* 2003) ; ces derniers ont néanmoins observé que la production d'acétates pouvait être très inégale suivant les espèces de non-*Saccharomyces* rencontrées.

Tableau 11 : teneurs en esters (mg/L) dans un vin à distiller (Lilly M. *et al.* 2000) et dans des cidres (Xu Y. *et al.* 2006)

Références	Conditions de fermentations	Acétate d'éthyle	Acétate d'isoamyle	Butanoate d'éthyle	Hexanoate d'éthyle	Octanoate d'éthyle	Décanoate d'éthyle
Lilly M. <i>et al.</i> 2000	<i>S. cerevisiae</i> souche WE228	133,5	9,2	0,6	1,4	2,4	2,2
	Souche WE228 modifiée	446,0	35,4	0,6	1,7	2,4	2,3
	<i>S. cerevisiae</i> souche VIN 13	208,1	13,1	0,5	1,6	2,1	2,3
	Souche VIN13 modifiée	868,6	45,6	0,2	1,9	2,2	1,9
Xu Y. <i>et al.</i> 2006	<i>H. valbyensis</i> à $4 \cdot 10^6$ CFU/mL	87,7	0,7	0	1,6	0,04	0,2
	<i>S. cerevisiae</i> à $4 \cdot 10^6$ CFU/mL	15,4	0,4	0,5	3,6	01,0	0,5
	<i>H. valbyensis</i> à $1 \cdot 10^2$ CFU/mL puis <i>S. cerevisiae</i> à $2 \cdot 10^6$ CFU/mL	48,1	1,5	0	2,7	0,2	0,6
	<i>S. cerevisiae</i> uniquement	14,1	0,4	0,35	3,9	1,2	0,54
	<i>H. valbyensis</i> à $2 \cdot 10^6$ CFU/mL puis <i>S. cerevisiae</i> (jour 3)	54,3	0,5	0,15	2,5	1,1	0,4
	<i>H. valbyensis</i> à $2 \cdot 10^6$ CFU/mL puis <i>S. cerevisiae</i> (jour 9)	65,0	0,5	0	2,00	1,0	0,4
	<i>H. valbyensis</i> à $2 \cdot 10^6$ CFU/mL puis <i>S. cerevisiae</i> (jour 15)	69,9	0,5	0	2,0	0,2	0,5

Plusieurs esters éthyliques ont aussi pu être identifiés dans les cidres en cours de fermentation comme le butanoate d'éthyle, le 2-méthylbutanoate d'éthyle, l'hexanoate d'éthyle et l'octanoate d'éthyle (Rodriguez Madrera R. *et al.* 2005). Ces esters sont formés par les levures et plus particulièrement par les *Saccharomyces* grâce soit à l'enzyme éthanol hexanoyl-transférase soit aux éthanol acyltransférases (Saerens S.M. *et al.* 2006). Cette estérification lente est réalisée entre l'éthanol et les acides issus des acides aminés (ou des dérivés d'acides aminés) correspondants (Antalick G. *et al.* 2010).

Des esters comme l'isovalérate d'éthyle et de méthyle, sont typiques de la pomme (Jarvis B. 2004). L'analyse des composés méthyl ramifiés des pommes (Schumacher K. *et al.* 1998) montre que plusieurs variétés de pommes, présentent très majoritairement les énantiomères S de l'acétate de 2-méthylbutyle, du 2-méthylbutanoate d'éthyle et des esters aliphatiques (propanoate, butanoate et hexanoate) de 2-méthylbutyle. La chute de ce type d'esters observée par Rodriguez *et al.* (Rodriguez Madrera R. *et al.* 2008) en fin de fermentation alcoolique a été expliquée comme étant la conséquence de la présence des levures (activité estérase) dans le milieu ou bien de l'absorption de ces composés par les parois cellulaires des levures. Ces enzymes estérases régulent l'équilibre entre les esters et les acides gras libres (Sumbly K.M. *et al.* 2010).

Une faible variation de la concentration en esters des cidres peut avoir des conséquences dramatiques sur leur qualité sensorielle finale (Sumbly K.M. *et al.* 2010). La plupart des esters sont responsables du caractère fruité des cidres, néanmoins, une quantité trop importante d'acétate d'éthyle pourra à l'inverse conférer une odeur désagréable de solvant.

#### *Les composés carbonylés*

L'acétaldéhyde est le composé carbonylé le plus important formé pendant la vinification grâce au métabolisme des levures sur les sucres (Margalith P.Z. 1981). Ceci est confirmé par les expériences d'Osborne *et al.* (Osborne J.P. *et al.* 2000) qui ont montré que la production d'acétaldéhyde est plus importante pour les levures que pour les bactéries lactiques. Selon sa concentration, il peut amener des odeurs se déclinant de la pomme à l'herbe coupée, qui peuvent être

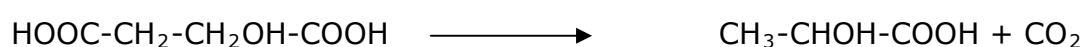
masquées par l'addition de SO<sub>2</sub> notamment dans la production espagnole (Herrero M. *et al.* 2003 a). Williams (Williams A.A. 1974) définit son seuil de perception autour de 30 mg/L. L'éthanal peut aussi être produit par oxydation de l'éthanol par les levures mais aussi par l'activité des bactéries acétiques (Liu S.-Q. *et al.* 2000).

Le diacétyl et la 2,3-pentanedione sont des produits secondaires de la synthèse d'acides aminés (valine et isoleucine) dans les levures. A la fin de la fermentation, les levures sont capables de réduire ces deux composés en acétoïne puis en 2,3-butanediol. Une partie du diacétyl dans le cidre est produit par les bactéries lactiques appartenant à l'espèce *Leuconostoc oenos* depuis l'acide pyruvique grâce à une diacetyl synthétase (Nedovic V.A. *et al.* 2000). Le 2,3-butanediol subit des variations de concentrations importantes pendant la fermentation alcoolique ; après une baisse en début-milieu de fermentation, l'augmentation qui suit est plus ou moins importante selon les souches de levures présentes (Herrero M. *et al.* 2003 a).

## **7. Modifications chimiques lors de la fermentation malolactique**

Comme nous l'avons vu en partie 4, la fermentation malolactique est principalement caractérisée par une transformation d'acide malique en acide lactique par l'action de bactéries lactiques présentes dans le cidre au cours de son élaboration. Le pKa de l'acide malique (3,46) étant plus faible que celui de l'acide lactique susceptible d'être formé (3,86), la variation du pH (gain d'environ 0,3 unité de pH) du cidre peut induire une certaine instabilité microbiologique (de Revel G. *et al.* 1999) et ainsi provoquer de profonds bouleversements de la composition physico-chimique des cidres.

La fermentation malolactique consiste en une réaction de décarboxylation. L'enzyme malolactique transforme l'acide L-malique spécifiquement en acide L-lactique en présence d'ions manganèse (Mn<sup>2+</sup>) et de NAD<sup>+</sup> comme cofacteurs suivant la réaction :



Néanmoins, cette réaction n'est pas la seule possiblement réalisable par les bactéries lactiques. La fermentation malolactique contribuera ainsi à complexifier

la composition physico-chimique du produit par l'apparition de nombreux sous-produits (acides organiques et composés volatils notamment) issus du métabolisme de ces bactéries lactiques.

### **7.1. Les acides organiques**

L'acide lactique est le principal acide organique produit lors de la fermentation malolactique. Il n'en reste pas moins que la quantité produite peut être bien supérieure à la quantité initiale en acide malique. Cet excès est reconnu pour être issu de la métabolisation des sucres par les bactéries lactiques lors de la glycolyse (Mangas J.J. *et al.* 1994). Il sera abordé dans le chapitre 9 traitant des dérivés des bactéries lactiques. La quantité finale en acide lactique dans les cidres est majoritairement issue du métabolisme des bactéries lactiques ; les levures en produisent une quantité beaucoup plus faible. Il est ainsi présent dans le produit final majoritairement sous forme d'acide L-lactique : en effet on rapporte dans la littérature que dans les cidres, il y a généralement 6 à 12 fois plus de L-lactique formé, lors de la fermentation malolactique, que de D-lactique issu du métabolisme bactérien des sucres (Cabranes C. *et al.* 1996; Herrero M. *et al.* 1999 a).

La faculté de mener cette opération fermentaire n'est pas identique pour toutes les espèces de bactéries lactiques. Sanchez *et al.* (Sanchez A. *et al.* 2010) ont comparé les capacités de *P. parvulus*, de *L. collinoides* et de *O. oeni* à amorcer la fermentation de l'acide malique. *P. parvulus* n'est pas considéré comme un bon amorceur de fermentation mais reste tout de même utile pour les changements de composition volatile. L'espèce *O. oeni* semble être celle produisant le plus d'acide lactique.

La plupart des bactéries lactiques sont capables de produire de l'acide succinique. Une étude menée spécifiquement au moyen de *Lactobacillus* élevées sur différents milieux de culture a néanmoins montré que cette production est totalement « souche-dépendante ». Cet acide organique peut trouver son origine dans différentes sources de carbone : acide citrique, acide fumarique ou acide malique (Kaneuchi C. *et al.* 1988; Mangas J.J. *et al.* 1994)

Dans le vin, certaines souches de bactéries lactiques présentant une activité fumarase sont capables de dégrader l'acide fumarique en acide lactique par l'intermédiaire du malate (Herrero M. *et al.* 2005)

L'acide citrique est peu présent dans la pomme et peut être métabolisé aussi par les bactéries lactiques telles que *Oenococcus oeni* (Nielsen J.C. *et al.* 1999). L'acide citrique est tout d'abord converti en acide oxaloacétique et en acide acétique au moyen de la citrate lyase. Cette réaction enzymatique est suivie d'une perte de dioxyde de carbone au moyen d'une oxaloacétate décarboxylase qui conduit à la formation d'acide pyruvique. L'acide pyruvique peut ainsi être à l'origine de la production de nombreux composés volatils (voir dans le paragraphe suivant).

Certaines souches de bactéries lactiques, au métabolisme oxydatif, ont quant à elles la faculté de former de l'acide acétique à partir du sucre non consommé lors de la fermentation alcoolique et à partir de l'acide L-lactique (Leguerinel I. *et al.* 1989; Dueñas M. *et al.* 1994; Jarvis B. 2004) notamment *Oenococcus Oeni*.

Une des autres activités des bactéries lactiques serait de réduire l'acide quinique en acide dihydroshikimique ou en catéchol (Carr J.G. 1959). L'acide shikimique (à 18 mg/L) est l'intermédiaire de la réduction bactérienne de l'acide quinique (à la hauteur de 0,6 g/L), présent dans le jus de pommes (Jarvis B. 2004), en acide dihydroshikimique pendant la fermentation alcoolique (Suarez Valles B. *et al.* 2005).

## **7.2. La composition volatile**

Suivant la nature des bactéries lactiques impliquées dans la fermentation malolactique la composition volatile peut être bien différente (Pozo-Bayon M.A. *et al.* 2005).

Le lactate d'éthyle est l'ester principalement formé par les bactéries lactiques du fait de l'accumulation d'acide lactique lors cette fermentation (Nedovic V.A. *et al.* 2000; Sumby K.M. *et al.* 2010). En fonction de l'abondance relative d'autres alcools, d'autres esters pourront apparaître comme le lactate de propyle et de butyle (Jarvis B. 2004). Le succinate de diéthyle (butanedioate de diéthyle) est,



de son côté, directement relié à la formation d'acide succinique qui peut apparaître pendant la fermentation alcoolique ou par l'action des bactéries lactiques sur des substrats tels que l'acide citrique ou l'acide malique. Comme présenté dans le Tableau 12, les quantités produites sont faibles et apportent ainsi une faible contribution au bouquet aromatique du produit.

Tableau 12 : teneurs en lactate d'éthyle et succinate de diéthyle (mg/L) dans un vin à distiller (Lilly M. *et al.* 2000) et dans un cidre (Xu Y. *et al.* 2006)

Références	Conditions de fermentation	[Lactate d'éthyle]	[Succinate de diéthyle]
Lilly M. <i>et al.</i> 2000	<i>S. cerevisiae</i> souche WE228	1,6	1,3
	Souche WE228 modifiée	1,5	1,3
	<i>S. cerevisiae</i> souche VIN 13	1,6	1,1
	Souche VIN13 modifiée	1,4	1,1
Xu Y. <i>et al.</i> 2006	<i>H. valbyensis</i> à 4.10 <sup>6</sup> CFU/mL	1,2	0,1
	<i>S. cerevisiae</i> à 4.10 <sup>6</sup> CFU/mL	2,2	0,4
	<i>H. valbyensis</i> à 1.10 <sup>2</sup> CFU/mL puis <i>S. cerevisiae</i> à 2.10 <sup>6</sup> CFU/mL	2,0	0,30
	<i>S. cerevisiae</i> uniquement	1,5	0,3
	<i>H. valbyensis</i> à 2.10 <sup>6</sup> CFU/mL puis <i>S. cerevisiae</i> (jour 3)	1,0	0,2
	<i>H. valbyensis</i> à 2.10 <sup>6</sup> CFU/mL puis <i>S. cerevisiae</i> (jour 9)	1,0	0,2
	<i>H. valbyensis</i> à 2.10 <sup>6</sup> CFU/mL puis <i>S. cerevisiae</i> (jour 15)	0,7	0,2

Les bactéries lactiques peuvent posséder une activité estérase susceptible d'hydrolyser les esters (Matthews A. *et al.* 2007). Matthews *et al.* ont démontré que plusieurs souches appartenant aux genres *Oenococcus*, *Lactobacillus* et *Pediococcus* possèdent une forte activité sur les esters à courtes chaînes (C2 à C8) mais qu'elle est plus limitée pour les esters à plus longue chaîne (C10 et C12). Néanmoins, mise à part *Oenococcus Oeni* possédant une activité estérase forte même pour des pH relativement faibles (pH=4 typiquement), ces souches ont montré des optima d'activité pour des conditions peu rencontrées dans les cidres à savoir pour des pH relativement élevés (pH=6) et pour des températures élevées de l'ordre de 30 à 40°C.

L'**acétaldéhyde**, majoritairement issu d'activité levurienne pendant la fermentation alcoolique peut être aussi métabolisé par les bactéries lactiques pour produire de l'éthanol et de l'acide acétique (Osborne J.P. *et al.* 2000). Ce dernier mécanisme est totalement indépendant de la fermentation des sucres. Quand la fermentation alcoolique et la fermentation malolactique sont concomitantes, l'acétaldéhyde formé par les levures est alors consommé par les bactéries lactiques.

Le **diacétyl** (butan-2,3-dione) peut être formé en grande proportion dans les cidres par les bactéries lactiques. Il peut lui conférer suivant sa concentration une odeur de « beurre, noisette » virant vers des notes de type « colle scotch » en cas de présence trop importante. Il trouve son origine dans la transformation de l'acide pyruvique issu de la métabolisation de l'acide citrique (voir partie précédente). L'acide pyruvique est transformé en acide  $\alpha$ -acétolactique ; ce dernier acide peut subir une décarboxylation qui entraîne la formation soit de diacétyl ou soit d'acétoïne.

L'acétoïne, qui peut être aussi directement issue de la réduction partielle du diacétyl, peut enfin être transformée en butan-2,3-diol.

Une synthèse des concentrations en acétoïne et acétaldéhyde reportées dans la littérature est réalisée en Tableau 13. On peut noter une grande variabilité des teneurs en ces composés en fonction de la matrice et des souches de fermentation utilisées. L'acidité est un autre facteur pouvant fortement influencer leur apparition ou disparition.

Tableau 13 : Concentrations en acétaldéhyde et acétoïne (mg/L) rencontrées dans la littérature pour le cidre à distiller (Rodriguez Madrera R. *et al.* 2010), le cidre naturel espagnol (Suarez Valles B. *et al.* 2007) et bouché (Suarez Valles B. *et al.* 2005) et sur jus de pomme et cidre français (Leguerinel I. *et al.* 1989)

Références	Informations matrice	[acétaldéhyde]	[acétoïne]
(Rodriguez Madrera R. <i>et al.</i> 2010)	FA et FML achevées	5,0	5,0
	ac. volatile = 1 g/L	0	3,5
	ac. volatile = 1,5 g/L	0,7	4,4
(Suarez Valles B. <i>et al.</i> 2007)	Année 2001	3,5	3,5
	Année 2002	2,5	2
(Leguerinel I. <i>et al.</i> 1989)	jus de pommes	16,5	
	cidre ; [fructose]= 17 g/L	14,0	
(Rodriguez Madrera R. <i>et al.</i> 2008)	cidre bouché		7,3
(Suarez Valles B. <i>et al.</i> 2005)	cidre bouché	40,5	18,2

De manière générale les **composés carbonylés** sont issus de la décarboxylation des acides  $\alpha$ -cétoniques (ou oxo-acides) et de l'oxydation des alcools. Leur seuil de perception olfactif est généralement bas et la plupart sont considérés comme apportant des notes aromatiques plutôt désagréables (Williams A.A. 1974; Herrero M. *et al.* 2006). Ainsi l'*E*-hex-2-éanal, le benzaldéhyde ou l'acroléine apportent des notes d'herbe coupée, d'amande et de piquant respectivement (Williams A.A. 1974; Ledauphin J. 2003; Valappil Z.A. *et al.* 2009).

De nombreuses bactéries lactiques et notamment *Oenococcus oeni* possèdent une activité glycosidase qui leur permet de dégrader des précurseurs glycosilés présents dans le fruit ou dans le bois des cuves, comme certains monoterpènes, norisoprénoïdes ou phénols volatils (Gagné S. *et al.* 2010).

Enfin les bactéries lactiques sont reconnues aussi pour leur activité estérase largement employée dans la production laitière, permettant l'hydrolyse des mono, di et triacylglycérol. Dans le cas du cidre, c'est la formation des **esters éthyliques**, responsables d'arômes floraux, qui est largement mise en avant comme celle de l'acétate d'éthyle, du lactate d'éthyle, de l'hexanoate d'éthyle et de l'octanoate d'éthyle (Sumbly K.M. *et al.* 2010). Les souches de bactéries lactiques n'ayant pas les mêmes capacités, il est clair ici, que la concentration de ces esters est dépendante des souches présentes.

## **8. Incidence de la chronologie des deux fermentations sur la composition du moût**

Plusieurs cas de figure sont envisageables lors de la production de cidre. Une fermentation alcoolique peut être non accompagnée d'une fermentation malolactique en cas de faible développement de bactéries lactiques lors de l'élaboration. Dans ce cas, une forte concentration résiduelle de quelques g/L en acide malique peut être observée et la quantité d'acide lactique peut, à l'inverse, être relativement faible (de l'ordre de quelques centaines de mg/L) (Laplace J-M. *et al.* 1998). La fermentation alcoolique pourra être suivie d'une fermentation malolactique ; ces deux transformations seront alors séquentielles. Les deux transformations pourront, à l'inverse, avoir lieu en même temps ; elles seront alors simultanées. Peu de travaux ont été menés sur l'impact de leur chronologie dans les cidres. Ils sont un peu plus nombreux dans le domaine vinicole mais restent relativement sujet à controverses en ce qui concerne l'impact organoleptique de la chronologie de ces transformations sur la qualité du produit final (Alexandre H. *et al.* 2005).

### **8.1. Fermentations séquentielles**

La transformation des sucres en éthanol lors de transformations séquentielles se fait généralement de manière plus efficace car elle est menée à

son terme sans que l'action des levures ne se trouve inhibée par une présence trop importante de bactéries lactiques. Cependant lors de la fermentation alcoolique, une partie de l'acide malique peut être préalablement consommée par les levures. Selon Herrero *et al.* (Herrero M. *et al.* 1999 b) les levures peuvent avoir déjà métabolisé l'équivalent de 0,65 g.L<sup>-1</sup> avant fermentation malolactique.

A la fin de la fermentation alcoolique le milieu devient pauvre en nutriments avec une forte proportion d'éthanol. Ces contraintes peuvent être à l'origine du développement de microorganismes non désirés et résistants à ce type de conditions au détriment de souches attendues pour réaliser la fermentation malolactique telles que *Oenococcus oeni*.

Si la fermentation malolactique a lieu après la fermentation alcoolique l'acide malique est converti en acide L-lactique mais généralement de façon partielle. Plusieurs faits peuvent expliquer que cette fermentation ne soit pas totale comme une transformation d'une partie de l'acide malique en acide succinique et/ou une oxydation de l'acide lactique en acide acétique qui tend d'ailleurs à augmenter en cours de FML (Herrero M. *et al.* 1999 a).

#### *Changement de la composition en acide organiques*

Les bactéries lactiques consommant l'acide quinique (quinone) produisent l'acide dihydroshikimique en même temps que l'acide lactique (lactate) soit oxydé en acide acétique (acétate) (Herrero M. *et al.* 1999 a). Cependant, l'acide acétique est supposé moins produit dans le cas de fermentations contrôlées (Suarez Valles B. *et al.* 2005) que pendant des fermentation spontanées.

#### *Modifications de la composition volatile*

La teneur finale en esters et en alcools supérieurs semble être relativement peu différente suivant la chronologie des fermentations (Herrero M. *et al.* 2006).

Quand la fermentation malolactique a lieu à la suite de la consommation des sucres, les saveurs produites semblent être plus intéressante (Jarvis B. 2004) de par la formation d'acide lactique. Par ailleurs, il se peut que la métabolisation de l'acide lactique puisse engendrer des défauts comme le diacétyl.

Pendant la maturation, période qui se situe après achèvement de la fermentation malolactique, l'autolyse des levures fermentatives peut provoquer la production d'arômes soufrés et diminuer ainsi la teneur en saveurs (Jarvis B. 2004). D'autres travaux rapportent qu'une chute de la teneur en éthanol peut être observée en même temps qu'une augmentation de la concentration en acétaldéhyde ou en esters (Herrero M. *et al.* 2006).

## **8.2. Fermentations simultanées**

### *Changements des paramètres de base*

Le fait d'observer ces deux transformations en simultané ne semble pas avoir d'influence sur la quantité d'acide malique dégradé (Herrero M. *et al.* 1999 b). Lorsqu'une inoculation de levures et de bactéries lactiques est réalisée au même moment on peut observer à la fois une consommation des sucres, une consommation d'acide malique et une apparition d'acide lactique. La quantité d'acide malique consommé peut ne pas correspondre quantitativement à la quantité d'acide lactique produite (Herrero M. *et al.* 1999 a). De plus, la concentration en acide lactique peut rapidement décroître en fin de transformations. Néanmoins, certains auteurs ont pu mettre en évidence que lors de transformations simultanées la fermentation malolactique pourrait être plus efficace que lors de transformations séquentielles. Dans ces conditions, la FML peut être réalisée dans un milieu où le pH est relativement bas, le taux d'alcool faible et la quantité de nutriments plus importante ; soit des conditions qui sont favorables au développement des bactéries lactiques. Cependant, une activité longue et importante des bactéries lactiques peut engendrer la formation de sous-produits indésirables mais aussi une limitation voire une interruption complète de la fermentation alcoolique avant consommation totale des sucres (Jussier D. *et al.* 2006).

Quand les levures fermentatives et les bactéries lactiques s'activent en même temps, la fermentation alcoolique peut être deux fois plus rapide que dans le cas de fermentations séquentielles (Herrero M. *et al.* 1999 b).

### *Changement de la composition en acide organiques*

Selon Cabranes *et al.* (Cabranes C. *et al.* 1996), lors de transformations simultanées dans le cidre, une acidification plus importante du produit est observée que lors de transformations séquentielles. Ce phénomène a été interprété comme étant possiblement imputable à une formation d'acide acétique due à une baisse du nombre de bactéries lactiques en fin de fermentation alcoolique.

Durant la maturation, l'acide acétique peut augmenter soit à cause de l'activité de bactéries lactiques hétérofermentaires, ou soit à cause de l'activité des levures apiculées (Dueñas M. *et al.* 1994). Ces mêmes levures, seraient aussi responsables de la diminution d'acide shikimique (Cabranes C. *et al.* 1996).

### *Modifications de la composition volatile*

Les différences les plus remarquables concernent les alcools supérieurs qui sont produits de manière plus importante dans le cas de fermentations simultanées. L'effet de la température s'ajoute à ce comportement : à 15 °C seront produits davantage de propanol, de isobutanol et de butanol alors qu'à température plus haute (22 °C) les isopentanol verront leur apparition favorisée (Herrero M. *et al.* 2006).

Enfin, il semblerait que quand la fermentation malolactique se déroule en même temps que la fermentation alcoolique selon les souches présentes, des saveurs complexes se développent accompagnées d'une chute du degré d'alcool (Jarvis B. 2004).

## **9. Dérives et excès des deux procédés fermentaires**

La fermentation alcoolique est une étape nécessaire pour l'obtention d'un produit alcoolisé. La fermentation malolactique pour sa part n'a pas lieu systématiquement mais elle est en général plutôt recherchée par les producteurs de cidre. Ces deux transformations peuvent néanmoins faire l'objet de dérives et rendre le produit impropre à la consommation. Dans ce chapitre, les différentes maladies du cidre seront répertoriées et discutées en fonction des métabolites obtenus. Ces dérives pourront être liées soit à l'activité des bactéries lactiques comme la piqûre lactique (paragraphe 9.1), la dégradation du glycérol (paragraphe 9.2) ou la maladie de la graisse (paragraphe 9.3) ; soit à d'autres bactéries comme la maladie du « framboisé » (paragraphe 9.4) ou la piqûre acétique (paragraphe 9.6) ; voire à des levures et/ou des bactéries lactiques comme dans le cas de l'apparition de phénols volatils (paragraphe 9.6).

### **9.1. La piqûre lactique**

La présence des bactéries lactiques est nécessaire dans les moûts fermentés en vue de réaliser la fermentation malolactique. Néanmoins, ces bactéries peuvent aussi utiliser les sucres pour produire l'acide lactique (Claisse O. *et al.* 2000) (principalement acide D-lactique) et induire une maladie appelée « Piqûre lactique ». L'apparition d'acide lactique issu des sucres (Garai-Ibabe G. *et al.* 2008) n'est pas en soit un problème pour la qualité organoleptique du produit final ; mais elle est généralement accompagnée d'une brusque augmentation de la quantité d'acide acétique (acidité volatile) qui peut rendre le produit final impropre à la consommation (Claisse O. *et al.* 2000).

Herrero *et al.* (Herrero M. *et al.* 1999 a) observent que la consommation d'acide lactique présent dans le milieu après FML, est accompagnée d'une augmentation régulière d'acide acétique. Cette hausse de la teneur en acide acétique est fonction de la température. La concentration initiale de 0,6 g/L à l'ensemencement peut augmenter jusqu'à 1 g/L (pour une température de 15°C) et jusqu'à 1,5 g/L (pour une température de 27°C).

Pour comparaison, les résultats de Suarez Valles *et al.* (Suarez Valles B. *et al.* 2007) montrent que sans piqûre lactique, les concentrations en acide acétique dans un cidre final dépassent rarement 0,3 g/L.

## 9.2. La dégradation du glycérol et la piqûre acroléique

Le glycérol est un composant majeur produit lors de la fermentation alcoolique (voir paragraphe 6.3). Sa présence dans les produits fermentés est plutôt intéressante du point de vue gustatif, mais il peut être facilement dégradé par les bactéries lactiques. Comme il a été présenté précédemment le glycérol peut être à l'origine de la formation d'acide pyruvique *via* la formation de dihydroxyacétone. Cette voie oxydative est la plus courante mais les bactéries lactiques dotées d'une glycérol déshydratase peuvent transformer le glycérol en 3-hydroxypropanal (3-HPA) par déshydratation. Le 3-hydroxypropanal peut être responsable de la formation de 1,3-propanediol au moyen d'une oxydoréductase (1,3-propanediol dehydrogenase) (Bauer R. *et al.* 2010) ou d'acide 3-hydroxypropanoïque par oxydation (Garai-Ibabe G. *et al.* 2008). Le 3-HPA peut aussi subir aussi une déshydratation spontanée pour conduire à la formation d'acroléine. Le 3-hydroxypropanal est relativement stable mais sa conversion en acroléine semble être accélérée lorsque la température augmente et lorsque le milieu est acide (Bauer R. *et al.* 2010). Dans les vins comme dans les cidres, les bactéries lactiques appartenant au genre *Lactobacillus* sont montrées du doigt comme étant responsables de la voie de deshydratation du glycérol en 3-HPA conduisant notamment à la formation d'acroléine (Claisse O. *et al.* 2000). *Lactobacillus collinoides* est l'espèce prédominante impliquée lors de cette transformation du glycérol dans les cidres (Sauvageot N. *et al.* 2000) même si des *Lactobacillus diolivorans* ont parfois pu y être impliquées (Garai-Ibabe G. *et al.* 2008). Il est à noter que l'acroléine est un produit toxique pouvant entraîner de graves désordres visuels ou pulmonaires chez l'homme pour de faibles doses d'exposition. Sa concentration est généralement assez faible dans les cidres de consommation et peut être estimée aux alentours de la dizaine de  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Ledauphin J. *et al.* 2006). En raison de sa forte volatilité il a tendance à disparaître rapidement du produit mais est susceptible d'être à l'origine de plusieurs marqueurs volatils de défaut dans les produits cidricoles tels le 3-éthoxypropanal, l'alcool allylique, le 1,1,3-triéthoxypropane ou encore le 3,3-diéthoxypropanol (Ledauphin J. *et al.* 2010).



### 9.3. La maladie de la graisse

Les bactéries lactiques peuvent être aussi à l'origine de la maladie de la graisse. Cette maladie rencontrée aussi pour les vins et la bière se caractérise par un aspect huileux et gras du cidre dû à la présence d'exopolysaccharides (EPS) (Larpin S. *et al.* 2002) mais qui ne semblent pas affecter les caractéristiques gustatives de ces boissons. Plusieurs de ces bactéries ont pu être retrouvées dans les cidres atteints de cette maladie et appartiennent aux genres *Oenococcus*, *Lactobacillus* et *Pediococcus* (Dueñas M. *et al.* 1995; Walling E. *et al.* 2005). Les sucres sont les substrats permettant aux bactéries lactiques de produire les EPS ; des réactions de polymérisation ont lieu au moyen de plusieurs enzymes comme des glycosyl transférases ou des glucane synthases par exemple (de Vuyst L. *et al.* 1999; Sanchez A. *et al.* 2010). Un pH inférieur à 3,7 semble être un facteur permettant une limitation de la prolifération des bactéries productrices d'EPS (Dueñas M. *et al.* 1995).

### 9.4. Le « framboisé »

Le « framboisé » (aussi appelé « cider-sickness » par les anglophones) est une maladie susceptible de rendre le produit non commercialisable par la présence d'un trouble accompagné d'une odeur de « peau de banane, citron pourri et de framboise » (Coton E. *et al.* 2003). Cette maladie du cidre est observée pour des cidres « doux » possédant un pH généralement supérieur à 3,7. L'acétaldéhyde, très volatil, est généré en forte proportion notamment après la mise en bouteille (concentration pouvant être comprise entre 150 et 1000 mg/L) ce qui peut conduire à l'explosion des bouteilles utilisées pour la production de cidre « bouché » à cause d'une augmentation significative de la pression interne. Une première hypothèse de formation d'acétaldéhyde en forte quantité a été proposée par Maugenet *et al.* dès 1962 (Maugenet J. 1962) consistant en une métabolisation d'acide D et L-lactique par une bactérie appartenant à l'espèce *Acetobacter rancens*. Néanmoins, cette origine n'a jamais pu être démontrée par la suite. Coton *et al.* (Coton E. *et al.* 2003) ont démontré la prévalence d'une bactérie appartenant à l'espèce *Zymomonas mobilis* dans plusieurs cidres français présentant des défauts de type « framboisé ». Ces mêmes auteurs ont par la suite isolé et caractérisé cette souche comme appartenant à une nouvelle sous-espèce baptisée *Zymomonas mobilis* subsp. *francensis* (Coton E. *et al.* 2006). Ils ont finalement confirmé que cette bactérie

trouvait un milieu favorable à la production d'acétaldéhyde pour des pH compris entre 3,7 et 4,1, pour de faibles concentrations en SO<sub>2</sub> (0 à 50 mg/L) et en présence d'une teneur en azote de l'ordre de 5 g/L (Coton M. *et al.* 2008).

### 9.5. La piqûre acétique

La piqûre acétique n'est pas à confondre avec la piqûre lactique. Ces deux dérives conduisent néanmoins toutes les deux à la formation d'un excès d'acide acétique qui confère au cidre un goût de vinaigre. Les bactéries acétiques appartenant aux genres *Acetobacter* et *Gluconoacetobacter* sont responsables de cette piqûre, elles fonctionnent, contrairement aux autres microorganismes vus précédemment, en milieu aérobie et donc à la surface du moût. Le développement des bactéries acétiques peut se faire à tout stade de l'élaboration : sur les fruits blessés, dans le moût en cas d'oxygénation, au cours de la maturation voire même à l'embouteillage (Bartowsky E.J. *et al.* 2008).

Les souches d'*Acetobacter* sont plus oxydatives que celles de *Gluconoacetobacter* ; dans un premier temps, l'éthanol est déshydrogéné en acétaldéhyde (alcool déshydrogénase) puis dans un second temps, ce dernier est oxydé en acide acétique (acétaldéhyde déshydrogénase) (Bartowsky E.J. *et al.* 2008).

L'activité des bactéries acétiques peut être révélée par une chute du degré alcoolique en même temps qu'une accumulation d'acide acétique, d'acétaldéhyde et d'acétate d'éthyle (Bartowsky E.J. *et al.* 2008).

### 9.6. Les phénols volatils

La présence de phénols volatils peut être un problème majeur pour les producteurs de vins, bières ou cidres. Ils confèrent au produit final des notes olfactives de type animales ou médicamenteuses et possèdent généralement des seuils de perception très faibles (de l'ordre du mg.L<sup>-1</sup>). Dans cette famille, les principaux responsables de ces défauts organoleptiques sont le 4-éthylphénol et le 4-éthylguaïacol. Il est cependant à noter que le 4-éthylcatéchol peut avoir une contribution non négligeable dans le cas des cidres (Buron N. *et al.* 2011) et qu'ils peuvent être accompagnés de 4-vinylphénol, 4-vinylguaïacol ou encore de 4-vinylcatéchol.

Dans le cas des vins, les levures appartenant au genre *Brettanomyces* sont considérées comme quasi-exclusivement responsables de l'apparition de ces phénols volatils. Les acides hydroxycinnamiques (acides *p*-coumarique, férulique et caféïque), résultant de la transformation des polyphénols, peuvent être convertis en vinylphénols sous l'impulsion d'une hydroxycinnamate décarboxylase. Les éthylphénols (4-éthylphénol, 4-éthylguaïacol et 4-éthylcatéchol) pourront apparaître à la suite par l'intermédiaire d'une vinylphénol réductase.

Des travaux récents ont consisté à réaliser un screening d'une soixantaine de souches propres aux cidres afin de vérifier leur capacité à dégrader les précurseurs des phénols volatils (acides hydroxycinnamiques) en milieu synthétique simulant les conditions d'un cidre. Cette étude a montré que des souches de levures (*Brettanomyces anomala*) et des souches de bactéries lactiques (*Lactobacillus collinoides*) pouvaient être responsables de l'apparition des phénols volatils au cours de l'élaboration des cidres (Buron N. *et al.* 2011).

## CONCLUSION

En résumé, le cidre est un produit issu de jus de pommes qui possède une composition variée et complexe en raison des modes de fabrication qui peuvent être très différents. En Europe, la production cidricole se partage majoritairement entre la France, l'Espagne et le Royaume-Uni et selon le pays, les protocoles d'élaboration sont différents sur plusieurs étapes et notamment en ce qui concerne le sulfitage, l'ajout de sucre, la macération de la pulpe et la mise en bouteille. En France, la distillation du cidre sec se pratique pour donner de l'eau-de-vie de pommes appelée Calvados et se déclinant sous trois Appellations d'Origine Contrôlée dont deux sont majoritaires « AOC Calvados Pays d'Auge » et « AOC Calvados ».

Le pur jus de pommes, qui est riche en sucres et en acide malique (cf. Tableau 25), va voir sa composition aromatique se modifier pour finir en cidre par l'intermédiaire de deux procédés fermentaires principaux : la fermentation alcoolique et la fermentation malolactique. La fermentation alcoolique est menée au moyen de levures fermentatives. Les principales sont les espèces appartenant au genre *Saccharomyces*. Cependant, les non-*Saccharomyces* ont tendance à amorcer la consommation des sucres alors que les *Saccharomyces* prennent rapidement le relais pour finir l'opération. Les *Saccharomyces* sont plus résistantes à l'éthanol et sont à l'origine de la formation d'une forte proportion d'alcool supérieurs ; une forte activité des non-*Saccharomyces* (*Hanseniaspora* notamment) en début de fermentation semble être nécessaire pour obtenir une concentration assez importante en esters dans le produit final. La durée et la vitesse de la fermentation alcoolique sont très influencées par la température et les teneurs initiales en sucres. La formation d'éthanol n'est pas l'unique conséquence de l'activité levurienne. Comme le montre la Figure 4, cette étape est aussi primordiale pour la production de composés volatils (alcools supérieurs, esters éthyliques et acétates d'alcools supérieurs notamment).

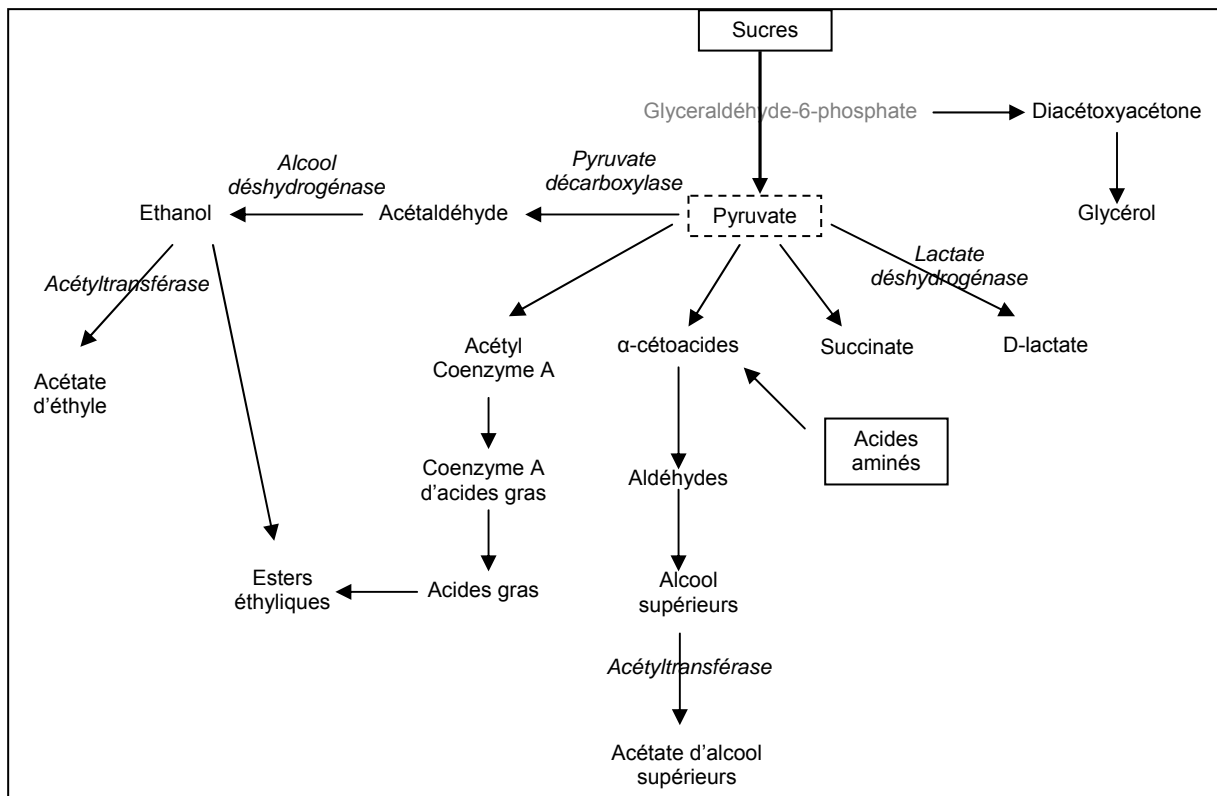


Figure 4 : Synthèse des principaux métabolismes liés à l'activité des levures dans les cidres

La deuxième fermentation, appelée couramment fermentation malolactique est d'origine bactérienne. L'acide malique consommé engendre une production d'acide lactique ce qui adoucit le produit. D'autres acides organiques initialement présents dans la pomme comme les acides citrique et fumarique seront aussi transformés *via* l'activité des bactéries (Figure 5). Les sucres résiduels pouvant être présents en cas d'arrêt prématuré de la fermentation alcoolique sont aussi métabolisables par les bactéries lactiques mais cette activité est plutôt perçue comme une dérive bactérienne. Il est à noter que différentes souches de bactéries lactiques présentent aussi une activité estérase qui peut être à l'origine d'une décroissance notable de la quantité d'esters. La fermentation malolactique est généralement recherchée mais contrairement aux vins elle n'a pas lieu dans tous les cas.

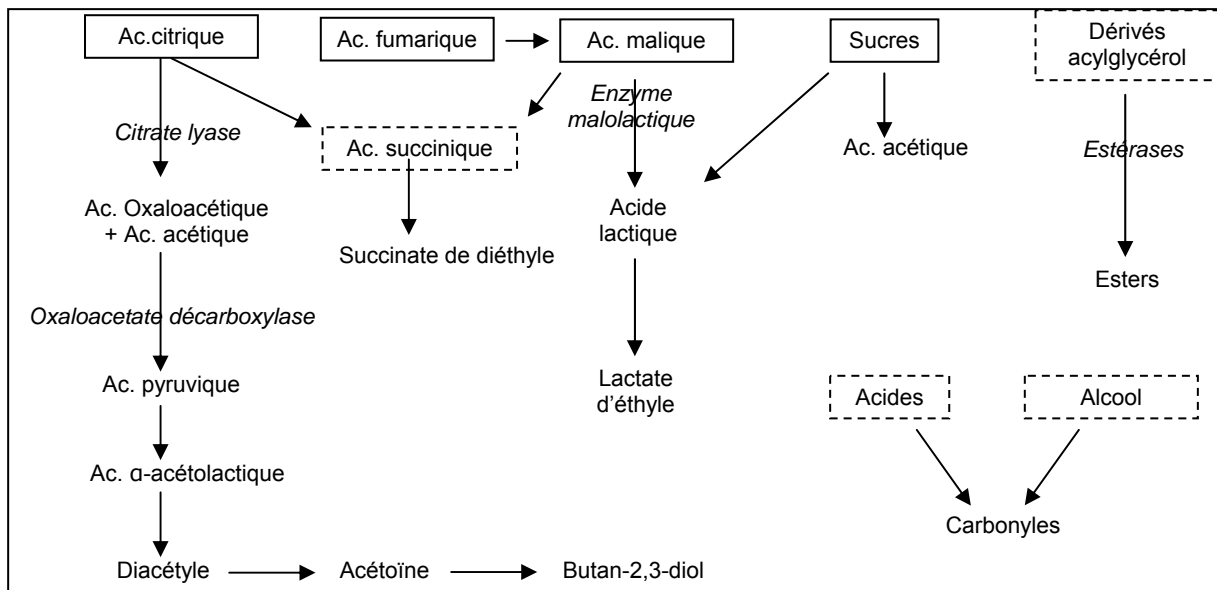


Figure 5 : synthèse des métabolismes durant la fermentation malolactique dans les cidres

Par voie de conséquence les cidres peuvent subir:

- une fermentation alcoolique seule,
- une fermentation alcoolique et malolactique qui ont lieu de façon simultanée,
- ou bien, une fermentation malolactique succédant à la fermentation alcoolique.

Une des principales problématiques pour les cidres est que la fermentation malolactique tout en diminuant l'acidité du cidre peut engendrer une fragilisation du milieu en cours d'élaboration par augmentation du pH. Ceci est d'autant plus vrai dans le cas de fermentations simultanées où de fortes apparitions d'acide acétique peuvent être enregistrées.

De multiples paramètres peuvent influencer les vitesses et la faisabilité des deux fermentations. Citons d'abord les facteurs matériels, parmi lesquelles la qualité et la variété des pommes brassées (y compris l'état sanitaire et la maturité), les températures auxquelles est soumis le moût (qui peuvent varier d'une année à l'autre et d'un pays à l'autre) et le matériel utilisé pour les cuves (bois, inox, résine alimentaire). D'autres facteurs tels que le mode de presse des fruits (lente/rapide, avec ou sans oxygénation), la macération (coutumière en Espagne), le sulfitage et la clarification (enzymatique ou naturelle) sont aussi important car ils agissent sur le patrimoine microbien et donc sur l'activité des

levures et des bactéries. Cependant, le non-contrôle d'un seul de ces paramètres peut être favorable à un développement levurien et/ou bactérien trop abondant pouvant entraîner des dérives telles que la piqûre acroléique, la piqûre acétique, la piqûre lactique, la maladie du framboisé, la maladie de la graisse et la production de phénols volatils.

## Chapitre second

### **CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES**



## 10. Producteurs et sites sélectionnés

### 10.1. Caractéristiques des sites de production

Sur proposition de l'IDAC (Interprofession Des Appellations Cidricoles, située à Caen), trois producteurs (le Manoir de Grandouet, la Ferme de Billy et la Distillerie Busnel) se sont portés volontaires pour cette étude consistant à suivre la composition physico-chimique des cidres à distiller. Deux des trois AOC normandes concernant les Calvados sont représentées à travers des localisations géographiques variées afin de rendre les échantillons les plus représentatifs possibles (Figure 6). L'AOC « Calvados Domfrontais », ne représentant qu'environ 1% du volume des ventes de Calvados, n'a pas été sélectionnée pour ces travaux. Outre les différences d'AOC et de lieu de fabrication, le choix des producteurs a été réalisé suivant des caractéristiques liées notamment aux dimensions des cuves utilisées. Les pratiques de chacun de ces cidriers sont détaillées dans le Tableau 14.



Figure 6 : Localisation des productions de Calvados retenues pour l'étude

Tableau 14 : Caractéristiques et pratiques des 4 productions de cidre à distiller retenues pour l'étude

Producteurs	Manoir de Grandouet	Ferme de Billy	Distillerie Busnel	Distillerie Busnel
Localisation producteur	Cambremer (14)	Rots (14)	Cormeilles (27)	
AOC visée	Pays d'Auge	Calvados	Pays d'Auge	Calvados
Type d'exploitation	Fermière	Artisanale	Industrielle	
Vente annuelle d'EDV (10 <sup>3</sup> bouteilles)	2,3	2,0	1300	
Surface plantée en pommiers basses tiges	8 ha	0 ha	110 ha	270 ha
Surface plantée en pommiers hautes tiges	15 ha	15 ha	160 ha	100 ha
Proportion de cidre à distiller dans la production de cidre	Moitié	Tiers	Totalité	Totalité
Macération avant pressurage	Oui (6 heures)	Non	Non	Non
Type de pressoir	A membrane	Continu à bandes	Hydraulique	Hydraulique
Matériau et contenance des cuves avant soutirage	Pas de soutirage	Résine alimentaire (80 hL)	Pas de soutirage	Pas de soutirage
Clarification	Chapeau Brun	Débouillage statique	Non	Non
Localisation cuve	Chai	Extérieur, ombre	Extérieur, fort ensoleillement	
Matériau des cuves de fermentation	Bois (80 hL)	Inox (80 hL)	Inox (2500 hL)	Inox (2500 hL)
Temps de maturation du cidre	< 10 mois	8 à 12 mois	6 semaines	4 semaines
Type d'alambic utilisé	Charentais	Colonne	Charentais	Colonne

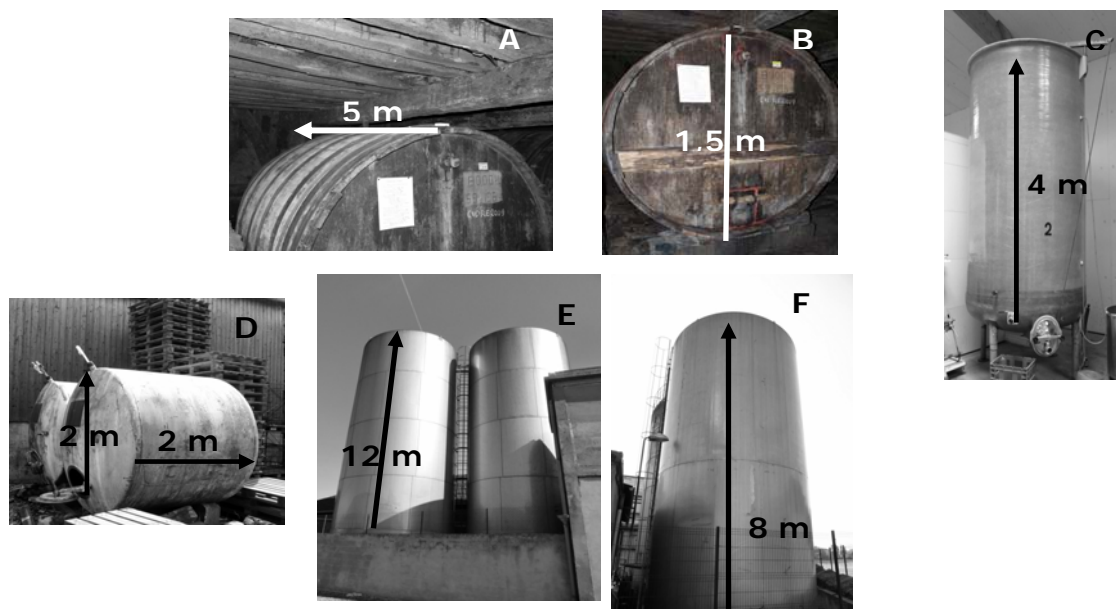


Figure 7 : Cuves utilisées lors de l'étude

Dont la cuve du Manoir de Grandouet utilisées pour les deux campagnes de récolte, vue en longueur (A) et de face (B), les cuves de la Ferme de Billy en résine alimentaire (C) et en inox (D) et les cuves de la Distillerie Busnel en inox "pays d'Auge" et "Calvados" de la première campagne (E), cuve "Pays d'Auge" de la seconde année (F)

## **10.2. Echantillonnage, prélèvements des moûts**

Afin de vérifier l'évolution de la composition physico-chimique dans les moûts, des prélèvements réguliers ont été effectués chez chacun des producteurs. Deux à trois échantillons ont été récoltés par semaine pendant la période de fermentation et 1 à 2 échantillons par mois pendant la période de maturation. Le cidre est prélevé des cuves en acier ou inox par le dégustateur (robinet sur la cuve situé à hauteur d'homme) et de la cuve en bois par un siphon. L'échantillon de cidre est directement conservé dans un flacon Nalgène® de 1 litre au congélateur à -18°C. Pour cette étude réalisée sur deux campagnes (2007-2008 et 2008-2009) plus d'une centaine d'échantillons de moûts de cidre ont été prélevés. Les dates qui correspondent à ces prélèvements sont indiquées dans le Tableau 15. Lors de la première décongélation, les cidres sont aliquotés pour ne prendre que la quantité nécessaire pour chaque analyse. Ainsi le cidre ne subit pas de cycle de décongélation/congélation le préservant ainsi de sa dégradation.

Tableau 15 : Dates de prélèvements des deux campagnes pour les 4 cuves fermière (fermier), industrielle AOC Pays d'Auge (Industriel PA) et AOC Calvados (Industriel Calvados) et artisanale (artisan)

	Année 1 : 2007/2008		Année 2 : 2008/2009	
Fermier Manoir de Grandouet Cambremer (14)	17/10/07	30/11/07	20/10/08	09/12/08
	24/10/07	06/12/07	21/10/08	23/12/08
	30/10/07	15/12/07	28/10/08	30/12/08
	07/11/07	31/12/07	04/11/08	06/01/09
	10/11/07	05/02/08	12/11/08	13/01/09
	16/11/07	24/04/08	18/11/08	19/03/09
	27/11/07	24/05/08	26/11/08	08/04/09
			02/12/08	03/06/09
Industriel PA Distillerie Busnel Cormeilles (27)	25/10/07	29/11/07	05/11/08	26/11/08
	29/10/07	11/01/08	06/11/08	08/12/08
	31/10/07	30/01/08	07/11/08	05/01/09
	02/11/07	13/03/08	10/11/08	23/01/09
	06/11/07	31/03/08	12/11/08	10/02/09
	14/11/07	15/04/08	19/11/08	
Industriel Calvados Distillerie Busnel Cormeilles (27)	23/10/07	14/11/07	03/11/08	19/11/08
	25/10/07	29/11/07	04/11/08	26/11/08
	29/10/07	19/12/07	06/11/08	08/12/08
	31/10/07	11/01/08	07/11/08	05/01/09
	02/11/07	31/01/08	10/11/08	10/02/09
	06/11/07	07/02/08	12/11/08	
Artisan Ferme de Billy Rots (14)			14/10/08	20/11/08
			16/10/08	24/11/08
			18/11/08	26/11/08
			20/10/08	28/11/08
			22/10/08	02/12/08
	03/11/07		24/10/08	05/12/08
	09/11/07		27/10/08	09/12/08
	16/11/07		29/10/08	12/12/08
	02/12/07		31/10/08	16/12/08
	06/12/07		03/11/08	07/01/09
	16/01/08		05/11/08	14/01/09
	04/03/08		07/11/08	21/01/09
			10/11/08	11/02/09
			12/11/08	11/03/09
			14/11/08	15/04/09
			17/11/08	13/05/09
				23/06/09

### **10.3. Analyse des échantillons prélevés**

Les analyses sont réalisées dans un délai maximal de 10 mois suivant la congélation. Un suivi des acides organiques (oxalique, tartrique, pyruvique, malique, lactique, acétique, citrique, succinique et propionique) après préparation de l'échantillon est réalisé par Chromatographie Liquide à Hautes Performances (CLHP). Cette étude est complétée par un suivi de la composition volatile par Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à un Spectromètre de Masse après Extraction sur Phase Solide (SPE).

Les températures extérieures ambiantes pour chaque site de production sont prises en compte par l'intermédiaire des relevés de Météofrance (stations les plus proches des lieux de prélèvements). Elles ne seront données qu'à titre indicatif. Une mesure de la température intérieure des cuves aurait été plus intéressante, mais il n'a pas été possible de la relever correctement en raison des variations thermiques importantes internes aux cuves.

Neuf acides organiques ont été sélectionnés pour être quantifiés dans les échantillons de cidre à distiller en cours de fabrication : l'acide oxalique, l'acide tartrique, l'acide pyruvique, l'acide malique, l'acide lactique, l'acide acétique, l'acide citrique, l'acide succinique et l'acide propanoïque. Ces composés ont été séparés par CLHP de partage en phase inverse sur colonne de silice greffée octadécyle (C18) avec élution isocratique et détection par spectroscopie UV. La quantification a été effectuée par étalonnage interne en utilisant, pour chaque échantillon, la méthode des ajouts dosés. Seuls les résultats correspondant aux acides malique et lactique seront présentés dans ce manuscrit.

## **11. Traitement des échantillons**

La forte variabilité des surfaces de pics qui a été observée sur l'analyse répétée d'un même prélèvement nous a conduit à stabiliser les échantillons par une défécation au sulfate de zinc et à l'hexacyanoferrate de potassium en nous inspirant d'une méthode de dosage des sucres réducteurs décrite dans le recueil des méthodes internationales d'analyses de l'OIV (Organisation Internationale de la Vigne et du vin) (OIV 2006).

Dans des tubes à centrifuger de 40 mL en polypropylène, après décongélation totale des échantillons à température ambiante, 10 mL de cidre sont dilués avec 8 mL d'éluant (composition décrite dans la partie suivante). Du sulfate de zinc heptahydraté (1 mL à 300 g/L) et de l'hexacyanoferrate de potassium trihydraté (1 mL à 150 g/L) sont ensuite ajoutés. Un précipité épais blanc laiteux apparaît et persiste même après agitation au vortex.

Un repos de 15 minutes est nécessaire avant une centrifugation à 8000 rpm pendant un quart d'heure. Le surnageant transparent et de coloration plus claire que le cidre initial est prélevé. Il est utilisé par la suite afin de confectionner une gamme d'ajouts dosés avant analyse par chromatographie liquide.

## **12. Préparation de l'éluant et des étalons**

### **12.1. Eluant**

L'éluant est constitué d'un tampon acide orthophosphorique / dihydrogénophosphate de pH=2,7. L'éluant est préparé en dissolvant 28 g de

dihydrogénophosphate de sodium ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4, \text{H}_2\text{O}$ ) dans 1L d'eau ultra-pure pour obtenir une concentration de 0,1M de la base. De l'acide orthophosphorique à 85% (environ 3,8 mL) est ajouté goutte à goutte jusqu'à atteindre un pH de 2,70 contrôlé au pH-mètre. Cette solution tampon est fraîchement préparée à chaque début de journée puis ultrafiltrée et dégazée par filtration sous pression partielle (trompe à eau) à l'aide d'une membrane en nitrate de cellulose d'une porosité de 0,45  $\mu\text{m}$ .

### **12.2. Etalons mères et ajouts dosés**

Une solution d'étalon interne d'acide glutarique est préparée en dissolvant 760 mg d'anhydride glutarique dans 10 mL d'acide chlorhydrique à 1%.

Tous les mois, une solution mère contenant les 9 acides est préparée en pesant au mg près, puis en mélangeant, les acides oxalique (33 mg), tartrique (250 mg), pyruvique (150 mg), malique (1000 mg), lactique (1300 mg), acétique (250 mg), citrique (200 mg), succinique (250 mg) et propanoïque (1400 mg) dans 100 mL d'éluant.

Afin d'éliminer l'effet de matrice, toutes les quantifications ont été menées par étalonnage au moyen d'ajouts dosés sur 4 niveaux de concentration adaptés à la concentration de chaque acide dans l'échantillon analysé. Les ajouts étalons sont préparés comme suit : à 4 mL d'un échantillon de cidre déféqué (voir partie précédente) sont ajoutés, dans un pilulier en verre de 5 mL, 40  $\mu\text{L}$  de solution d'étalon interne et des micro-volumes de la solution mère d'acides (40  $\mu\text{L}$ , 80  $\mu\text{L}$ , 120  $\mu\text{L}$  et 160  $\mu\text{L}$ ). Ces solutions sont stockées pour un maximum d'une dizaine de jours au réfrigérateur à 4°C avant analyse.

### **13. Appareillage et méthode de dosage**

Les analyses ont été effectuées sur une chaîne de Chromatographe Liquide à Hautes Performances (CLHP) composée d'une pompe ternaire Varian Pro Star modèle 230, d'une vanne d'injection manuelle de type Rhéodyne et d'un détecteur UV/visible Varian Pro Star modèle 310.

La séparation est réalisée dans les conditions suivantes : boucle d'injection de 20 $\mu\text{L}$  ; colonne en phase inversée (C18, greffons octadécyle) type Waters<sup>TM</sup> ODS-2 (longueur 250 mm, diamètre interne 3,4 mm, particules sphériques de 5 $\mu\text{m}$  de diamètre) utilisée la première année (analyses de la campagne 2007-2008) ou

type LUNA- Phenomenex™ (longueur 250 mm, diam. int. 3,4 mm, diam. particules 5µm) utilisée la seconde année (campagne 2008-2009) ; la colonne est thermostatée à température ambiante par une jaquette Croco-Cil et l'élution est isocratique mais le débit de phase mobile, fixé à 0,5 mL.min<sup>-1</sup> pendant les 14 premières minutes, est ensuite augmenté à 1 mL.min<sup>-1</sup> pour les 16 dernières minutes d'analyse conduisant ainsi à des éluions d'une durée totale de 30 minutes.

La détection est menée par spectrophotométrie UV à une longueur de 210 nm correspondant à un maximum d'absorption des acides étudiés.

#### **14. Traitement des données chromatographiques**

Le traitement des données chromatographiques a été réalisé au moyen du logiciel Varian Star Chromatography Workstation version 5.53. Une aire relative est calculée pour chaque pic d'acide recherché en divisant la surface du pic du composé par celle obtenue pour l'acide glutarique (étalon interne). L'aire relative est ensuite répertoriée graphiquement en fonction du rapport des concentrations pour chaque acide :

$$\text{aire relative} = f \left( \frac{\text{concentration du composé}}{\text{concentration de l'anhydride glutarique (étalon interne)}} \right).$$

Pour la détermination des concentrations, le tracé de la droite d'étalonnage sur quatre points en ajouts dosés permet, pour chaque échantillon, de déterminer les concentrations initiales de chacun des 9 acides analysés.

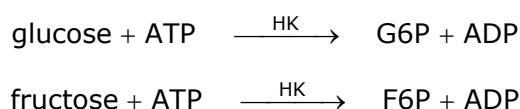


Les interprofessions vinicoles et cidricoles emploient généralement le terme « paramètres de base » pour caractériser les données physico-chimiques du moût évoluant fortement au cours de la fermentation. Dans le contexte de cette étude, les taux d'éthanol, de glucose et de fructose, les acidités (volatiles et totales) et le pH ont été déterminés pour chaque prélèvement réalisé. Il est à noter que seul le protocole utilisé pour le dosage du glucose et du fructose sera présenté ici. Les autres protocoles sont reportés en annexe 2 et 3 car les données découlant de ces analyses se sont avérées peu reproductibles d'un échantillon à l'autre et ne seront par conséquent pas utilisées pour discuter les résultats obtenus.

### 15. Principe du dosage

Les sucres sont dosés par réaction enzymatique suivie d'une mesure d'absorbance déterminée à 340 nm au moyen d'un spectrophotomètre UV/visible Pharmacia Biotech Novaspec II.

Dans un premier temps l'ajout d'adénosine triphosphate (ATP) au cidre, permet la phosphorylation des deux sucres. Cette réaction est catalysée par l'hexokinase (Bartowsky E.J. *et al.*) et donne le glucose-6-phosphate (G6P) pour le glucose et le fructose-6-phosphate (F6P) pour le fructose :



Dans un second temps, la Nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate (NADP) oxyde spécifiquement le G6P en gluconate-6-phosphate en présence de l'enzyme glucose-6-phosphate-déshydrogénase (G6PDH). Il y a stoechiométriquement autant de NADPH formé que de G6P consommé et donc que de glucose initialement présent dans l'échantillon :



Le NADPH qui absorbe fortement la lumière dans l'UV proche à 340 nm peut ainsi être dosé par spectrophotométrie classique (lampe UV/visible et cuves en plastique).

La détermination du fructose suit le même schéma à une étape près. Le fructose-6-phosphate doit d'abord être transformé sous l'action de la phosphoglucose-isomérase (PGI) en glucose-6-phosphate (G6P) qui est oxydé par le NADP dans les mêmes conditions que précédemment. Le NADPH formé est de nouveau dosé à 340 nm.

Les kits sont achetés chez Biosentec® (Toulouse, France) et permettent de réaliser 30 essais/kit. Chaque échantillon est analysé en double selon un protocole défini (Cat. No. 012). En cas de valeur située hors du domaine de linéarité défini pour le test, l'échantillon est dilué avant une nouvelle analyse. Avant le début d'une série d'analyses, chaque kit est testé au moyen de l'étalon glucose/fructose fourni par le fabricant ( $C_{\text{glucose}} = 0,195 \pm 0,01 \text{ g.L}^{-1}$  et  $C_{\text{fructose}} = 0,185 \text{ g.L}^{-1} \pm 0,01 \text{ g.L}^{-1}$ ).

## **16. Extraction des composés volatils**

Chaque prélèvement de cuve de cidre à distiller est décongelé à température ambiante. Une fois la décongélation totalement achevée un échantillon de 50 mL est pipeté puis additionné de 200  $\mu$ L d'une solution d'étalon interne de 4-méthylpentan-2-ol (à 0,200 g.L<sup>-1</sup>) fraîchement préparée dans l'éthanol pur. La solution est acidifiée à pH=3,00 avec de l'acide chlorhydrique 1M.

Une extraction sur phase solide, est réalisée sur une cartouche Chemelut VARIAN™ CE 2050 remplie de terre de diatomées (pouvant accepter un volume de solution de 50 mL) en déposant 40 mL du cidre acidifié et mélangé à l'étalon interne. Après pénétration totale de cette solution, l'élution est réalisée avec deux fois 90 mL de dichlorométhane.

L'extrait organique obtenu est récupéré pour être séché sur sulfate de magnésium anhydre puis filtré avant d'être concentré dans un système de type Kuderna-Danish. Cette évaporation est menée à faible température (55°C) et permet une concentration de l'échantillon d'un facteur supérieur à 40 jusqu'à un volume de 1 mL. L'extrait est conservé au congélateur à -18°C avant analyse par CPG/SM.

## **17. Analyse des composés volatils**

L'appareil utilisé pour identifier et quantifier les molécules volatiles des extraits de cidres est un CPG/SM de marque Varian. Cet équipement comporte un Chromatographe en Phase Gazeuse de type Varian 3800GC couplé à un Spectromètre de Masse Varian Saturn 2000R. Ce dernier est muni d'un analyseur à trappe ionique qui permet de réaliser l'ionisation des molécules aussi bien en mode impact électronique (EI), qu'en mode ionisation chimique (CI) et d'analyser les spectres de masse par courant ionique total, sélection particulière d'un ion (SIS) ou spectrométrie de masse en tandem (MS<sup>n</sup>).

Un microlitre de chaque extrait est injecté dans l'injecteur à diviseur du chromatographe porté à 210°C. Le rapport de division utilisé est de l'ordre de 1/100<sup>ème</sup>. Ce rapport est ajusté systématiquement après une première analyse afin que l'aire de l'étalon interne ne varie pas de plus de 10% d'un extrait à l'autre. Le gaz vecteur (Hélium 5.5) entraîne l'extrait vaporisé à raison de 1

mL.min<sup>-1</sup> dans la colonne capillaire d'une longueur de 50 mètres et d'un diamètre interne de 0,25 mm munie d'un film de 0,25 µm d'épaisseur de phase stationnaire BP-20 (de type Carbowax 20M : 100% polyéthylène glycol provenant de chez SGE). La température du four est fixée initialement à 32°C pendant 10 min. Elle est ensuite programmée jusqu'à une température de 240°C à raison de 5°C/min. La température finale est maintenue pendant 20 min pour un temps total d'analyse d'environ 70 min. Les analytes séparés traversent une ligne de transfert chauffée à 270°C avant de parvenir au spectromètre de masse. Le filament du spectromètre de masse émet des électrons possédant une énergie de 70 eV. Ces électrons arrivent au centre de la trappe ionique où l'ionisation des composés est réalisée en mode impact électronique (EI) à 150°C sous vide au moyen d'une pompe turbomoléculaire. La quantité d'ions est fixée à 20 000 dans l'analyseur de masse pour l'obtention des spectres après un pré-balayage. Un balayage fin des rapports m/z compris entre 40 et 400 est effectué toutes les secondes. Les ions formés sont détectés au moyen d'un multiplicateur d'électrons dont la tension est fixée à 1350 V.

Afin de confirmer l'identité des composés volatils, des détections en mode Ionisation Chimique (CI) ont été systématiquement réalisées en double après séparation obtenue dans les mêmes conditions chromatographiques. L'acétonitrile a été utilisé comme liquide réactant, la quantité d'ions traitée par la trappe ionique pour établir les spectres de masse a été fixée à 5000 et les balayages des rapports m/z effectués entre 65 et 400. Les autres conditions spectrométriques ont été conservées.

Les données analytiques ont été acquises et traitées au moyen du logiciel Varian Saturn WS version 5.3.

### **17.1. Outils utilisés pour l'identification et la quantification des composés volatils en CPG/SM**

#### *Comparaison de spectres de masse connus en mode impact électronique*

La première étape menant à l'identification de chaque composé volatil a été de comparer le spectre de masse obtenu à ceux présents dans les deux banques de données dont nous disposons :

- NIST98<sup>TM</sup> enrichie en 2001 (version 1.7a), très exhaustive contenant plusieurs milliers de composés d'origines diverses et variées,
- EDV, spécifique au laboratoire, contenant environ 400 spectres de masse de composés volatils archivés issus de travaux propres menés depuis une douzaine d'années, notamment dans des eaux-de-vie de Calvados, Mirabelle, Cognac et Armagnac, ainsi qu'environ 200 spectres de composés volatils standard, purs ou synthétisés au laboratoire. Ces spectres de masse ont été enregistrés à partir d'injections réalisées sur le même appareil.

Plusieurs possibilités d'identification accompagnées chacune d'un pourcentage de similitude sont proposées. Un choix des propositions les plus pertinentes pour chaque pic est réalisé.

#### *Calcul et utilisation des indices de rétention*

Afin de confirmer ou d'infirmer la présence de composés volatils identifiés par SM, un indice de rétention a été calculé pour chaque pic observé sur les chromatogrammes par rapport à une série d'alcane aliphatiques linéaires. Ce mélange a été injecté en mode externe à intervalles de temps réguliers afin de pallier aux possibles dérives des temps de rétention notamment dus à l'usure de la phase stationnaire.

Les indices de rétention (Ir) ont été déterminés selon Van den Dool et Kratz (Van Del Dool H. *et al.* 1963) au moyen de la relation suivante :

$$Ir = 100 \times \left( n + \frac{Tr - Tr_{(n)}}{Tr_{(n+1)} - Tr_{(n)}} \right)$$

Avec n : nombre de carbones de l'alcane,

Tr<sub>(n)</sub> : temps de rétention de l'alcane à n carbones,

Tr<sub>(n+1)</sub> : temps de rétention de l'alcane à n+1 carbones,

Ir et Tr : indice et temps de rétention d'un composé à analyser dont le temps de rétention (pic) est compris entre les pics de deux alcanes successifs à n et n+1 carbones.

Le mélange d'alcane linéaires aliphatiques contient des hydrocarbures de 8 à 32 carbones dilués dans l'heptane. Il est commercial et provient de chez Sigma (Saint-Louis, USA).

Les indices de rétention calculés ont été comparés à ceux reportés sur le même type de phase stationnaire (polaire) dans la littérature concernant l'identification de composés volatils de fruits et de boissons fermentées ou distillées (vins et eaux-de-vie principalement).

#### *Vérification de la masse molaire des composés grâce au mode Ionisation*

##### *Chimique*

Les analyses réalisées en mode impact électronique et ionisation chimique ont été comparées. Pour chaque spectre obtenu en impact électronique, le spectre de masse obtenu en ionisation chimique a été étudié. Le pic de base obtenu grâce à ce mode est généralement le pic moléculaire + 1 (MH<sup>+</sup>) pour les esters et le pic moléculaire - 17 (MH<sup>+</sup> -18) pour les alcools.

#### *Confirmation de l'identité des composés*

Une confirmation de l'identité des composés a été réalisée 1) en étudiant le spectre de masse des composés en mode impact électronique 2) en vérifiant l'indice de rétention en alcanes linéaires par rapport aux données existantes dans la littérature (Indice à +/- 10) 3) en vérifiant la cohérence du spectre en ionisation chimique par rapport à la structure chimique du composé 4) en

injectant un standard pur dilué ou synthétisé selon Ledauphin *et al.* (Ledauphin J. *et al.* 2010). Les composés pour lesquels un standard n'a pu être injecté ont été considérés seulement comme possiblement présents. Les composés identifiés dans la plupart des échantillons de cidre sont présentés en Tableau 16. Plus d'une vingtaine d'autres composés tels que les Z-hex-2-énol, le catéchol ou encore le 4-vinylphénol ont été identifiés au cours des analyses mais ont été détectés dans trop peu d'échantillons pour que leur évolution dans les cidres à distiller soient correctement définie. Les résultats concernant ces composés qui ne sont pas majeurs au niveau de leur concentration n'ont pas été présentés ici.

Tableau 16 : Composés identifiés dans les échantillons de cidres par CPG/SM  
Avec en gras les composé dont l'identité a pu être vérifiée grâce à l'injection d'un standard dilué pur ou synthétisé, \* pour les pics correspondants à des adduits avec l'acétonitrile et x pour les composés injectés purs ou synthétisés.

IR <sup>d</sup>	IRref <sup>e</sup>	Tr (min)	Composé	EI <sup>a</sup>	CI <sup>b</sup>	MM <sup>c</sup>	standard <sup>f</sup>
997	/	13,698	hexan-3-ol	59(100),55(78),73(72)	71(100)	102	
1041	1050	15,262	<b>propanol</b>	42(100),59(83)	84(100)*,67(15)*	60	x
1091	1099	17,636	<b>2-méthylpropanol</b>	41(100),43(60),56(16)	83(100)*,98(63)*	74	x
1122	1127	18,963	<b>acétate de 3-méthylbutyle</b>	43(100),55(57),70(51)	71(100),131(20)	M+1	x
1144	1151	19,818	<b>butanol</b>	41(100),56(84),43(31)	98(100)*, 83(75)*	74	x
1168	/	20,865	pent-3-èn-2-ol	71(100),43(83),41(49)	/	86	
1204	1214	22,17	<b>2- et 3-méthylbutanol</b>	55(100),41(69),70(49)	71(100)	M+1-18	x
1233	1239	23,132	<b>hexanoate d'éthyle</b>	88(100),43(70),99(57)	145(100)	M+1	x
1248	1255	23,627	<b>pentanol</b>	55(100),41(92),70(44)	71(100)	M+1-18	x
1272	1278	24,43	<b>acétate d'hexyle</b>	43(100),56(61),69(37)	82(100),145(18)	M+1	x
1286	1292	24,894	<b>acétoïne</b>	45(100),43(66)	89(100)	M+1	x
1344	1351	26,66	<b>2-hydroxypropanoate d'éthyle</b>	45(100),43(13),75(6)	119(100)	M+1	x
1351	1357	26,851	<b>hexanol</b>	56(100),41(83),69(55)	85(100)	M+1-18	x
1365	/	27,258	diacétone <sup>g</sup>	43(100),59(39),101(12)	99(100)	M+1-18	116
1378	1368	27,361	(E)-hex-3-en-1-ol	67,41,82	83(100)	M+1-18	100
1424	1429	28,96	terpène	69(100),43(56),111(45)	173(100)	M+1	172
1435	1440	29,253	<b>octanoate d'éthyle</b>	88(100),55(63),101(55)	173(100)	M+1	172 x
1464	1475	29,87	<b>acide acétique</b>	43(100),45(98),60(42)	84(100)*	60	x
1487	1493	30,665	2-éthylhexanol	57(100),41(68),55(52)	/	130	
1520	1527	31,537	<b>3-hydroxybutanoate d'éthyle</b>	43(100),45(48),117(44)	133(100),115(29)	M+1	x
1535	/	31,876	2-méthylthioéthanol	61(100),45(76),92(60)	75(100),93(37)	M+1	92
1546	/	32,184	<b>acide propanoïque</b>	45(100),73(86),55(55)	/	74	x
1555	1561	32,407	<b>octanol</b>	55(100),41(95),56(84)	/	130	x
1573	1590	32,876	<b>acide 2-méthylpropanoïque</b>	41(100),43(91),73(91)	71(100)	M+1-18	88 x
1634	1651	34,37	<b>acide butanoïque</b>	60(100),42(55),73(42)	71(100)	M+1-18	88 x
1639	1644	34,476	<b>décanoate d'éthyle</b>	88(100),157(60),55(52)	201(100)	M+1	200 x
1675	1691	35,346	<b>acide 2-méthylbutanoïque</b>	74(100),41(73),45(57)	85(100)	M+1-18	102 x
1678	1684	35,403	<b>succinate de diéthyle</b>	101(100),129(64),55(28)	129(100),175(36)	M+1	174 x
1721	/	36,401	<b>méthionol</b>	106(100),45(52),57(50)	107(100),89(81)	M+1	106 x
1760	1765	37,284	<b>décanol</b>	55(100),69(84),41(75)	/	158	x
1824	1830	38,726	<b>acétate de 2-phényléthyle</b>	104(100),43(41),91(22)	105(100)	164	x
1844	1849	39,146	<b>dodécanoate d'éthyle</b>	88(100),101(63),55(58)	229(100)	M+1	228 x
1850	1867	39,282	<b>acide hexanoïque</b>	60(100),73(57),45(38)	99(100)	M+1-18	116 x
1881	1890	39,979	<b>alcool benzylique</b>	79(100),77(76),108(65)	91(100)	M+1-18	108 x
1903	1909	40,443	<b>succinate d'éthyle et de 3-méthylbutyle</b>	101(100),129(95),71(43)	129(100),217(78)	M+1	216 x
1918	1925	40,746	<b>2-phényléthanol</b>	91(100),65(29),122(27)	105(100)	M+1-18	122 x
1946	1953	40,267	3-hydroxyocténoate d'éthyle	117(100),71(70),43(60)	169(100),187(40)	M+1-18	186
1963	/	41,675	dodécanol	55(100),69(99),41(88)	/	186	
2037	2046	43,179	<b>4-éthylguaïacol</b>	137(100),152(44),122(20)	153(100)	M+1	152 x
2049	2054	43,396	<b>tétradécanoate d'éthyle</b>	88(100),157(68),101(65)	257(100)	M+1	256 x
2062	2079	43,676	<b>acide octanoïque</b>	60(100),41(83),73(73)	127(100)	M+1-18	144 x
2174	2184	45,834	<b>eugénol</b>	164(100),149(46),103(30)	165(100)	M+1	164 x
2178	2191	45,901	<b>4-éthylphénol</b>	107(100),104(53),122(48)	123(100),105(55)	M+1	122 x
2273	2292	47,647	<b>acide décanoïque</b>	129(100),60(85),73(80)	155(100)	M+1-18	172 x
2372	2398	49,703	octanoate de 2-phényléthyle	104(100),57(12),41(10)		248	x
2397	/	49,773	monosuccinate d'éthyle	101(100),55(39),128(28)	129(100), 147(75)	M+1	146
>3000	/	64,756	2-(4-hydroxyphényl)éthanol	107(100),138(43),77(35)	121(100)	M+1-18	138

<sup>a</sup> principaux fragments rencontrés dans le spectre de masse réalisé en mode Impact Electronique avec leurs intensités respectives entre parenthèses, <sup>b</sup> principaux fragments rencontrés dans le spectre de masse en mode Ionisation Chimique avec leurs intensités respectives entre parenthèses. Les ions utilisés pour confirmer l'identité du composé sont soulignés et sont notifiés en colonne de droite et les ions utilisés pour la quantification sont en italique; <sup>c</sup> masse molaire du composé (en g/mol) ; <sup>d</sup> Indice de rétention calculé au moyen d'un mélange d'alcane linéaires aliphatiques selon Van den Dool and Kratz (+ ref) ; <sup>e</sup> Indice de rétention selon Ledauphin et al. (+ref) ; <sup>f</sup> composé pour lequel un standard synthétisé ou pur dilué a pu être injecté dans les mêmes conditions d'analyse ; <sup>g</sup> diacétone ; 4-hydroxy-4-méthylpentan-2-one



### *Quantification des composés volatils par CPG/SM*

Un ou plusieurs fragments de masse a été sélectionné(s) pour chacun des pics présents dans les chromatogrammes obtenus par CPG/SM. Pour la plupart de ces pics, les fragments de masse les plus intenses ont été choisis afin d'être intégrés pour obtenir une aire. Néanmoins, pour un bon nombre de pics, certains fragments ont été exclus de la sélection lorsque l'une ou l'autre des trois raisons principales suivantes était en cause :

- Le fragment observé fait aussi partie du spectre de masse d'un autre composé présentant des caractéristiques d'élution très proches (cas d'une coélution),
- Le fragment observé correspond au pic moléculaire et il est sujet au phénomène d'autoprotonation, problème régulièrement rencontré dans les analyseurs de masse de type « trappe ionique »,
- Le fragment observé apparaît de façon importante dans le bruit de fond analytique ce qui peut engendrer une forte baisse de la sensibilité de la méthode.

Les fragments retenus pour chaque analyte évalué sont présentés dans le Tableau 16.

Les fragments de masse 45 et 69 ont été sélectionnés pour l'intégration du pic de l'étalon interne, le 4-méthylpentan-2-ol. Pour chaque analyse, la quantité de ces deux ions a été vérifiée au temps de rétention de l'étalon interne et choisie pour être proche de 10 000 unités comptées par le multiplicateur d'électrons du spectromètre de masse. En cas de forte différence, une autre analyse est réalisée en faisant varier le débit de fuite de l'injecteur. Il est à noter que le choix de cette valeur cible de 10 000 a été déterminé de manière à pouvoir évaluer sensiblement le niveau d'une centaine de composés dans les échantillons les plus concentrés en volatils sans que les pics les plus intenses deviennent saturants pour la colonne chromatographique.

*In fine* pour chaque pic proposant un rapport signal/bruit supérieur à 10, des **aires relatives** ont été calculées en divisant l'intégration obtenue pour chaque pic par celle obtenue pour les fragments 45 et 69 du 4-méthylpentan-2-ol de la même injection.

## ANALYSES STATISTIQUES

Des analyses statistiques ont été réalisées pour vérifier l'évolution des composés volatils au cours de la fermentation alcoolique et de la fermentation malolactique. Une matrice contenant 87 lignes et 54 colonnes a été élaborée sous excel®.

A chaque ligne de cette matrice correspond un prélèvement donné (voir tableau suivant).

Tableau 17 : effectifs des prélèvements de cidres répartis dans la matrice de données

Année 1	Production	Année 2
11	Fermier PA	13
5	Artisan AOC	16
10	Industriel PA	11
11	Industriel AOC	10
37	Total	50
	87	

A chaque colonne correspond les valeurs d'aires relatives trouvées pour un composé volatil donné (pour un total de 52 composés volatils) dans tous les prélèvements (ligne). De plus, pour chaque prélèvement deux chiffres (placés sur deux colonnes) lui ont été attribués. Le premier chiffre (pouvant prendre les valeurs de 1, 2, 3 et 4) correspond à l'appartenance du prélèvement à une phase de la fermentation alcoolique (voir partie 23.2). Le deuxième chiffre (pouvant aussi prendre des valeurs de 1, 2, 3 ou 4) correspond à l'appartenance du prélèvement à une phase de la fermentation malolactique (voir partie 23.2) pour les cuves ayant spécifiquement réalisées une fermentation malolactique.

L'acquisition des analyses, a été opérée grâce au logiciel SPAD 7.0 (Cohéris, France) d'après la matrice créée en utilisant les procédures « demod » pour l'ANOVA et « Copri » pour les ACP.

### **18. Analyses univariées**

Des analyses de la variance (ANOVA) ont été effectuées grâce à la procédure « demod » du logiciel SPAD 7.0. Cette procédure calcule tout d'abord une

moyenne dans chaque modalité (aires relatives moyennes pour les phases 1, 2, 3 et 4) puis compare les moyennes dans chaque modalité à la moyenne générale obtenue (calcul de la variance). Pour chaque composé volatil, une valeur-test et une probabilité sont ainsi calculée.

Pour chaque composé volatil et pour chaque cuve une moyenne des aires relatives obtenues a été calculée pour la Phase 1 (0 à 25% de sucres consommés), la Phase 2 (25 à 50% de sucres consommés), la Phase 3 (50 à 75% de sucres consommés) et la Phase 4 (plus de 75% de sucres consommé). Ces moyennes ont été soumises à une analyse de la variance pour écarter les composés proposant peu d'évolution au cours de ces 4 phases. *In fine*, seuls les composés volatils proposant une probabilité inférieure à 0,001 (risque d'erreur de 0,1%) ont été sélectionnés pour être présentés et discutés par la suite (partie 23.2). Leur évolution peut être considérée comme significative au cours de la fermentation alcoolique (écart important pour au moins une des phases par rapport à la moyenne générale). Cette pré-analyse a été suivie par une analyse en composantes principales sur les aires relatives de chaque composé volatil pour chaque cuve. Chaque individu correspond à l'ensemble des aires relatives, pour un prélèvement de cidre donné, des composés volatils proposant une évolution significative.

Dans un second temps, une analyse de la variance a été réalisée sur les 4 phases de la fermentation malolactique dans les mêmes conditions que la précédente.

## **19. Analyse multivariée**

A partir du jeu de données concernant la fermentation malolactique. Les composés possédant une probabilité inférieure à 0,001 ont été sélectionnés en vue de réaliser une analyse en composantes principales (ACP). Les deux principales composantes ont été sélectionnées et une projection des individus (prélèvements) a tout d'abord été effectuée. Une projection des variables (composés volatils) sur le modèle statistique a par la suite été opérée afin de visualiser leur évolution au cours des phases 1, 2, 3 et 4 de la fermentation malolactique.

## Chapitre Trois

### **CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSIONS**

## 20. Dosage des acides organiques en chromatographie liquide

Comme nous avons pu le voir en partie bibliographique les acides organiques sont des marqueurs-clés des transformations dans la composition physico-chimique des boissons fermentées telles que le cidre. Le suivi de l'évolution de leur concentration permet notamment de caractériser le stade d'avancement de réactions microbiennes ou biochimiques au cours de l'élaboration des cidres à distiller. C'est pourquoi notre premier objectif analytique a été de choisir et développer une méthode de dosage de 9 acides organiques : l'acide oxalique, l'acide tartrique, l'acide pyruvique, l'acide malique, l'acide lactique, l'acide acétique, l'acide citrique, l'acide succinique et l'acide propanoïque.

Les techniques d'analyses utilisées pour la séparation et la quantification des acides organiques sont l'électrophorèse capillaire (Castiñeira A.M. *et al.* 2002; Santalad A. *et al.* 2007; Peres R.G. *et al.* 2009; Tezcan F. *et al.* 2009) et la chromatographie. La chromatographie en phase gazeuse reste peu utilisée car elle nécessite des étapes de traitement de l'échantillon et/ou de dérivation des acides organiques (Bartolozzi F. *et al.* 1997; Escobal A. *et al.* 1998; Santalad A. *et al.* 2007) contrairement à la chromatographie liquide hautes performances avec laquelle des analyses ont pu être menées en exclusion ionique (Morales M.L. *et al.* 1998; Chinnici F. *et al.* 2005), en échange d'anions (Vérette E. *et al.* 1995; de Quiros A.R. *et al.* 2009) et en partage en phase inverse (Escobal A. *et al.* 1998; Picinelli A. *et al.* 2000; Larpin S. *et al.* 2002; Shui G. *et al.* 2002; del Campo G. *et al.* 2003; Kerem Z. *et al.* 2004; Perez-Ruiz T. *et al.* 2004; de Quiros A.R. *et al.* 2009; Kritsunankul O. *et al.* 2009). Dans ce dernier cas le détecteur le plus utilisé est le spectrophotomètre à barrette de diodes (Escobal A. *et al.* 1998; Picinelli A. *et al.* 2000; Shui G. *et al.* 2002; Kerem Z. *et al.* 2004; de Quiros A.R. *et al.* 2009; Kritsunankul O. *et al.* 2009) bien que la chimiluminescence (Perez-Ruiz T. *et al.* 2004) puisse être aussi appliquée. L'application de ces méthodes dans les produits vinicoles a fait l'objet d'une revue en 2005 (Mato I. *et al.* 2005).

Dans les cidres les méthodes de quantification des acides organiques se sont toutes fortement inspirées des travaux de Blanco Gomis *et al.* en 1988 (Blanco

Gomis D. *et al.* 1988). Ces auteurs ont utilisé la CLHP de partage en phase inverse avec une élution isocratique (tampon phosphate 0,01M à pH=2,65), une colonne de type silice greffée octadécyle (C18) traditionnelle ou de taille réduite pour diminuer le temps d'analyse (ODS-2: 10cm x 2,1mm ; particules de 3 $\mu$ m ; Blanco Gomis D. *et al.* 1991) et une détection par DAD. Les teneurs en acides quinique, pyruvique, malique, shikimique, lactique, acétique, fumarique et succinique ont ainsi pu être déterminées dans certains échantillons de cidres.

Ce sont donc ces travaux, ainsi que ceux de del Campo *et al.* (del Campo G. *et al.* 2003) qui ont servi de base pour le développement de notre méthode d'analyse. Cependant nous avons observé, au cours de la mise au point, un certain nombre de biais, dus notamment aux grandes variations de composition de la matrice cidre au cours du temps. Cela nous a conduit à adapter les paramètres de la méthode, et en particulier le traitement quantitatif, et par conséquent nous a aussi contraints à valider ensuite la nouvelle méthodologie.

## **20.1. Paramètres chromatographiques**

### *Longueur d'onde de travail*

Ne disposant que d'un spectrophotomètre UV-Vis à longueur d'onde fixe nous avons choisi un compromis à 210nm.

### *Phase stationnaire*

Nous avons utilisé une phase inverse en silice greffée C18 à particules sphériques WATERS Sphérisorb C18 (ODS, 25 x 0,4 cm ; 5  $\mu$ m) sans pré-colonne au cours de la première campagne d'analyses et une colonne LUNA (phase inverse, ODS, 25 x 0,46 cm ; 5  $\mu$ m) de Phénoménex<sup>®</sup> munie d'une pré-colonne « à disques » (4 x 3 mm) au cours de la deuxième campagne.

### *Phase mobile*

La valeur du pH de l'éluant utilisé doit être choisie inférieure ou égale à 4 afin d'éluier les acides sous leur forme non dissociée à un pH largement inférieur à la valeur moyenne des pK<sub>a</sub> (de l'ordre de 4,5) et d'optimiser la séparation grâce à un maximum d'échanges par partage entre les phases mobile et stationnaire. Nous avons opté pour un tampon acide phosphorique/dihydrogénophosphate 0,01M de pH=2,7 avec une élution isocratique. Le débit a été fixé à 0,5 mL.min<sup>-1</sup>

pour améliorer les résolutions pendant les 14 premières minutes d'analyse, puis il a été accéléré à  $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  pour réduire ensuite le temps total d'analyse à environ 35 min.

#### *Injection/étalon interne*

Pour s'affranchir de tout dysfonctionnement de la vanne manuelle ( $20\mu\text{L}$ ) nous avons utilisé l'acide glutarique comme étalon interne dans chaque échantillon injecté. Les temps de rétention et les résolutions observés en utilisant ces conditions expérimentales sont données dans le Tableau 18. Une illustration de chromatogrammes de cidre est donnée en Figure 8 .

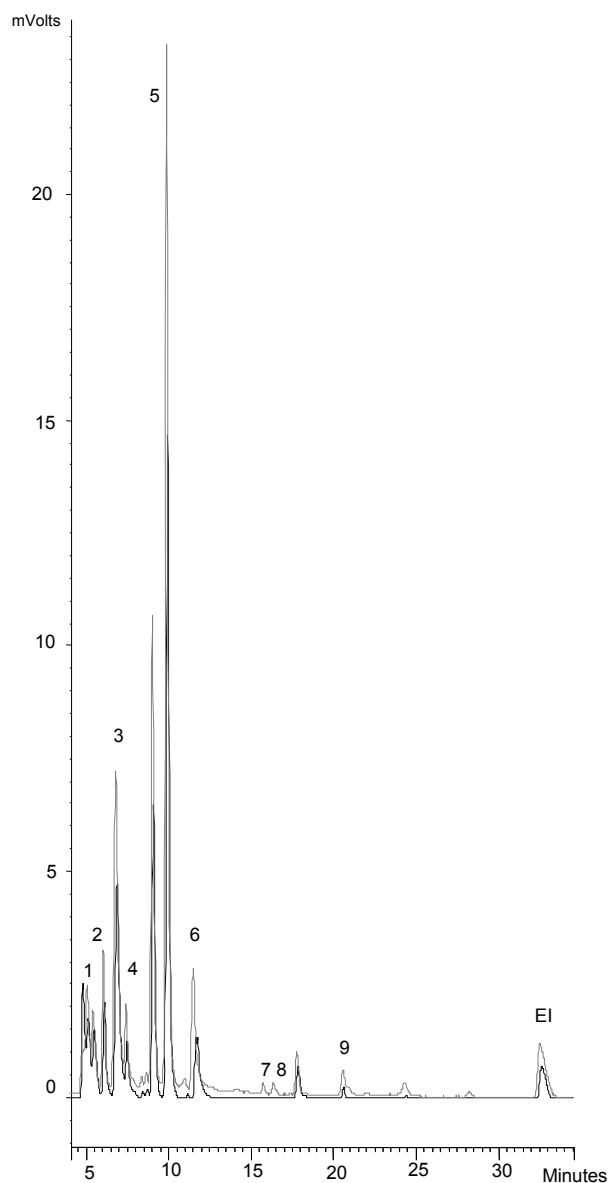


Figure 8 : Chromatogrammes CLHP/UV superposés d'un cidre industriel "AOC Calvados" en phase de maturation dopé et non dopé lors de la campagne 2007/2008.

Note de figure : tracé foncé, échantillon non dopé ; tracé clair, échantillon dopé. Les numéros des pics sont donnés selon le Tableau 18.

Tableau 18 : Temps de rétention (en minutes) des 9 acides dosés en CLHP sur la colonne C18 WATERS (1) et la colonne LUNA Phénoménex (2) après optimisation des conditions d'analyse ; Résolution sur la colonne LUNA Phenomenex (3)

Numéro	Acides dosés	Colonne C18 WATERS ® (1)	Colonne Luna Phénoménex (2)	Résolution (3)	
1	Acide oxalique	4,72	5,03		
2	Acide tartrique	5,12	5,46.	0,64	
3	Acide pyruvique	6,70	6,90		3,18
4	Acide malique	7,10.	7,60	1,85	
5	Acide lactique	8,10.	10,10		>5
6	Acide acétique	8,90	11,24.	>5	
7	Acide citrique	13,40	17,10.		>10
8	Acide succinique	13,75	17,50	0,73	
9	Acide propanoïque	16,94	21,20.		>10
EI	Acide glutarique	21,70	31,50.		

Conditions d'analyse : injection de 20µL, température ambiante, phase mobile H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> 0,01M à pH 2,7, débit de 0,5 mL.min<sup>-1</sup> (0 à 14 min) puis de 1mL.min<sup>-1</sup> à partir de 14 minutes (temps total d'analyse de 35 minutes), détection à 210 nm

## 20.2. Etalonnage et mise en évidence d'un « effet de matrice »

La linéarité est la première loi à vérifier lors de la mise en place d'une méthode de dosage avec quantification par étalonnage. Mais même si l'étalonnage est linéaire, la justesse de la quantification de l'analyte répond à deux possibilités :

- la pente obtenue par étalonnage dans un milieu simple est identique à celle obtenue en milieu complexe (soit sur la matrice expérimentale par ajouts dosés dans l'échantillon). La détermination des concentrations dans les échantillons est alors simple et consiste à comparer directement les aires des pics obtenus pour chaque chromatogramme d'échantillon à la droite d'étalonnage obtenue en milieu simple (étalonnage direct),

- la pente obtenue par étalonnage dans un milieu simple est différente de celle obtenue par ajouts dosés dans l'échantillon. La présence d'un « effet matrice » est alors en cause. Un étalonnage par ajouts dosés, et donc plusieurs analyses par échantillon, devra être réalisé systématiquement pour chaque échantillon pour accéder au calcul de concentration.



### *Traitement préalable de l'échantillon*

Afin de limiter l'effet potentiel de la matrice et d'améliorer la reproductibilité de la méthode, nous avons traité au préalable l'échantillon en nous inspirant des méthodes officielles de dosages des paramètres œnologiques (OIV 2006). Les cidres ont été systématiquement déféqués à l'aide d'hexacyanoferrate de potassium et de sulfate de zinc. Une dilution au 1/2, avec l'éluant (tampon phosphate) et non avec l'eau déminéralisée, a de plus été réalisée avant toute injection.

### *Mise en évidence d'un « effet matrice » – justesse de la méthode*

Dans le Tableau 19 sont reportées les pentes obtenues pour la droite d'étalonnage correspondant à chaque acide en milieu aqueux simple (tampon phosphate) et celles obtenues par étalonnage avec addition d'ajouts dans les différents cidres (sur une moyenne de 3 à 4 étalonnages).

Tableau 19 : Pentes moyennes comparées en milieu simple (tampon phosphate) et en milieu complexe (cidres)

	Fermier PA	Industrielle AOC	Industrielle PA	Artisan AOC	Tampon phosphate
Ac. oxalique	22,5 ± 0,21	29,0 ± 1,59	25,0 ± 2,18	21,6 ± 0,86	24,8
Ac. tartrique	1,65 ± 0,53	3,10	2,00 ± 0,44	3,50 ± 0,27	5,00
Ac. pyruvique	28,0 ± 3,74	20,0 ± 0,35	18,7 ± 3,04	12,0 ± 0,31	11,7
Ac. malique	2,80 ± 0,71	2,00 ± 0,33	2,40 ± 0,93	2,50 ± 0,12	3,45
Ac. lactique	2,50 ± 0,06	1,00 ± 0,01	1,50 ± 0,32	1,0 ± 0,02	1,60
Ac. acétique	1,50 ± 0,11	1,20 ± 0,12	2,10 ± 0,35	1,0 ± 0,10	1,50
Ac. citrique	3,00 ± 0,06	2,70 ± 0,02	3,30	2,5 ± 0,23	3,40
Ac. succinique	2,50 ± 0,70	1,50 ± 0,14	2,90 ± 0,41	1,2 ± 0,13	2,10
Ac. propionique	0,80 ± 0,04	0,70 ± 0,04	0,75 ± 0,0	0,65 ± 0,0	1,00

On remarque :

- qu'il existe de fortes différences de réponse (plus la pente est forte, meilleure est la réponse) entre les composés vis-à-vis de la méthode de détection, les acides propionique, acétique, lactique et succinique, avec des pentes comprises entre 1 et 2 étant les moins sensibles,

- que les pentes obtenues pour certains acides (acide tartrique et acide pyruvique notamment) diffèrent de manière importante entre l'étalonnage en milieu simple et l'étalonnage en milieu complexe: **il sera donc nécessaire de faire un étalonnage systématique par ajouts dosés dans chaque**

**échantillon de cidre.** Il est important de noter aussi que pour des cidres prélevés chez un même producteur les pentes obtenues par étalonnage en ajouts dosés peuvent être aussi différentes (cas des cuves industrielles pour les acides tartrique, pyruvique, acétique et succinique).

On peut en conclure qu'il existe dans le cidre en cours d'élaboration une forte interférence de la matrice sur les résultats analytiques et qui peut s'expliquer (i) par le poids quantitatif de cette matrice organique et minérale (mono et disaccharides, polysaccharides, acides aminés et peptides, alcools, anions et cations minéraux,...) relativement aux analytes testés, suffisant pour peser sur les équilibres physico-chimiques de ces analytes (acides carboxyliques); (ii) par une très grande variabilité de la composition de ces mêmes composants majeurs d'un échantillon à un autre (nature de la matière première et des procédés cidricoles) et (iii) enfin, d'un échantillon de cidre à un autre sur la même fabrication, d'une évolution importante et très variable de cette même matrice au cours du temps (avec des cinétiques d'évolution différentes d'un composant majeur à un autre, susceptibles d'influer sur ces mêmes équilibres physico-chimiques des analytes).

Enfin, en l'absence de comparaison possible avec des valeurs vraies d'analytes, la justesse de cette méthode peut être considérée comme établie dans la mesure où elle utilise systématiquement, pour chaque échantillon dosé, l'étalonnage au moyen d'ajouts dosés qui est généralement considéré comme étant la méthodologie de choix pour vérifier la justesse d'une procédure analytique.

#### *Validation de la méthode*

*In fine*, la méthode a été validée après vérification de la linéarité, de la justesse, et estimation des limites de détection et de quantification, puis des tests de répétabilité et de reproductibilité. L'ensemble est résumé en annexe à ce mémoire.

## **21. Dosage des composés volatils par chromatographie en phase gazeuse**

### **21.1. Extraction des composés volatils de l'échantillon**

Nous avons voulu au cours de cette étude vérifier l'évolution de composés volatils majeurs au cours de l'élaboration du produit à savoir du moût de pommes jusqu'au cidre à distiller. Cette matrice en cours d'évolution est riche en macromolécules (sucres, polyphénols, etc...) qu'il sera important d'éliminer dans un premier temps afin d'éviter une trop forte contamination au cours de l'analyse par CPG. Des techniques comme l'injection directe ou l'extraction liquide-liquide n'ont donc pas été retenues car elles sont susceptibles de polluer l'injecteur du chromatographe, voire la colonne capillaire, par introduction de molécules lourdes ou de macromolécules. Afin de comparer le contenu de prélèvements possédant finalement une fraction volatile très faible, la méthode d'extraction choisie se doit d'être répétable, très sensible et ne pas conduire à la formation de composés « fantômes » pouvant être interprétés comme potentiels marqueurs des cidres à distiller. Trois méthodes sont suffisamment sensibles pour avoir été appliquées à la détermination de composés volatils dans les cidres.

La technique d'extraction par espace de tête dynamique ou « Purge-and-Trap » est intéressante pour sa sensibilité et a notamment été utilisée pour caractériser des esters présents à l'état de traces dans les cidres (Rodriguez Madrera R. *et al.* 2005), elle a néanmoins été pointée par plusieurs auteurs comme étant trop souvent une source potentielle de composés néo-formés voire de ne pas donner de très bons rendements de récupération de molécules très ou moyennement volatiles (Xu Y. *et al.* 2007).

La Micro-Extraction en Phase Solide utilisant l'Espace de Tête (HS-SPME) est une méthode très utilisée de nos jours notamment pour les matrices cidricoles (Wang L. *et al.* 2004; Fan W. *et al.* 2006; Xu Y. *et al.* 2007) ; elle présente le gros avantage de pouvoir être automatisée ce qui permet d'obtenir de très bonnes répétabilités d'extraction et évite aussi les consommations excessives de solvant ; le choix des utilisateurs tend à s'orienter actuellement vers des fibres mixtes de type carboxen/PDMS permettant l'adsorption d'une majorité de composés volatils ; Cette technique pourra cependant s'avérer limitée (i) par la capacité d'adsorption des composés sur la fibre utilisée, et (ii) pour l'extraction

des composés les moins volatils. Elle demande cependant de disposer d'un matériel analytique bien spécifique que notre laboratoire ne possède pas.

Nous avons choisi d'utiliser l'Extraction sur Phase Solide (SPE) pour la récupération des composés volatils. Cette technique est très gourmande en solvant et peut être limitée en fonction de l'affinité de la phase solide utilisée. Néanmoins, les travaux de Mangas (Mangas J.J. *et al.* 1996) ont démontré que sur une phase stationnaire relativement neutre de type kieselguhr des rendements de récupération très corrects (typiquement supérieurs à 70%) pouvaient être obtenus pour une large gamme de composés volatils présents dans les cidres. Nous pouvons noter que de très faibles rendements ont été malheureusement calculés pour des composés très polaires de type diol ainsi que pour les acides acétique et propanoïque. Ce type d'extraction suivie d'analyses par GC-MS en focalisant sur une vingtaine d'analytes a permis d'obtenir aussi de bonne répétabilité d'extraction et d'analyse (RSD<10%). L'Extraction sur Phase Solide, même si elle doit être suivie d'une étape de concentration de l'extrait qui peut être relativement longue, permet d'obtenir un extrait final liquide facilement manipulable et conservable pendant quelques semaines au congélateur et où les analytes peuvent être très concentrés.

### **21.2. Analyse par GC/MS**

L'analyse chromatographique a été conduite de manière classique selon une méthodologie bien en place au laboratoire : injection split (1/100<sup>ème</sup>), phase stationnaire polaire de type Carbowax 20M (BP20 de chez SGE) et programme de température de 32 à 240°C. La détection par spectrométrie de masse a été effectuée au moyen d'une trappe d'ions : analyseur simple, sensible et polyvalent.

L'identification des composés a été conduite au moyen d'une stratégie et d'outils bien rodés eux aussi au laboratoire (Ledauphin J. 2003; Ledauphin J. *et al.* 2004; Ledauphin J. *et al.* 2006; Ledauphin J. *et al.* 2010) :

- comparaison des spectres de masse en mode impact électronique avec ceux de la banque de données NIST et celle constituée au laboratoire depuis une douzaine d'années. Cette étape correspond à un premier pas vers une identification définitive des composés ; elle permet d'établir une ou des

propositions de structure chimique pour chaque pic, mais elle ne peut être considérée comme seul moyen de caractérisation étant donné que plusieurs molécules peuvent présenter des spectres de masse très similaires.

- confirmation des propositions d'identité de composé par comparaison des indices de rétention calculés et ceux connus de la littérature ou de l'archivage du laboratoire. Cette deuxième étape permet d'affiner un faisceau de présomption de présence de tel ou tel analyte. Néanmoins, des étapes supplémentaires sont nécessaires, car des isomères peuvent présenter des spectres de masse similaires et être élués pour un temps de rétention très proche. De plus, les indices de rétention considérés par certains auteurs comme fiables et relativement identiques pour une même phase stationnaire utilisée peuvent être différents (à une vingtaine ou une trentaine d'unité d'indice près) suivant des caractéristiques telles que l'usure de la phase stationnaire ou encore le débit fixé lors de l'analyse.

- confirmation par la détermination de la masse moléculaire de plusieurs composés par enregistrement du spectre de masse en ionisation chimique. Cette troisième étape permet d'améliorer nettement la probabilité de présence de certains analytes. Néanmoins, elle ne permet pas (i) de distinguer deux isomères et (ii) suivant l'espèce chimique réactante (ici l'acétonitrile) la réponse de certains composés peut être très faible voire quasiment nulle. L'acquisition d'un spectre en ionisation chimique doit en effet tenir compte de la présence de l'espèce réactante et la détection ne peut ainsi se faire que pour des rapports  $m/z$  relativement élevés. L'information pour les rapports  $m/z$  les plus faibles est par conséquent perdue ce qui correspond dans le cas de l'acétonitrile à tous les pics de masse situés en dessous d'un rapport  $m/z$  de 65. Ce mode est finalement peu adapté pour certaines familles chimiques comme les hydrocarbures et les alcools aliphatiques (voir Tableau 16) ; par contre il est particulièrement performant pour la détermination de la masse molaire d'esters (pic moléculaire + 1), d'acides carboxyliques (pic moléculaire + 1 -18) ou de composés polyfonctionnalisés (pic moléculaire + 1 et/ou pic moléculaire + 1 - 18).

- comparaison des temps de rétention et des spectres de masse avec ceux d'échantillons standard authentiques ou de mélanges de standards de synthèse injectés dans les mêmes conditions chromatographiques (Ledauphin *et al*, 2010). Cette dernière étape permet de lever l'ambiguïté liée à la présence d'un composé. D'autres techniques proposant une empreinte structurale peuvent être

envisagées (Résonance Magnétique Nucléaire, Infra-Rouge notamment) en couplage à la CPG ou après isolement par chromatographie préparative mais elles sont généralement peu sensibles et très gourmandes en échantillon et sont par conséquent peu adaptable à l'identification de composés volatils représentant une très faible part de l'échantillon.

Dans le cadre de ce travail, 35 composés ont pu être formellement identifiés dans les extraits de cidres à distiller en cours d'élaboration. Onze composés sont supposés identifiés mais leur présence n'a pu être vérifiée par l'injection d'un standard pur ou synthétisé pour diverses raisons (indisponibilité du produit chez les fournisseurs, synthèse chimique peu évidente, ...). Ces résultats sont regroupés dans le Tableau 16. Il est à noter que des interrogations persistent sur l'identification de deux d'entre eux ( $t_r = 13,69$  min et  $t_r = 28,96$  min).

Néanmoins, l'appartenance à une classe chimique a pu être donnée pour les composés dont les temps de rétention sont de 13,51 min (alcool, spectre de masse supposé appartenir à l'hexan-3-ol) et de 28,53 min (terpène). Les composés identifiés sont pour la plupart des marqueurs importants des eaux-de-vie et ont pu être finement caractérisés au laboratoire sur une même phase stationnaire en CPG/SM et dans les mêmes conditions d'analyse dans divers échantillons de Calvados, Cognac, Armagnac et Mirabelle (Ledauphin *et al.*, 2010) au cours de travaux précédents.

### **21.3. Quantification relative des composés volatils dans les échantillons**

Dans chaque échantillon testé, pour chacun des composés identifié, une aire relative a été calculée par intégration d'un ou plusieurs ions spécifiques à chacun d'entre eux (Tableau 16, colonne EI) par rapport à l'intégration de l'ion  $m/z=69$  de l'étalon interne (4-méthylpentan-2-ol).

Tous les résultats quantitatifs sont donc ***exprimés en aire relative par rapport à une même aire de référence*** grâce aux analyses réalisées par CPG/SM.

A ce stade, une remarque importante doit être faite qu'un autre objectif quantitatif aurait pu consister : 1/ soit à déterminer les concentrations absolues

(exprimées en mg/L ou µg/L) de chaque composé, 2/ soit à déterminer les teneurs relatives (composition en pourcentage) des composés volatils dans chaque échantillon.

Pour répondre au premier objectif, il faudrait réaliser un étalonnage individuel de chaque composé et pour cela disposer d'échantillons purs et authentiques d'une cinquantaine de composés, puis préparer une solution standard précise de chacun (ou du mélange), ce qui représente un travail et un investissement considérables au regard du bénéfice analytique supplémentaire obtenu.

Pour répondre au 2<sup>ème</sup> objectif, il s'agit plus simplement de réaliser en parallèle à l'identification par CPG/SM une analyse en CPG/FID. Cependant, la détection par ionisation de flamme est beaucoup moins sensible que par spectrométrie de masse, ce qui peut être très pénalisant pour l'analyse de composés volatils possédant de faibles concentrations. De plus, l'analyse d'une cinquantaine d'analytes possédant dans les échantillons des concentrations très diverses est inévitablement une source de coélutions importantes ce qui engendre la détermination du niveau d'un nombre plus réduit de composés. Ces coélutions peuvent aussi apparaître lors d'analyses particulières à cause de la forme des pics ; les acides carboxyliques, par exemple, présentent des pics traînants à cause de leur forte rétention sur la phase stationnaire polaire ce qui peut masquer des pics possédant des temps de rétention très proches. Citons par exemple l'acide acétique (Tr = 29,87 min) et le 2-éthylhexanol (Tr = 30,667 min) ainsi que l'acide 2-méthylbutanoïque (Tr = 35,346 min) et le succinate de diéthyle (Tr = 35,403 min).

De plus, l'usure de la phase stationnaire peut avoir un effet non négligeable sur la résolution des pics ; la capacité d'adsorption des composés polaires peut être faiblement diminuée par rapport à celle de composés peu polaires après de multiples injections. Des analyses d'un même échantillon peuvent ainsi réserver plus ou moins de coélutions suivant s'il est injecté sur une phase stationnaire neuve ou en « fin de vie ».

Reconnu pour sa sensibilité, le spectromètre de masse permet aussi une sélection d'ions ce qui rend possible l'intégration spécifique de pics coélus. Notre

choix s'est porté dans cette étude sur une cinquantaine de composés volatils alors qu'en augmentant le facteur de concentration lors de la préparation d'échantillons (concentration sur appareil de Kuderna-Danish) la présence d'une centaine de composés volatils aurait pu être vérifiée. Ce choix d'une cinquantaine a été réalisé en raison de la relative faible gamme de linéarité (globalement concentrations d'un facteur 1 à 1000) lors d'une quantification au moyen d'un spectromètre de masse de type trappe ionique.

C'est pourquoi nous avons choisi d'évaluer le niveau de présence des composés volatils dans les échantillons par des mesures d'aires relatives par rapport au même standard interne par CPG/SM. Cet outil est, en effet, le plus simple et le plus sensible pour répondre à l'objectif que nous nous étions fixé à savoir **d'étudier l'évolution au cours du temps et donc de comparer des teneurs absolues, pour un composé volatil donné et pris individuellement**, dans les échantillons étudiés.



## **22. Les paramètres cidricoles**

### **22.1. Les sucres fermentescibles**

#### *Teneurs initiales en sucres*

Le bon déroulement de la fermentation alcoolique dans un cidre est intimement lié à la teneur initiale en sucres du moût (en gris dans le Tableau 23). Dans la littérature, les concentrations initiales en sucres annoncées pour divers échantillons de jus de pommes à cidre sont généralement plus élevées que celles présentes dans les moûts de notre étude (Tableau 20). Cependant, il doit être précisé que ces valeurs ont été déterminées ici pour des jus de pommes clarifiés (après « chapeau brun ») dans le cas des cuves fermières et artisanales alors qu'aucune clarification n'a été menée pour les cuves industrielles. De plus, les données rencontrées dans la littérature sont celles de moûts dédiés à la production de cidres de consommation. Par conséquent, il faut prendre en compte que les variétés de pommes utilisées pour élaborer des cidres de consommation sont différentes de celles utilisées pour le cidre à distiller. Les producteurs sélectionnent généralement des pommes plus sucrées pour un cidre de consommation et plus amères pour un cidre à distiller. Le degré de maturité des pommes récoltées peut aussi être un élément très important ; un lot de pommes plus mûres pourra être à l'origine d'un jus de pommes plus sucré.

Tableau 20 : concentrations des sucres (g/L) rencontrées dans la littérature

	[sucres] initiale	[sucres] finale	Cidre	Conditions de fermentation et observations
(Xu Y. <i>et al.</i> 2006)	-	30,21	Chinois	Addition de <i>H. Valbyensis</i> ( $4.10^6$ CFU/mL) jour 1
	-	3,47		Addition de <i>S. cerevisiae</i> ( $4.10^6$ CFU/mL) jour 1
	-	3,88		Addition de <i>H. Valbyensis</i> ( $1.10^2$ CFU/mL) jour 1 + addition <i>S.cerevisiae</i> (1.106 CFU/mL) jour 3
(Picinelli A. <i>et al.</i> 2000)	-	< 1	Commercialisé	Concentration en fructose seulement
(Nogueira A. <i>et al.</i> 2008)	80	-	Français	
(Nogueira A. <i>et al.</i> 2007)	120	2,1		
	120	4		
(Mangas J.J. <i>et al.</i> 1994)	120	2,68	Espagnol	Presse rapide et clarification spontanée
	120	< 1		Presse rapide et clarification enzymatique
	115	1,47		Presse lente et clarification spontanée
	115	5,57		Presse lente et clarification enzymatique
(Leguerinel I. <i>et al.</i> 1989)	88	-	Français	
(Laplace J-M. <i>et al.</i> 1998)	113-122	-	Français	
(Herrero M. <i>et al.</i> 1999 b) (Herrero M. <i>et al.</i> 1999 b)	135	-	Espagnol	
(Garai-Ibabe G. <i>et al.</i> 2008)	70-95	< 1	Espagnol	Concentration en fructose seulement
(Cabranes C. <i>et al.</i> 1996)	104	-	Espagnol	
(Blanco Gomis D. <i>et al.</i> 1991)	98	-	Espagnol	

Tableau 21 : Concentrations initiales (g/L) en sucres (glucose et fructose) rencontrées dans les moûts de cidres à distiller de l'étude

Année 1	Année 2	Production de notre étude
103	73	Fermier PA
84*	88	Artisan AOC
54	75	Industriel PA
66	97	Industriel AOC

\* valeur non mesurée mais estimée par extrapolation de la courbe de consommation

La quantité initiale mesurée en sucres pour les cuves industrielles est comprise entre 54 et 97 g/L. Elle peut être considérée parfois comme très faible. Néanmoins, ces résultats doivent être examinés avec des nuances, car le remplissage des cuves industrielles, très hautes et volumineuses, est particulièrement lent. Plusieurs jours sont nécessaires pour remplir totalement la cuve et il est indubitable qu'au moment du premier prélèvement, lorsque la cuve a été remplie, que le milieu soit peu homogène. De plus le robinet dégustateur (utilisé pour l'échantillonnage) étant à hauteur d'homme, soit en bas de cuve, il est possible que ce premier prélèvement ne soit pas totalement représentatif de la globalité de la cuve.

Les deux cuves industrielles voient leurs concentrations augmenter en même proportion entre la 1<sup>ère</sup> et la 2<sup>ème</sup> année, 38% de plus pour la cuve AOC et 32% de plus pour la cuve PA la 2<sup>ème</sup> année. Les pommes utilisées appartiennent aux mêmes variétés chaque année et on peut possiblement attribuer cette différence également au manque de représentativité de l'échantillonnage dû au mode particulier de prélèvement et au délai de remplissage de la cuve.

La première valeur de la concentration initiale en sucres de la cuve artisanale a seulement été estimée (voir Tableau 21) par rapport à l'allure de consommation. L'analyse de ce premier échantillon n'a pu être effectuée en raison d'un problème expérimental. La cuve utilisée dans cette production est de taille plus « commune », le remplissage se fait sur une même journée et le milieu peut être considéré comme relativement homogène au moment du prélèvement. Les teneurs en sucres (de l'ordre de 85 g/L) proches d'une année à l'autre confirment cette hypothèse. Elles peuvent être considérées comme assez faibles par comparaison aux valeurs reportées par la littérature (voir Tableau 20).

Dans la cuve fermière, dont le petit volume et le remplissage rapide ne peuvent pas induire d'hétérogénéité dans le milieu, les concentrations initiales sur les deux années d'études sont cependant bien différentes également. Le moût utilisé la deuxième année (73 g/L) contient 35% de sucres en moins que la première année (103 g/L).

En résumé, pour l'ensemble des productions étudiées, au cours de l'année 1, les deux cuves de petites tailles (artisanale et fermière) renfermeraient les moûts les plus sucrés. Pour la deuxième année, les teneurs en sucres des moûts étudiés sont plus proches les unes des autres (de 73 à 97 g/L).

D'après les observations faites sur ces 4 cuves pendant deux années consécutives, on voit que les pommes (variétés, degrés de maturité et proportions introduites) et la géométrie des cuves sont deux paramètres suffisants pour engendrer des différences dès l'obtention du moût non fermenté. Dans le paragraphe suivant les différences de consommation en sucres sont étudiées.

### *Vitesses de consommation des sucres*

Afin de vérifier l'avancement de la fermentation alcoolique dans les cuves suivies, nous avons étudié la consommation des sucres au cours du temps. Pour une cuve donnée, le premier prélèvement a été pris comme référence et un niveau de consommation de sucres de 0% lui a été attribué. Le niveau le plus élevé (100%) correspond à une consommation totale de la quantité initiale en sucres pour la cuve correspondante. La valeur de 100% est donc obtenue pour une quantité strictement égale à 0 g/L en sucres en fin de fermentation alcoolique.

Lors de cette étude, la plupart des cuves (6 sur 8) ont enregistré des valeurs finales de l'ordre de 98-99% pour leur dernier prélèvement reflétant ainsi des quantités résiduelles en sucres quasiment insignifiantes (inférieures à 2 g/L) avant distillation. Néanmoins, une quantité résiduelle en sucres assez importante a été observée pour les derniers prélèvements de la production artisanale sur les deux années. Des consommations finales en sucres de 85% (13 g/L au final pour une concentration initiale de 84 g/L) pour la première année et de 86% (12 g/L au final pour une concentration initiale de 88 g/L) pour la deuxième année ont été calculées (voir Tableau 23). Leur cas est un peu particulier dans le sens où le producteur a dû mélanger leur contenu avec celui d'autres cuves afin d'achever la consommation des sucres restants.

Afin d'aborder plus facilement la vitesse de consommation des sucres pour un nombre de prélèvements très différents suivant les années et/ou les producteurs (de 5 pour l'artisan la 1<sup>ère</sup> année à 15 pour l'artisan la 2<sup>ème</sup> année) nous avons choisi de définir quatre phases d'avancement de la consommation des sucres :

- phase 1 ; période correspondant à une consommation de sucres comprise entre 0 et 25% de la teneur initiale,
- phase 2 ; entre 25 et 50% de sucres consommés,
- phase 3 ; entre 50 et 75% de sucres consommés,
- phase 4 ; entre 75 et 100% de sucres consommés.

Les durées de chaque phase pour les cuves étudiées ont pu être calculées à partir des données du Tableau 23. Un tracé (moyenne mobile) du pourcentage de consommation des sucres par rapport au temps a été réalisé pour chaque cuve. Les points de croisement à 25, 50 et 75% ont permis de définir les durées des phases 1, 2 et 3. Le début de la phase 4 correspond à une consommation de 75% en sucres alors que la fin de cette phase a été fixée à la date de distillation du cidre ou de mélange avec une autre cuve dans le cas de la cuve artisanale (dernier prélèvement pour chacune des cuves).

Le Tableau 22 rassemble les données de durée pour chacune des phases et pour chaque cuve suivie lors de cette étude.

Tableau 22 : Durées (en jours) des phases de consommation des sucres dans les cuves étudiées

année	production	phase de consommation des sucres				total
		phase 1 0-25%	phase 2 26-50%	phase 3 51-75%	phase 4 76-100%	
1	fermier PA 1	14	9	22	154	199
	artisan AOC 1	6	29	41	101*	177
	Ind PA 1	7	7	6	148	168
	Ind AOC 1	3	7	7	91	108
2	fermier PA 2	18	32	45	131	226
	artisan AOC 2	10	16	134	82*	252
	Ind PA 2	5	5	5	82	97
	Ind AOC 2	5	2	13	80	100

\* consommation des sucres non-achevée

Les durées de fermentation alcoolique peuvent être très différentes suivant le type de production. La consommation totale des sucres est très rapide pour la production industrielle étudiée quelque soit l'AOC visée. En effet, 98% de la teneur initiale en sucres est consommée systématiquement en moins de 80 jours (voir

). La production fermière se caractérise par des achèvements de consommation des sucres très longs avoisinants les 200 jours pour les deux années. Comme il a été mentionné plus tôt, une quantité résiduelle en sucres (de l'ordre de la dizaine de g/L) a été enregistrée pour les deux années en ce qui concerne la production artisanale. Afin de pouvoir distiller ces cidres, la fermentation alcoolique a été amorcée de nouveau par ajout d'un autre cidre contenant encore des levures actives. Le cidre ainsi muté est devenu sec et a pu être distillé.

Cet arrêt prématuré de la fermentation alcoolique (consommation incomplète des sucres) peut engendrer de multiples problèmes comme :

- une quantité trop importante de sucres au moment de la distillation du cidre ce qui peut favoriser la production de composés volatils indésirables par chauffage comme par exemple une apparition de composés furaniques (Rodriguez Madrera R. *et al.* 2006).

- une quantité de sucres résiduels qui peut être aussi une source de carbone intéressante pour la multiplication de microorganismes indésirables pouvant faire « dévier » la qualité organoleptique du cidre avant distillation (Rodriguez Madrera R. *et al.* 2010).

Tableau 23 : synthèse des résultats bruts obtenus pour le suivi de la teneur en sucres dans les cuves (fermière, artisanale et industrielles) pendant les deux années d'étude

ANNEE	PRODUCTION	AOC	jours	sucres totaux (g.L <sup>-1</sup> )	% consommation des sucres
1	fermier	PA	0	103	0
1	fermier	PA	7	102	1
1	fermier	PA	13	77	25
1	fermier	PA	20	55	47
1	fermier	PA	23	50	51
1	fermier	PA	39	41	60
1	fermier	PA	42	28	73
1	fermier	PA	57	15	85
1	fermier	PA	73	11	89
1	fermier	PA	109	6	94
1	fermier	PA	199	<1	99
1	artisan	AOC	0	84	0
1	artisan	AOC	7	64	24
1	artisan	AOC	12	55	35
1	artisan	AOC	74	22	74
1	artisan	AOC	122	13	85
1	artisan	AOC	177	10	88
1	Ind	PA	0	54	0
1	Ind	PA	6	53	2
1	Ind	PA	12	28	48
1	Ind	PA	35	1	98
1	Ind	PA	99	1	98
1	Ind	PA	139	1	98
1	Ind	PA	157	1	98
1	Ind	PA	168	1	98
1	Ind	AOC	0	66	0
1	Ind	AOC	2	41	38
1	Ind	AOC	10	18	73
1	Ind	AOC	14	17	74
1	Ind	AOC	22	11	83
1	Ind	AOC	37	5	92
1	Ind	AOC	58	3	95
1	Ind	AOC	81	1	98
1	Ind	AOC	101	1	98
1	Ind	AOC	108	1	98

ANNEE	PRODUCTION	AOC	jours	sucres totaux (g.L <sup>-1</sup> )	% fermentation des sucres
2	fermier	PA	0	73	0
2	fermier	PA	8	60	18
2	fermier	PA	23	50	32
2	fermier	PA	29	46	37
2	fermier	PA	37	39	47
2	fermier	PA	50	37	49
2	fermier	PA	64	26	64
2	fermier	PA	71	28	62
2	fermier	PA	78	22	70
2	fermier	PA	85	19	74
2	fermier	PA	170	13,63	81
2	fermier	PA	226	1,69	98
2	artisan	AOC	2	88	0
2	artisan	AOC	8	71	19
2	artisan	AOC	17	55	38
2	artisan	AOC	20	52	41
2	artisan	AOC	24	46	48
2	artisan	AOC	41	33	63
2	artisan	AOC	45	32	64
2	artisan	AOC	52	29	67
2	artisan	AOC	85	26	70
2	artisan	AOC	120	25	72
2	artisan	AOC	148	23	74
2	artisan	AOC	183	20	77
2	artisan	AOC	211	16	82
2	artisan	AOC	252	12	86
2	Ind	PA	0	75	0
2	Ind	PA	1	63	16
2	Ind	PA	5	52	31
2	Ind	PA	7	48	36
2	Ind	PA	14	17	77
2	Ind	PA	21	6	92
2	Ind	PA	33	3	96
2	Ind	PA	61	1	99
2	Ind	PA	79	1	100
2	Ind	PA	97	1	100
2	Ind	AOC	0	97	0
2	Ind	AOC	1	89	8
2	Ind	AOC	4	73	25
2	Ind	AOC	7	39	60
2	Ind	AOC	16	43	56
2	Ind	AOC	23	15	85
2	Ind	AOC	36	6	94
2	Ind	AOC	64	1	99
2	Ind	AOC	100	1	99

Alors que le départ en fermentation (premiers 25%) peut être très rapide pour certaines cuves comme celles de l'industriel (généralement moins d'une semaine), pour la **production fermière**, le départ en fermentation est très long et peut prendre de 14 à 18 jours. Pour cette dernière production, le jus de pomme en « sortie presse » est placé dans des cuves en bois possédant des dimensions relativement restreintes (80 hL) ; elles sont entreposées dans un chai dont la température varie relativement peu au cours du temps. Ces cuves sont soumises à une température relativement fraîche (10-12°C) après pressage des pommes. Il est ainsi possible de penser que le temps de latence de la fermentation alcoolique (temps nécessaire à la multiplication des levures fermentaires) dans le cas de petites cuves soit plus long que pour des cuves de dimensions plus importantes pour une même température.

La poursuite de la fermentation (phase 2) chez le producteur fermier a été très différente au cours des deux années. Les deux premières phases ont été achevées en 23 jours pour la première année alors qu'il a fallu une cinquantaine de jours pour la deuxième année. La consommation de sucres s'est très nettement ralentie à partir de 20 jours (32% de sucres consommés) pour atteindre seulement 50% au cinquantième jour.

La 3<sup>ème</sup> phase de la fermentation alcoolique qui correspond à une consommation en sucres comprise entre 50 et 75% est généralement plus longue que la 2<sup>ème</sup> phase (entre 25 et 50%). Environ 3 semaines ont été nécessaires pour achever cette phase pour la production fermière la 1<sup>ère</sup> année, soit deux fois plus de temps que pour la 2<sup>ème</sup> phase (9 jours). Lors de la 2<sup>ème</sup> année, la 3<sup>ème</sup> phase a duré beaucoup plus longtemps (45 jours). Il faut cependant rappeler que la consommation des sucres pour cette cuve s'est brusquement ralentie autour de 20 jours mais qu'elle s'est poursuivie de façon lente et régulière après cette date.

La dernière phase de la fermentation alcoolique (phase 4) est systématiquement la plus longue et la cuve fermière ne déroge pas à cette règle. Les nutriments (sucres) deviennent peu disponibles pour les levures qui voient leur action décroître au cours du temps. Plus de 130 jours (soit environ 5 mois) ont été nécessaires pour cette dernière phase lors des deux années ce qui



explique pourquoi ce producteur attend généralement une dizaine de mois avant de distiller son cidre.

Le comportement de la **production artisanale** a été très variable sur les deux années d'étude. Le processus de consommation des sucres observé pour la 1<sup>ère</sup> année est assez comparable à celui observé pour la cuve fermière la 2<sup>ème</sup> année. Pour cette 1<sup>ère</sup> année, trop peu de points de prélèvements ont pu être analysés après la 17<sup>ème</sup> semaine (122 jours) pour décrire finement l'évolution des sucres au-delà. Lors de la 2<sup>ème</sup> année cette évolution a pu être suivie plus en détail. La première phase a duré moins longtemps que celle de la cuve fermière (environ 10 jours) et a été suivie par une deuxième phase assez lente (environ 26 jours). A partir de la 5<sup>ème</sup> semaine la consommation des sucres s'est très brusquement ralentie et seulement 75% de la quantité initiale des sucres a été métabolisée en 148 jours (soit environ 5 mois). La fermentation alcoolique a même fini par s'arrêter en cours de 4<sup>ème</sup> phase. Cette évolution peut être expliquée par les conditions d'exposition de la cuve artisanale. Elle se trouve à l'extérieur, dans une zone d'ombre et sa contenance relativement faible (80 hL) fait que son contenu est directement soumis à la température extérieure. Le brusque ralentissement de l'activité des levures coïncide avec une chute des températures (inférieures à 0°C) observée à cette période (cf partie annexes, températures relevées par Météo-France).

Les **cuves industrielles** étudiées proposent des temps de fermentation beaucoup plus rapides. Leur comportement peut être considéré comme similaire, avec un départ en fermentation réalisé en quelques jours seulement (de 3 à 7 jours). Il est suivi d'une deuxième et d'une troisième phase (de l'ordre d'une à deux semaines) tout aussi rapides. Enfin, la 4<sup>ème</sup> phase a duré de 35 à 81 jours pour ces cuves sur les deux années. La première année, la cuve PA termine sa fermentation alcoolique après 25 jours seulement et la cuve AOC au bout de 81. Lors de la seconde année, les deux sont terminées au bout de 60 à 65 jours. Contrairement aux autres cuves étudiées, elles sont de contenance très importante (2500 hL) et sont exposées en plein soleil. La cinétique de consommation des sucres y est très rapide car elles souffrent peu des chutes de températures extérieures. Néanmoins, ces évolutions qui semblent rapides pour la fermentation alcoolique dans le cas des cuves industrielles peuvent être d'un

autre côté considérées comme assez lentes si on les compare à celles observées pour des cidres espagnols (Cabranes C. *et al.* 1996; Herrero M. *et al.* 1999 b) dont la durée de la fermentation est généralement inférieure à 3 semaines (Tableau 6).

En conclusion, la vitesse de la consommation des sucres au cours du procédé d'élaboration des cidres à distiller peut être très différente suivant le savoir-faire et le matériel utilisé par les producteurs. Les productions industrielles disposant de cuves de très grande capacité peuvent achever des fermentations alcooliques assez rapidement (environ 10 semaines), alors que plusieurs mois voire quasiment une année peuvent être nécessaires pour des productions artisanales et fermières où les cuves ont un volume beaucoup plus petit. Dans le cas de ces dernières cuves, la phase de démarrage de la fermentation alcoolique peut être assez long (typiquement supérieure à une semaine) et peut engendrer une cinétique de consommation des sucres très lente par la suite. De plus, le fait d'entreposer des cuves de dimension réduite à l'ombre peut entraîner un arrêt de la fermentation alcoolique (cas de la cuve artisanale) dans une région comme la Normandie où des températures négatives peuvent être enregistrées de façon régulière pendant la période hivernale. Ces fermentations suivant leurs vitesses peuvent être accompagnées ou non par une consommation faible ou importante d'acide malique ce qui fera l'objet du paragraphe suivant.

## **22.2. L'acide malique**

### *Teneurs initiales en acide malique*

Les teneurs retrouvées en acide malique lors de la mise en cuve des jus de pomme s'échelonnent de 0,9 à 3,7 g/L (Tableau 26 et Tableau 27). Le milieu étudié est relativement peu homogène et des écarts de concentration peuvent être observés. Ceci nous a conduits à calculer des valeurs moyennes de ces teneurs initiales (voir Tableau 24) à partir des concentrations calculées en acide malique sur les premiers prélèvements. Ces valeurs peuvent être très différentes suivant le mode de production (fermier, artisan ou industriel), suivant l'année et même pour un même type de production suivant l'appellation visée.

Tableau 24 : Concentrations moyennes (en g/L) en acide malique trouvées dans les cuves sur les premiers jours

Année 1	Production	Année 2
1,1 (± 0,16)	Fermier PA	1,4 (± 0,17)
3,5 (± 0,16)	Artisan AOC	2,0 (± 0)
0,9 (± 0)	Ind PA	2,0 (± 0,07)
3,0 (± 0)	Ind AOC	3,7 (± 0,05)

Il se dégage néanmoins de ces résultats que la teneur initiale en acide malique est plutôt faible pour la production fermière sur les deux années (entre 1,1 et 1,5 g/L). Le moût de pommes du producteur artisanal est beaucoup plus chargé en acide malique (2 et 3,5 g/L). De fortes différences (entre 0,9 et 3,7 g/L) peuvent être enregistrées pour la production industrielle. On peut s'apercevoir que le moût utilisé pour produire le Calvados AOC « Pays d'Auge » semble plus pauvre en acide malique (0,9 et 2,0 g/L) si on le compare à celui utilisé pour le Calvados « AOC Calvados » (3,0 et 3,7 g/L).

Tableau 25 : Teneurs initiales et finales en acide malique calculées pour les cuves lors de notre étude et comparées à celles issues observées pour des cidres dans la littérature

Teneurs en acide malique (g/L) dans des cidres		
Production	Après mise en cuve	En fin d'élaboration
Artisan AOC 1	3,5	1,6
Fermier PA 1	1,1	1,1
Industriel AOC 1	3,0	0,1
Industriel PA 1	0,9	0,1
Artisan AOC 2	2,0	0,1
Fermier PA 2	1,4	1,5
Industriel AOC 2	3,7	0,1
Industriel PA 2	2,0	0,2
<hr/>		
(del Campo G. <i>et al.</i> 2003)	4,5	Entre 0,6 et 0,8
(Herrero M. <i>et al.</i> 1999 a)	3,5	0,2
(Herrero M. <i>et al.</i> 1999 c)	Entre 4,6 et 6,0	0,3
(Laplace J-M. <i>et al.</i> 1998)	Entre 2,7 et 2,8	0,8
(Nedovic V.A. <i>et al.</i> 2000)	5,2	n.d.

Par comparaison avec les teneurs initiales en acide malique trouvées pour des cidres de consommation espagnols (Tableau 25), on peut considérer que les moûts de pommes à cidre normands utilisés pour produire les Calvados sont très pauvres en acide malique. En effet, ces teneurs sont généralement comprises

entre 3,5 et 6 g/L. Une telle différence peut être expliquée par une utilisation de variétés de pommes moins acides pour les cidres à distiller que pour les cidres de consommation ainsi qu'à de potentielles différences de maturité des fruits. La quantité initiale en acide malique peut avoir une influence directe sur la tenue ou non de la fermentation malolactique. Des teneurs trop faibles en acide malique, comme celles trouvées ici pour les moûts de cidres à distiller, peuvent constituer un facteur de non déclenchement de la fermentation malolactique. Laplace *et al.* (Laplace J-M. *et al.* 1998) avaient déjà remarqué ce non-départ en fermentation malolactique qu'ils avaient attribué à une population de bactéries lactiques trop peu abondante dans un cidre normand.

Tableau 26 : Concentrations (données en mg/L) trouvées en acide malique et lactique dans les cuves étudiées lors de la 1<sup>ère</sup> année de prélèvement.

	jours	Ac. malique	Ac. lactique	%age de consommation d'ac. malique	%age de production d'ac. lactique
Fermier PA	0	980	2200	pas de fermentation malo-lactique	
	13	993	2430		
	20	960	1521		
	28	1063	2547		
	39	1269	2526		
	42	1137	3864		
	48	1191	2281		
	57	1067	2339		
	73	1042	2109		
	109	1216	2665		
	169	1103	2419		
199	1563	2726			
Artisan AOC	6	3300	445	pas de fermentation malo-lactique ou apparition tardive	
	13	3300	450		
	29	3520	400		
	74	3680	360		
	122	2800	920		
	177	1620	2550		
Industriel PA	0	941	770	0	22
	4	649	1642	31	46
	8	199	1163	79	33
	12	97	2518	90	71
	47	101	4054	89	114
	97	97	3581	90	100
	139	190	2917	80	82
	157	167	2360	82	66
	168	97	3571	90	100
Industriel AOC	0	3015	1413	0	20
	2	2479	2694	18	39
	6		3518		51
	8	1282	3200	57	46
	10	220		93	
	14	100	5582	97	81
	22	97	6920	97	100
	37	97	5890	97	85
	58	97	4933	97	71
	81	97	5065	97	73
	101	139	4280	95	62

Tableau 27 : Concentrations (données en mg/L) trouvées en acide malique et lactique dans les cuves étudiées lors de la 2<sup>ème</sup> année de prélèvement.

	jours	Ac. malique	Ac. lactique	%age de consommation d'ac. malique	%age de production d'ac. lactique
Fermier PA	1	1172	1056	pas de fermentation malo-lactique	
	15	1461	3418		
	23	1257	2212		
	37	1513	3212		
	43	1330	2903		
	50	1723	3748		
	64	1381	2995		
	71	1375	3109		
	85	1119	2512		
	150	1402	3156		
	170	1461	3418		
226	1630	2880			
Artisan AOC	2	1950	780	0	12
	15	165	4000	92	63
	24	97	3100	95	48
	31	97	3500	95	55
	41	97	3200	95	50
	52	97	3700	95	58
	59	97	3900	95	61
	85	97	3400	95	53
	120	97	6100	95	95
	148	97	5500	95	86
	183	97	6400	95	100
	211	97	6000	95	94
252	97	6000	95	94	
Industriel PA	0	2100	85	0	2
	1	1950	74	7	2
	2	2100	74	0	2
	7	1100	390	48	9
	21	97	2800	95	67
	33	97	3900	95	93
	61	110	3900	95	93
	79	240	4200	89	100
97	230	4000	89	95	
Industriel AOC	0	3800	175	0	4
	3	3700	74	3	2
	4	3700	105	3	2
	7	2500	280	34	6
	23	97	5200	97	106
	36	97	4900	97	100
	64	97	4900	97	100
100	97	4600	97	94	

### *Comparaison des teneurs initiales et finales en acide malique*

Sur les 8 cuves étudiées, les 2 cuves fermières (années 1 et 2) ont des teneurs initiales et finales similaires (voir Tableau 24). Les quantités faibles en acide malique dans le moût initial (de l'ordre de 1 à 1,5 g/L) n'ont pas permis d'amorcer une consommation de l'acide malique et donc de réaliser une fermentation malolactique pour ce type de production.

Cependant, parmi les cuves industrielles, une d'entre elles possédait une teneur faible en acide malique (entre 0,9 et 1 g/L) or une consommation en acide malique concomitante à une apparition d'acide lactique a pu être observée pour celle-ci (voir Tableau 26 – cuve industrielle « Pays d'Auge »). Il est donc possible de penser que, malgré une teneur faible en acide malique dans le moût non fermenté, une transformation de l'acide malique en acide lactique puisse avoir lieu à condition que la température de la cuve soit relativement élevée et/ou que la fermentation alcoolique soit rapide. Il est à noter que toutes les cuves industrielles ont enregistré des concentrations finales en acide malique très faibles (systématiquement inférieures à 0,2 g/L).

A l'inverse une forte teneur initiale en acide malique ne semble pas être un facteur suffisant pour expliquer le bon déroulement d'une fermentation malolactique pour des cidres à distiller. Une teneur en acide malique de l'ordre de 3,5 g/L a été enregistrée la première année pour la cuve artisanale. Pour cette cuve, une concentration élevée a été observée jusqu'au 122<sup>ème</sup> jour (2,8 g/L) ; elle a alors sensiblement chuté pour atteindre 1,6 g/L au 177<sup>ème</sup> jour (voir Tableau 26). Pour ce cas de figure, il est difficile d'exclure qu'une fermentation malolactique n'ait pas eu lieu très tardivement. Des données supplémentaires auraient pu permettre de l'affirmer de manière certaine. Néanmoins, entre le 122<sup>ème</sup> et le 177<sup>ème</sup> jour, la production en acide lactique est inférieure au potentiel de fermentation de l'acide malique. En conclusion, si une fermentation malolactique a eu lieu, elle ne peut être que très incomplète et très tardive. Ce type de cas de figure a déjà été observé dans la littérature (Herrero M. *et al.* 1999 b); des fermentations séquentielles peuvent, en effet, mener à des fermentations malolactique partielles.

Pour ce même type de production, mais lors de la 2<sup>ème</sup> année, un comportement totalement différent a été enregistré. La teneur initiale a été plus faible que lors de la 1<sup>ère</sup> année (2,0 g/L contre 3,5 g/L) ; néanmoins, l'acide malique a été totalement consommé et présente une teneur finale d'approximativement 0,1 g/L (voir Tableau 27). Il est donc possible de prédire qu'une fermentation malolactique a eu lieu pour cette cuve.

A la comparaison des teneurs initiales et finales en acide malique, on peut en conclure que l'achèvement d'une fermentation malolactique pour les cidres à distiller est fortement dépendant de la taille des cuves utilisées. Des cuves de grandes dimensions permettront une consommation complète de l'acide malique pouvant être expliquée par une température interne des cuves relativement importante. A l'inverse, la fermentation malolactique pourra ne pas avoir lieu ou être très tardive, et ce de manière régulière, pour des cuves de plus petites dimensions dont le contenu est soumis plus facilement à des températures faibles au début du procédé d'élaboration du cidre (automne-hiver).

#### *Vitesse de consommation de l'acide malique*

A l'instar de l'avancement de la fermentation alcoolique, l'avancement d'une fermentation malolactique peut être vu au travers de plusieurs phases de consommation en acide malique. Néanmoins, pour cette étude un suivi aussi précis s'est avéré être impossible à réaliser en raison :

- de la fréquence des prélèvements *versus* la rapidité de la fermentation. Plusieurs points de prélèvements manquent entre le début et la fin du processus de consommation de l'acide malique. Prenons pour exemple la cuve artisanale la deuxième année : le point à 2 jours correspond à la teneur initiale en acide malique et le point suivant (à 15 jours) à une consommation quasi-achevée (95% de la teneur initiale consommée).
- Du fait qu'avec si peu de points exploitables, il est réellement difficile d'estimer des consommations intermédiaires dans le cas d'un découpage en 3 ou 4 phases.

Il nous a ainsi paru plus judicieux de représenter l'état de la fermentation malolactique par :

- le nombre de jours durant lesquels la concentration d'acide malique initiale reste constante,



- le nombre de jour nécessaires pour atteindre la concentration en acide malique résiduelle.

Le Tableau 28, synthétise ces deux durées permettant d'évaluer la vitesse de consommation en acide malique pour les cuves étudiées. Ces durées sont comparées à celles recalculées à partir de données retrouvées dans la littérature pour des cidres de consommation espagnols et normands.

Tableau 28 : Déroulement (durées en jours) de la fermentation malolactique dans les cuves étudiées et dans la littérature

production	Type de fermentation alcoolique	Chronologie des fermentations	Durée de la phase de latence	Durée approximative de passage de la teneur initiale à une teneur inférieure à 0,1 g/L en acide malique
Artisan AOC 1	Naturelle	(Séquentielle)	122	> 55
Fermier PA 1	Naturelle		> 199	
Industriel AOC 1	Naturelle	Simultanées	1	14
Industriel PA 1	Naturelle	Simultanées	2	12
Artisan AOC 2	Naturelle	Simultanées	2	22
Fermier PA 2	Naturelle		> 226	
Industriel AOC 2	Naturelle	Simultanées	4	19
Industriel PA 2	Naturelle	Simultanées	2	19
(del Campo G. <i>et al.</i> 2003)	Naturelle	Simultanées	34	30
	Naturelle	Simultanées	14	50
	Naturelle	Simultanées	< 14	20
(Laplace J-M. <i>et al.</i> 1998)	Naturelle		140	
	Naturelle	Séquentielles	125	15
(Herrero M. <i>et al.</i> 1999 a)	Contrôlée	Séquentielles	2	25
	Contrôlée	Séquentielles	1	17
	Contrôlée	Séquentielles	1	21
(Herrero M. <i>et al.</i> 1999 c)	Contrôlée	Simultanées	1	9
	Contrôlée	Simultanées	1	33

A part les deux cuves fermières pour lesquelles la teneur en acide malique est restée stable au cours du procédé d'élaboration, les 6 autres cuves étudiées ont enregistré une forte consommation de l'acide malique. La cuve artisanale lors de la première année doit néanmoins être distinguée des autres car une consommation partielle a été observée et elle s'est étalée sur de nombreuses

semaines. Une fréquence de prélèvements plus serrée aurait vraisemblablement permis de mettre en évidence une réelle consommation d'acide malique.

Pour les 5 autres cuves, le passage de la teneur initiale à une quantité résiduelle (inférieure à 0,1 g/L) a été très rapide s'effectuant environ en une douzaine de jours pour la plus dynamique (cuve industrielle AOC la 1<sup>ère</sup> année) et en une petite vingtaine de jours pour la plus lente (cuve artisanale AOC la 2<sup>ème</sup> année). Cette consommation a débuté aussi très rapidement, quasiment dès la mise en cuve. Des phases de latence très courtes ont en effet été observées ; elles s'échelonnent de 1 (cuve industrielle « AOC » la première année) à 4 jours (cuve industrielle « AOC » la deuxième année). A l'image de la fermentation alcoolique, cette fermentation de l'acide malique est tout aussi rapide, puisque en moins de 15 jours, plus de 75% de l'acide malique initial est consommée.

Dans la littérature, des vitesses de consommation très différentes ont pu être observées selon la façon de mener la fermentation alcoolique et/ou la fermentation malolactique (contrôlées ou spontanées) pour élaborer un cidre de consommation (voir Tableau 28).

Dans le cas de fermentations naturelles, la fermentation malolactique peut être simultanée ou séquentielle vis-à-vis de la fermentation alcoolique. Les travaux de Laplace *et al.* (Laplace J-M. *et al.* 1998) ont montré qu'une fermentation malolactique séquentielle pouvait être très rapide et s'achever en seulement 15 jours après pourtant 125 jours de mise en cuve du cidre dédié à la consommation. Dans le cas de fermentations simultanées, la concentration en acide malique initiale peut être conservée entre une dizaine de jours et 5 semaines et la décroissance en acide malique peut durer entre 20 et 50 jours.

Dans le cas de fermentations contrôlées, la fermentation malolactique peut être menée soit en même temps que la fermentation alcoolique soit après complétion de cette dernière. Dans les deux cas, la concentration initiale en acide malique peut être conservée pendant un délai très court (1 à 2 jours seulement). La vitesse de consommation est très variable et la durée de consommation de l'acide malique peut s'étaler sur 9 à 33 jours quelque soit la chronologie des deux fermentations (voir Tableau 28).

En conclusion, par comparaison avec la littérature pour des fermentations spontanées, on peut considérer dans le cas des cidres à distiller normands que la phase qui précède la fermentation malolactique est très rapide (de 1 à 4 jours) et qu'elle se rapproche des durées observées pour des fermentations contrôlées. De plus la phase de consommation de l'acide malique est aussi très rapide (de 12 à 22 jours) si on la compare à d'autres fermentations naturelles (de 15 à 50 jours).

La Figure 9 représente de manière synthétique la chronologie des deux fermentations sur les 8 cuves de cidres étudiées : cette représentation montre clairement que c'est seulement quelques jours après le début de la fermentation alcoolique que débute la fermentation malolactique. Lorsqu'elle a lieu, elle peut se terminer avant que la dernière phase de la fermentation soit atteinte ou tout juste en début de cette même phase.

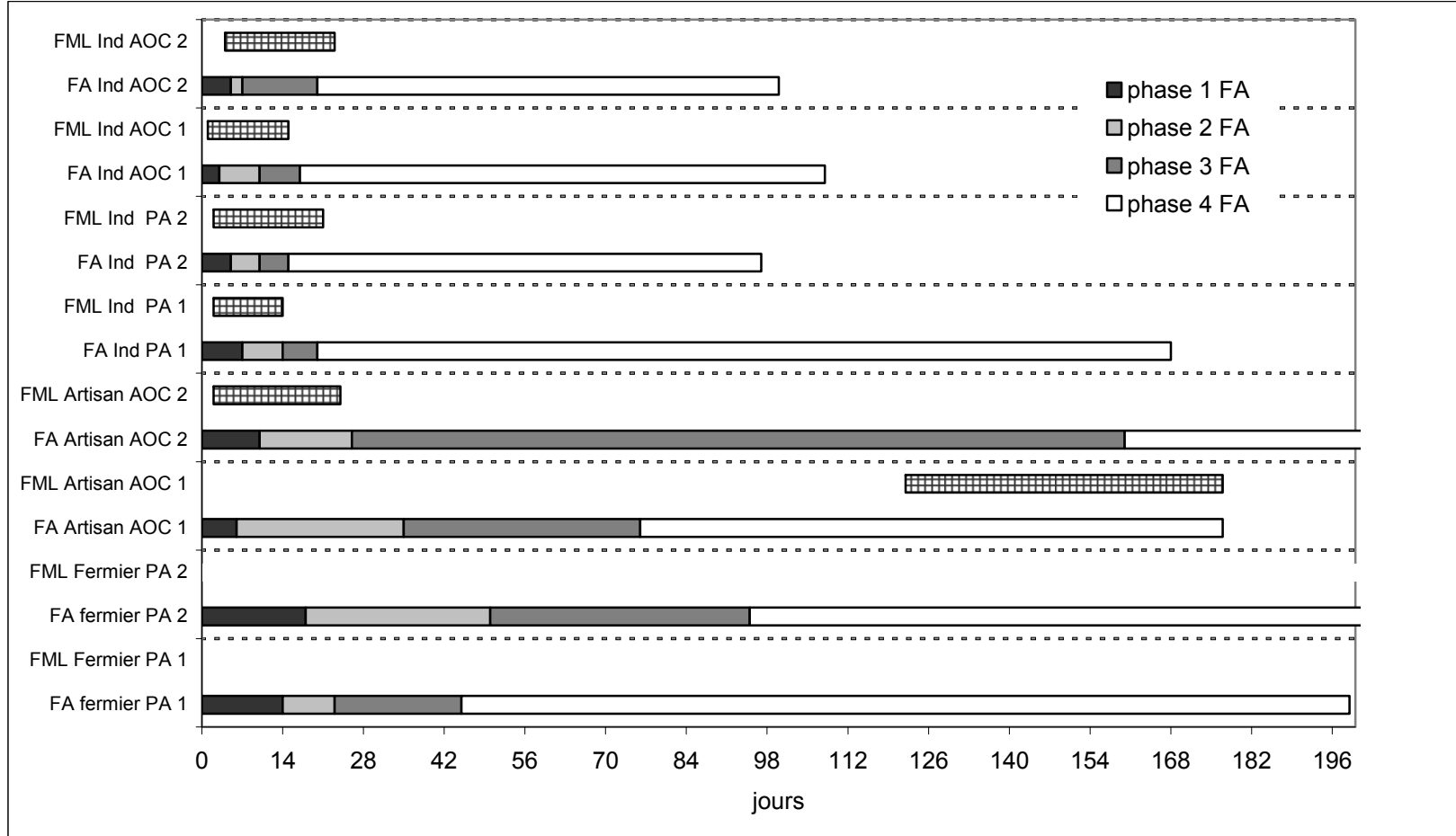


Figure 9 : Représentation de la chronologie des deux fermentations pour chaque cuve

### 22.3. L'acide lactique

Après avoir observé la consommation d'acide malique, nous allons analyser la production d'acide lactique. S'il n'y a pas d'autres réactions biochimiques annexes à cette fermentation malolactique, la teneur en acide lactique devrait augmenter d'après le même modèle de vitesse que l'acide malique est consommé. Si ce n'est pas le cas, c'est que l'acide lactique produit est consommé, entraînant une piqure lactique.

#### *Concentration produite d'acide lactique*

Pour attester de la tenue d'une fermentation malolactique, une consommation d'acide malique doit être corrélée avec une apparition d'acide lactique. Dans ce paragraphe nous étudierons la présence de cet acide dans le moût initial et dans le moût final.

Tableau 29 : Teneurs initiales et finales en acide lactique mesurées pour les cuves étudiées et comparaison à celles issues de la littérature observées dans des cidres

Teneurs en acide lactique (g/L) dans des cidres		
production	Après mise en cuve	En fin d'élaboration
Artisan AOC 1	0,4	2,5
Fermier PA 1	2,4	2,7
Industriel AOC 1	1,4	4,2
Industriel PA 1	0,8	3,6
Artisan AOC 2	0,8	6,0
Fermier PA 2	1,1	2,9
Industriel AOC 2	0,2	4,6
Industriel PA 2	0,1	4,0
(Picinelli A. <i>et al.</i> 2000)		Entre 3,2 et 4,4
(Cabranes C. <i>et al.</i> 1996)		Entre 2,5 et 4,6
(del Campo G. <i>et al.</i> 2003)	0,0	Entre 2,2 et 2,4
(Laplace J-M. <i>et al.</i> 1998)	0,0	1,94
(Herrero M. <i>et al.</i> 1999 a)	0,7	Entre 1,8 et 2,5
(Herrero M. <i>et al.</i> 1999 c)	1,1	Entre 2,2 et 2,5

Les concentrations déterminées en acide lactique dans les moûts de cidre initiaux sont comprises entre 0,4 et 2,4 g/L pour la première année et entre 0,1 et 1,1 g/L pour la deuxième année. Ces valeurs se rapprochent de celles observées dans la littérature pour plusieurs cidres espagnols (voir Tableau 29) pour lesquelles des teneurs de 1,1 g/L ont pu être détectées. La cuve fermière se

distingue néanmoins la première année avec une concentration très élevée (2,4 g/L) dès la mise en cuve du moût non fermenté.

Si on exclut la cuve artisanale pour la deuxième année, les concentrations en acide lactique rencontrées dans le cidre à distiller (comprises entre 2,5 et 4,6 g/L) sont finalement assez proches de celles déterminées pour des cidres de consommation espagnols (comprises entre 1,8 et 4,6 g/L).

Les cuves fermières où une consommation d'acide malique n'a pas été observée proposent les productions d'acide lactique les plus faibles (comprises entre 0,3 et 1,8 g/L) entre le moût initial et le cidre à distiller. La cuve artisanale la première année voit sa concentration en acide lactique progresser de 2,1 g/L pour une consommation en acide malique de l'ordre de 1,9 g/L (Tableau 25). Pour les cuves industrielles les quantités produites en acide lactique sont comprises entre 2,8 g/L et 4,4 g/L. Une augmentation de 4,4 g/L en acide lactique peut paraître importante pour la cuve industrielle AOC la 2<sup>ème</sup> année ; il faut néanmoins ajouter que cette cuve était celle possédant la teneur initiale en acide malique la plus élevée (3,7 g/L).

La cuve artisanale de la 2<sup>ème</sup> année est celle qui propose la production en acide lactique la plus spectaculaire (de l'ordre de 5,2 g/L). Le cidre à distiller est extrêmement riche en acide lactique (6 g/L) alors que la teneur initiale en acide malique étant relativement moyenne pour cette cuve (2 g/L). On peut penser que le cidre contenu dans cette cuve ait subi une dérive fermentaire de type « piqûre lactique » (Claisse O. *et al.* 2000). Cette maladie assez courante pour les cidres se caractérise par une production d'acide lactique en excès accompagnée d'une production importante en acide acétique. Une augmentation très significative de la teneur en acide acétique a été observée pour cette cuve (données non montrées). Les bactéries lactiques ont pu ainsi massivement métaboliser les sucres et inhiber l'activité des levures. Ce phénomène pourrait expliquer l'arrêt de fermentation alcoolique observé pour cette cuve.

#### *Evolution de la concentration en acide lactique*

La cuve artisanale de la 2<sup>ème</sup> année n'est pas la seule à avoir enregistré une forte accumulation d'acide lactique. La cuve industrielle AOC (1<sup>ère</sup> année) a enregistré une concentration en acide lactique proche des 7 g/L au 22<sup>ème</sup> jour juste après consommation totale de l'acide malique (Tableau 26 et Tableau 27). Néanmoins, l'excès d'acide lactique libéré dans le milieu semble avoir été

lentement et régulièrement métabolisé par la suite pour atteindre une concentration moyennement élevée de 4,2 g/L dans le cidre à distiller. De façon générale, pour les cuves où une consommation totale d'acide malique a été observée, une production d'acide lactique supérieure au potentiel de transformation en acide malique a été enregistrée. Après consommation totale de l'acide malique, excepté pour la cuve artisanale la 2<sup>ème</sup> année, la quantité d'acide lactique a eu tendance à diminuer jusqu'à l'étape de distillation.

#### **22.4. Conclusion**

Une forte diversité caractérise les cidres à distiller normands. Dans notre étude, pour les productions à petite échelle étudiées ici (fermière par exemple), les cidres à distiller ont tendance à ne pas subir de fermentation malolactique. La fermentation alcoolique y est généralement longue et peut s'étaler sur plusieurs mois. Les cuves sont relativement petites (environ 800 hL) ce qui tend à les rendre fortement dépendantes des conditions climatiques extérieures.

Les cuves industrielles étudiées, de contenances généralement plus importantes, entraînent des modifications très rapides du goût non fermenté. Les fermentations alcooliques sont achevées en moins de deux mois et sont accompagnées (fermentations simultanées) d'une fermentation malolactique elle-même très rapide (moins d'un mois).

Une production artisanale a été aussi étudiée au cours de ce travail ; elle s'est révélée être peu répétable d'une année sur l'autre avec un début de fermentation malolactique très tardif la 1<sup>ère</sup> année et une apparition de cette transformation très rapide la 2<sup>ème</sup> année. Pour les deux années, la consommation des sucres n'a pu être achevée à cause possiblement d'une activité très forte des bactéries lactiques.

Après cette étape de caractérisation des fermentations pouvant avoir lieu au cours de l'élaboration des cidres à distiller normands, nous avons voulu vérifier leur impact sur la composition volatile.

## **23. Caractérisation de la composition volatile des cidres à distiller**

### **23.1. Comparaison de la composition volatile dans le moût et le jus mûré**

#### *Composition volatile des moûts de pommes et des cidres à distiller*

Les moûts de pommes non fermentés sont relativement peu riches en composés volatils (voir Tableau 30). Ils sont dominés par la présence de 5 composés principaux : le 2-phényléthanol, les isopentanol, l'acétoïne, l'hexanol et le butanol qui ont été retrouvés dans tous les premiers prélèvements des 8 cuves étudiées (aires relatives moyennes comprises entre 3,00 et 6,03). Il est aussi à noter que le lactate d'éthyle, l'isobutanol, la diacétone, le 3-hydroxybutanoate d'éthyle et l'alcool benzylique ont été retrouvés pour leur part dans 7 des 8 moûts. Néanmoins, leur proportion semble très faible si on s'en tient aux moyennes d'aires relatives retrouvées (comprises entre 0,12 et 0,59). Les composés volatils majeurs des moûts de pommes sont retrouvés pour la plupart dans le cidre à distiller. Ce dernier possède, de plus, une proportion de composés volatils beaucoup plus importante mais aussi une plus forte complexité. En effet, 19 composés volatils ont été détectés dans 7 des 8 échantillons avant distillation pour des aires relatives qui peuvent varier entre 0,25 et 178 (voir Tableau 30).



Tableau 30 : moyennes des aires relatives trouvées pour le premier et le dernier prélèvement de toutes les cuves étudiées

	moyenne AR du premier prélèvement	nbre cuves détectées	moyenne AR du dernier prélèvement *	nbre cuves détectées	penne #
2-phényléthanol	6,03	8	183,81	8	177,78
isopentanol	4,52	8	114,32	8	109,80
acide acétique	0,00	0	100,20	7	100,20
lactate d'éthyle	0,58	7	98,15	8	97,57
succinate de monoéthyle	0,00	0	73,69	5	73,69
2-(4-hydroxyphényl)éthanol	0,03	1	19,89	8	19,86
isobutanol	0,55	7	12,14	8	11,59
acétoïne	5,71	8	16,93	7	11,22
succinate d'éthyle	0,00	0	9,57	7	9,57
4-éthylphénol	0,01	2	7,16	7	7,15
acide hexanoïque	0,00	1	2,10	7	2,10
acide propanoïque	0,14	1	2,14	4	2,00
4-éthyl guaiacol	0,01	3	1,91	8	1,90
hexanol	5,03	8	6,90	8	1,87
butanol	3,00	8	4,38	8	1,38
acétate de 2-phényl éthyle	0,09	4	1,41	8	1,32
acide butanoïque	0,00	0	1,31	6	1,31
acétate d'hexyle	0,52	4	1,82	2	1,30
acide 2-méthylbutanoïque	0,00	0	1,22	6	1,22
méthionol	0,25	5	1,28	7	1,03
acide octanoïque	0,00	1	0,93	7	0,93
alcool benzylique	0,12	7	0,91	8	0,79
acide isobutyrique	0,05	1	0,64	5	0,59
eugénol	0,01	2	0,55	6	0,54
3-hydroxybutanoate d'éthyle	0,32	7	0,76	6	0,44
octanoate d'éthyle	0,05	2	0,39	7	0,35
acétate de 3-méthylbutyle	0,03	5	0,35	5	0,32
décanoate d'éthyle	0,01	2	0,32	5	0,31
propanol	0,05	4	0,36	5	0,31
succinate d'éthyle et de 3-méthylbutyle	0,00	0	0,31	6	0,31
décanol	0,12	6	0,36	8	0,25
octanol	0,17	3	0,35	5	0,18
hexanoate d'éthyle	0,00	2	0,15	5	0,14
3-hydroxyocténoate d'éthyle	0,07	4	0,15	6	0,08
terpène	0,02	0	0,09	5	0,07
dodécanoate d'éthyle	0,00	1	0,07	4	0,06
2-éthylhexanol	0,02	2	0,08	4	0,06
acide decanoïque	0,00	1	0,04	3	0,03
hexanoate de 2-phényléthyle	0,03	1	0,05	2	0,03
tétradécanoate d'éthyle	0,01	1	0,04	4	0,03
2-méthylthioéthanol	0,01	2	0,03	3	0,02
4-vinylguaiacol	0,00	1	0,02	2	0,01
pentanol	0,08	5	0,09	5	0,01
pent-3-èn-2-ol	0,01	1	0,02	2	0,00
dodécanol	0,07	2	0,07	3	0,00
octanoate de 2-phényléthyle	0,04	1	0,00	0	-0,04
hexan-3-ol	0,22	2	0,03	2	-0,19
E-hex-3-èn-1-ol	0,28	4	0,03	2	-0,25
diacétone	0,59	7	0,30	6	-0,29

\* Dernier prélèvement de chaque cuve sauf pour la cuve artisanale la 1<sup>ère</sup> année (données issues du prélèvement à la 16<sup>ème</sup> semaine avant consommation d'acide malique)

# penne dont la valeur correspond à la moyenne des aires relatives du dernier prélèvement soustraite de la moyenne des aires relatives du premier prélèvement

### *Comparaison de la composition initiale et finale des cidres à distiller*

De fortes différences de production de composés volatils ont pu être observées entre le moût initial et le cidre à distiller. Elles sont les témoins du fort impact des fermentations sur la composition volatile finale. Pour chaque composé une pente a été calculée, elle correspond à la différence d'aire relative moyenne entre le dernier et le premier échantillon. Les composés volatils ont ensuite été classés dans un ordre décroissant des valeurs de pentes obtenues. Ces pentes sont directement reliées à la réponse des composés (aires relatives) sur le matériel analytique utilisé (CPG/SM) et suivant leur taux de récupération après Extraction sur Phase Solide. Elles ne peuvent donc pas être directement comparées les unes aux autres. Néanmoins, de très nettes différences de pentes en aires relatives (d'un facteur au moins 10) expriment de nettes différences d'apparition ou de disparition de composés volatils entre le jus de pommes en sortie-presse et le cidre à distiller.

Une pente négative (comme celles rencontrées pour l'octanoate de 2-phényléthyle, l'hexan-3-ol, le *E*-hex-3-èn-1-ol et la diacétone) permet de visualiser une perte de teneur moyenne entre le moût non fermenté et le cidre à distiller. Il est cependant à noter que seul le cas de la diacétone peut être considéré comme une réelle décroissance, car les trois autres composés ont été détectés dans trop peu d'échantillons.

Nous pouvons aussi conclure qu'une dizaine de composés augmentent en moyenne très fortement leur concentration entre les deux prélèvements étudiés (voir case grisée sur le Tableau 30). Si on considère un cidre « moyen » normand issus de productions aussi variées que fermière, artisanale et industrielles et pouvant avoir réalisé ou non une fermentation malolactique, alors, on peut pointer que 5 composés voit leur proportion augmenter très fortement (2-phényléthanol, isopentanol, acide acétique, lactate d'éthyle, succinate de monoéthyle) et 5 autres augmenter fortement (2-(4-hydroxyphényl)éthanol, isobutanol, acétoïne, succinate d'éthyle, 4-éthylphénol). Les conditions d'apparition de ces composés sont très diverses. Le 2-phényléthanol et les isopentanol marquent une prédominance de la fermentation alcoolique car ils sont susceptibles au même titre que l'isobutanol de provenir du métabolisme des levures sur les acides aminés et/ou les sucres (Ribereau-Gayon J. *et al.* 1975). A l'inverse, plusieurs composés pourraient provenir du métabolisme des bactéries lactiques (acide acétique, lactate d'éthyle,

succinate d'éthyle, succinate de monoéthyle, acétoïne). Le 4-éthylphénol, pour sa part, peut être le témoin de l'activité de souches de type *Brettanomyces anomala* ou *Lactobacillus collinoides* (Buron N. *et al.* 2011). Comme nous pouvons le voir ces chiffres ne permettent pas néanmoins d'expliquer la contribution individuelle de la fermentation alcoolique ainsi que celle de la fermentation malolactique.

*Apport de la fermentation malolactique sur la composition volatile finale des cidres à distiller*

Afin de vérifier l'apport de la fermentation malolactique, seules, les cinq cuves (les 4 cuves industrielles et la cuve artisanale de la deuxième année) pour lesquelles ce type de transformation a eu lieu ont été étudiées. Suivant le même principe que précédemment, une aire relative moyenne a été calculée pour chaque composé et ce, pour le premier prélèvement et pour le dernier prélèvement avant distillation (voir Tableau 31). La pente calculée (pente FML du Tableau 31) permet de visualiser les composés dont la proportion a diminué (valeur négative) et ceux dont la proportion a à l'inverse fortement augmentée (valeur positive très élevée) pendant les procédés d'élaboration ou une fermentation malolactique a eu lieu. Cependant, cette valeur de pente peut être difficilement discutée car il s'agit pour toutes les cuves de fermentations alcoolique et malolactique simultanées. Elle reflète ainsi l'effet cumulé des deux fermentations. Afin d'accéder à l'effet individuel de la fermentation malolactique pour un composé volatil donné, la pente obtenue pour ces 5 cuves a été divisée par celle obtenue pour l'ensemble des cuves (Tableau 30). Plusieurs cas de figures sont alors envisageables :

1/ les pentes obtenues sont toutes les deux positives (cas de figure le plus courant), les valeurs situées au-dessus de 1 traduisent un apport supplémentaire de la fermentation malolactique. A l'inverse, toutes les valeurs situées en-dessous de 1 reflètent une perte due à la présence d'une FML.

2/ la pente obtenue en Tableau 2 est positive alors que celle obtenue en Tableau 1 est négative. Il y a systématiquement apport de la FML. Il est à noter qu'aucun composé n'appartient à ce cas de figure.

3/ la pente obtenue en Tableau 2 est négative alors que celle obtenue en Tableau 1 est positive. Il y a systématiquement perte à cause de la FML.

4/ les deux pentes sont toutes les deux négatives. Si la valeur est comprise entre 0 et 1, il y a apport de la FML et pour les valeurs supérieures à 1, il y a perte due à la FML.

Dans le Tableau 31, seuls les composés détectés dans plus de 2 échantillons ont été présentés. Le 2-éthylhexanol n'a été détecté que dans les cidres à distiller de 4 cuves ayant réalisés une fermentation malolactique. Néanmoins, sa faible teneur dans le produit final (aire relative de 0,12) fait qu'il est difficile à utiliser comme témoin de cette transformation dans les cidres à distiller. Les meilleurs marqueurs de la fermentation malolactique des cidres à distiller semblent être majoritairement des acides carboxyliques et des dérivés d'acides organiques. Nos résultats tendent en effet à montrer une forte production d'acides acétique, propanoïque, 2-méthylpropanoïque (isobutyrique), 2-méthylbutanoïque, hexanoïque et octanoïque (valeur d'effet toutes comprises entre 1,17 et 1,53).

Les esters succiniques (succinate de diéthyle et succinate d'éthyle et de 3-méthylbutyle) ainsi que le lactate d'éthyle peuvent être considéré comme de très bons témoins de la fermentation malolactique (valeurs d'effet comprises entre 1,27 et 1,43). Ces 3 composés ont été détectés systématiquement dans tous les cidres à distiller à des niveaux relativement importants. Ils dérivent des deux principaux acides organiques (lactique et succinique) produits lors de la consommation d'acide malique ou d'acide citrique par les bactéries lactiques (Lilly M. *et al.* 2000). La forte accumulation d'acide lactique observée pour les cuves ayant réalisé une fermentation malolactique (voir Tableau 28) est ainsi corrélée à une plus forte présence de son ester correspondant, le lactate d'éthyle, dans le produit final.

Cette classification a permis de regrouper naturellement le méthionol, l'isobutanol, les isopentanol et le 2-phényléthanol (voir Tableau 31). Les valeurs d'effet comprises entre 1,06 et 1,15 témoignent néanmoins d'une faible action de la fermentation malolactique et donc des bactéries lactiques sur leur concentration dans le cidre à distiller. Leur présence dans la partie supérieure du tableau pourrait aussi traduire un effet de la production car 4 des 5 cuves ayant

réalisée une fermentation malolactique appartiennent au groupe des cuves industrielles.

Tableau 31 : moyennes des aires relatives trouvées pour le premier et le dernier prélèvement des cuves pour lesquelles une fermentation malolactique a eu lieu

	moyenne AR du premier prélèvement	nbre cuves détectées	moyenne AR du dernier prélèvement *	nbre cuves détectées	pente FML #	effet FML
2-éthylhexanol	0,02	1	0,12	4	0,11	1,75
acide propanoïque	0,23	1	3,29	3	3,06	1,53
succinate d'éthyle et de 3-méthylbutyle	0	0	0,44	5	0,44	1,43
hexanoate d'éthyle	0	1	0,21	3	0,2	1,41
octanol	0,27	3	0,51	3	0,24	1,37
alcool benzylique	0,14	4	1,2	5	1,07	1,34
acide octanoïque	0	1	1,25	5	1,25	1,34
acide acétique	0	0	130,52	5	130,52	1,3
succinate d'éthyle	0	0	12,43	5	12,43	1,3
acide 2-méthylbutanoïque	0	0	1,56	5	1,56	1,27
acide hexanoïque	0	1	2,67	5	2,67	1,27
lactate d'éthyle	0,85	4	124,66	5	123,81	1,27
dodécanoate d'éthyle	0,01	1	0,08	3	0,08	1,21
2-méthylthioéthanol	0	1	0,03	2	0,03	1,19
acide isobutyrique	0,09	1	0,77	4	0,69	1,17
méthionol	0,26	3	1,44	5	1,18	1,15
isobutanol	0,36	4	13,44	5	13,08	1,13
isopentanol	3,85	5	124,83	5	120,97	1,1
2-phényléthanol	3,07	5	192,18	5	189,12	1,06
octanoate d'éthyle	0,07	2	0,44	5	0,37	1,06
terpène	0,03	1	0,11	3	0,08	1,01
décanoate d'éthyle	0,02	2	0,32	3	0,31	0,99
acide butanoïque	0	0	1,29	4	1,29	0,98
décanol	0,19	4	0,43	4	0,24	0,98
3-hydroxyocténoate d'éthyle	0,11	3	0,18	4	0,08	0,94
4-éthyl guaiacol	0,02	2	1,78	5	1,77	0,93
propanol	0,07	2	0,35	3	0,28	0,92
4-éthylphénol	0,01	1	6,53	5	6,51	0,91
acétate de 2-phényl éthyle	0,11	3	1,24	5	1,13	0,85
eugénol	0,02	2	0,47	4	0,46	0,85
2-(4-hydroxyphényl)éthanol	0,04	1	16,43	5	16,39	0,83
3-hydroxybutanoate d'éthyle	0,49	4	0,85	3	0,36	0,82
succinate de monoéthyle	0	0	58,56	3	58,56	0,79
acétate de 3-méthylbutyle	0,05	3	0,29	4	0,24	0,75
acétoïne	6,39	5	11,51	4	5,13	0,46
butanol	4,32	5	4,89	5	0,56	0,41
hexanol	7,03	5	7,53	5	0,5	0,27
tétradécanoate d'éthyle	0,02	1	0,02	2	0	0,01
acétate d'hexyle	0,82	3	0,01	1	-0,82	-0,63
pentanol	0,11	2	0,04	2	-0,07	-8,59
dodécanol	0,11	2	0,07	2	-0,04	-67,85
diacétone	0,93	5	0,36	3	-0,56	1,95
E-hex-3-èn-1-ol	0,41	3	0,01	1	-0,4	1,59

\* Dernier prélèvement de chaque cuve où une fermentation malolactique a eu lieu soit les cuves industrielles pour les deux années et la cuve artisanale pour la seconde année.

# Pente dont la valeur correspond à la moyenne des aires relatives du dernier prélèvement soustraite de la moyenne des aires relatives du premier prélèvement.

^ Rapport des pentes, pente de la fermentation malolactique sur la pente obtenue pour toutes les cuves (Tableau 30).

*Apport d'une fermentation alcoolique non accompagnée d'une fermentation malolactique sur la composition finale des cidres à distiller*

Dans les cidres, plusieurs types de microorganismes semblent être à l'origine de l'apparition de phénols volatils. *Lactobacillus collinoides* (bactérie) et *Brettanomyces anomala* (levure) sont susceptibles de les produire en grande quantité (Buron N. *et al.* 2011). Au cours de cette étude, les valeurs d'effets de 0,93 et 0,91 (voir Tableau 31) respectivement pour le 4-éthylguaïacol et le 4-éthylphénol tendent à prouver (i) que leur origine est bien commune et (ii) qu'une fermentation alcoolique non accompagnée d'une fermentation malolactique permettrait d'en retrouver un peu plus dans le produit final. La présence d'eugénol et de 2-(4-hydroxyphényl)éthanol est sans à rapprocher de celle du 4-éthylphénol et du 4-éthylguaïacol.

Les acétates de 3-méthylbutyle et de 2-phényléthyle sont reconnus pour conférer au cidre des notes aromatiques de « banane » et de « rose » (Xu Y. *et al.* 2007). Leur concentration est plus importante dans les cidres à distiller n'ayant pas réalisé de fermentation malolactique (valeurs d'effet de 0,85 et 0,75). Ce phénomène peut être expliqué par l'activité estérase de certaines bactéries lactiques (Matthews A. *et al.* 2007) impliquées dans la transformation de l'acide malique. Il est à noter que l'acétate d'hexyle, malgré sa faible significativité (peu d'échantillons dans lesquels il a pu être détecté) est aussi classé parmi les composés susceptibles d'être dégradé pendant le processus de FML.

Alors que le succinate de diéthyle et le succinate d'éthyle et de 3-méthylbutyle sont apportés en plus grande proportion grâce à une fermentation malolactique, le succinate de monoéthyle est à l'inverse plutôt rencontré lors d'une fermentation alcoolique seule (valeur d'effet de 0,75). Il est à noter que l'acide succinique qui est à la base de ces trois composés apparaît dans les cidres par les bactéries lactiques mais aussi par certaines souches de levures. Le pH plus faible pouvant être rencontré dans les cidres n'ayant pas opéré de fermentation malolactique pourrait expliquer une transformation plus importante de l'acide succinique en succinate monoestérifié.

L'acétoïne semble être un très bon témoin d'une fermentation alcoolique non accompagnée d'une fermentation malolactique. Il est possible de penser que l'équilibre acétoïne – diacétyl soit en faveur de ce deuxième composé au détriment de l'acétoïne lors de la fermentation malolactique.

Néanmoins, les meilleurs marqueurs d'une fermentation alcoolique seule sont l'hexanol et le butanol dont les valeurs d'effet sont respectivement de 0,27 et 0,41. Leur présence très éloignée de celle des autres alcools supérieurs (isobutanol et isopentanol) traduit une nette différence d'origine. La fermentation malolactique semble très fortement limiter leur apparition dans le cidre à distiller.

Tableau 32 : Impact de la fermentation malolactique sur la présence de composés volatils dans le cidre à distiller

Composés	Impact de la fermentation malolactique
4-éthylguaiacol	négatif
4-éthylphénol	
eugénol	
2-(4-hydroxyphényl)éthanol	
Acide acétique	<b>positif</b>
Acétoïne	négatif
Diacétone <sup>a</sup>	<b>positif</b>
Acide propanoïque	<b>positif</b>
Acide isobutyrique	
Acide 2-méthylbutanoïque	
Acide hexanoïque	
Acide octanoïque	
Acétate de 3-méthylbutyle	négatif
Acétate de 2-phényléthyle	
Méthionol	Pas de tendance claire
Isobutanol	
Isopentanol	
2-phényléthanol	
2-éthylhexanol	
Hexanol	négatif
Butanol	
Succinate de diéthyle	<b>positif</b>
Succinate d'éthyle et de 3-méthylbutyle	
Lactate d'éthyle	
Succinate de monoéthyle	négatif

Avec <sup>a</sup> : 4-hydroxy-4-méthylpentan-2-one

Si l'on dresse, à ce stade, un premier bilan des changements ayant lieu lors de la fabrication du cidre à distiller, on peut s'apercevoir que les

fermentations ont un impact très fort sur la production de composés volatils. La composition volatile du cidre à distiller est beaucoup plus riche que celle du moût de pommes non-fermenté et elle peut être fortement influencée par la tenue ou non d'une fermentation malolactique. En Tableau 32, plusieurs composés volatils présentant une évolution significative au cours de la fermentation alcoolique ont été recensés. Suivant les valeurs d'effet déterminées précédemment (voir Tableau 31), nous avons pu prédire l'impact de la fermentation malolactique sur la présence de ces composés dans le cidre à distiller. Ainsi, la présence de phénols volatils dans le cidre distiller semble être limitée par le métabolisme des bactéries lactiques car ils se retrouvent en quantité plus importante dans les cidres à distiller n'ayant pas réalisé de FML. *A contrario*, la FML semble favoriser la présence d'acides (organiques et carboxyliques), d'acide acétique, de succinates (de diéthyle et d'éthyle et de 3-méthylbutyle) et de lactate d'éthyle dans le produit avant distillation. A l'inverse, dans l'optique d'une présence plus importante dans le cidre à distiller final, une fermentation alcoolique seule pourrait être favorable pour des composés tels que les acétates (de 3-méthylbutyle et de 2-phényléthyle), l'acétoïne, quelques alcools (hexanol et butanol) et le succinate monestérifié.

### **23.2. Changement de la composition de la matrice**

Nous avons pu voir précédemment qu'une dizaine de composés volatils voyait leur proportion augmenter très fortement entre la mise en cuve du jus de pommes et le cidre à distiller. De plus, quelques-uns de ces composés volatils semblent être plus ou moins affectés par une fermentation malolactique en ce qui concerne leur teneur finale. Néanmoins, une simple comparaison du début et de la fin du procédé peut cacher de fortes différences d'évolution au sein du produit. Par conséquent, nous avons choisi d'étudier leur évolution moyenne dans les cidres à distiller ayant réalisé une fermentation malolactique par comparaison à ceux où cette transformation n'a pas eu lieu. Ces évolutions moyennes seront présentées et discutées suivant les 4 phases de consommation des sucres établies en partie 22.1.



*Evolution des composés volatils pour toutes les cuves étudiées au cours de la fermentation alcoolique*

Une première étape a consisté à sélectionner seulement les composés présentant des évolutions les plus significatives entre les phases 1, 2, 3 et 4 de consommation des sucres pour toutes les cuves étudiées. Cette sélection a été opérée au moyen d'une analyse de la variance (ANOVA) sur les résultats d'aires relatives de la totalité des cuves.

Par conséquent, pour chaque composé, (i) une aire relative moyenne est calculée sur l'ensemble des échantillons et (ii) une aire relative moyenne est calculée pour l'ensemble des échantillons appartenant à une même phase. L'aire relative moyenne pour chaque phase est comparée à la moyenne générale afin de déterminer une valeur test et une probabilité de risque d'erreur. Plus la probabilité est faible et plus elle représente une certitude de différences importantes entre les 4 phases (variation notable). Seuls les composés proposant les probabilités d'erreur les plus faibles (entre 0,000 et 0,001 soit moins de  $1/1000^{\text{ème}}$ ) sont présentés en Tableau 33.

Afin de pouvoir étudier les différences d'évolution suivant l'occurrence ou non d'une fermentation malolactique, pour chaque composé proposant les probabilités les plus faibles, les aires relatives moyennes ont été calculées pour chaque phase et pour chaque type de cuve (fermentation alcoolique seule ou fermentation alcoolique accompagnée d'une fermentation malolactique). Ces valeurs sont exposées en Tableau 33.

Tableau 33 : Aires relatives moyennes\* des composés volatils présentant les variations de concentrations les plus importantes ( $p < 0,001$ ) sur les 4 phases de la fermentation alcoolique. Résultats pour les cuves où une fermentation alcoolique seule a été enregistrée (FA seule) et celle où une fermentation alcoolique est accompagnée d'une fermentation malolactique (FA+FML)

	Moyenne dans la généralité	type de fermentations	Phase 1	Phase 2	Phase 3	Phase 4
2-(4-hydroxyphényléthanol)	8,876	FA seule	3,06	12,68	13,08	19,40
		FA+FML	0,55	2,32	4,66	12,75
2-éthylhexanol	0,041	FA seule	0,01	0,01	0,00	0,02
		FA+FML	0,02	0,00	0,01	0,10
2-méthylthioéthanol	0,033	FA seule	0,01	0,02	0,03	0,02
		FA+FML	0,00	0,00	0,04	0,04
2-phényléthanol	173,97	FA seule	28,87	81,69	150,45	134,42
		FA+FML	38,91	131,22	171,83	197,82
4-éthylguaiacol	1,138	FA seule	0,01	0,05	0,29	1,34
		FA+FML	0,02	0,37	1,18	2,02
4-éthylphénol	4,101	FA seule	0,04	0,51	1,74	4,06
		FA+FML	0,02	0,80	3,73	6,85
acétate de 2-phényléthyle	2,958	FA seule	0,28	2,06	3,39	1,14
		FA+FML	0,77	3,91	7,03	3,22
acide 2-méthylbutanoïque	0,836	FA seule	0,02	0,53	0,80	0,66
		FA+FML	0,00	0,01	0,35	1,86
acide acétique	25,805	FA seule	0,00	1,83	13,37	47,67
		FA+FML	0,00	0,00	1,08	67,42
acide butanoïque	0,766	FA seule	0,00	0,33	0,39	0,88
		FA+FML	0,01	0,03	0,69	1,50
acide hexanoïque	1,452	FA seule	0,14	0,41	0,96	0,94
		FA+FML	0,03	0,12	1,23	2,72
acide isobutyrique	0,404	FA seule	0,00	0,21	0,29	0,31
		FA+FML	0,03	0,00	0,30	0,77
acide octanoïque	0,73	FA seule	0,01	0,16	0,57	0,34
		FA+FML	0,03	0,08	0,88	1,09
alcool benzylique	0,505	FA seule	0,10	0,25	0,41	0,35
		FA+FML	0,10	0,09	0,54	1,10
décanol	0,216	FA seule	0,01	0,09	0,14	0,19
		FA+FML	0,15	0,20	0,17	0,34
eugénol	0,225	FA seule	0,01	0,13	0,06	0,45
		FA+FML	0,03	0,07	0,20	0,39
isobutanol	8,61	FA seule	1,32	2,22	5,64	9,94
		FA+FML	1,71	7,63	8,73	13,02
isopentanol	80,484	FA seule	8,33	17,89	59,23	76,94
		FA+FML	22,73	66,91	74,63	120,71
lactate d'éthyle	60,511	FA seule	1,04	10,07	26,64	37,31
		FA+FML	1,63	16,61	54,43	132,96
méthionol	1,036	FA seule	0,33	0,60	1,08	0,96
		FA+FML	0,30	0,50	0,81	1,39
octanoate d'éthyle	0,447	FA seule	0,03	0,09	0,12	0,28
		FA+FML	0,18	0,68	0,45	0,67
propanol	0,248	FA seule	0,03	0,08	0,16	0,42
		FA+FML	0,04	0,10	0,19	0,43
succinate d'éthyle	3,743	FA seule	0,02	0,63	1,42	4,22
		FA+FML	0,00	0,43	2,16	10,62
succinate d'éthyle et de 3-méthylbutyle	0,124	FA seule	0,00	0,02	0,07	0,07
		FA+FML	0,00	0,01	0,04	0,35

\* en gris valeur maximale d'aire relative moyenne rencontrée pour chaque phase.

Vingt quatre composés volatils varient de façon importante entre les 4 phases de la fermentation alcoolique. Ils tendent tous à progresser de façon importante de la phase 1 (0 à 25% des sucres consommés) à la phase 4 (75 à 100% des sucres consommés).

Les **acides carboxyliques** (acides isobutyrique, butanoïque, 2-méthylbutanoïque, hexanoïque, octanoïque) forment un groupe bien distinct.

Pour les cuves où une fermentation alcoolique seule a eu lieu, leur augmentation est relativement linéaire au cours des 3 premières phases puis tend à fléchir entre les phases 3 et 4 (voir Figure 10). Il est à noter que l'acide butanoïque croît néanmoins de façon continue jusqu'en 4<sup>ème</sup> phase. L'apparition d'acides carboxyliques est par contre plus tardive pour les cuves où une fermentation malolactique a eu lieu. Ces derniers commencent seulement à être générés, mais de façon brusque, entre la phase 2 et la phase 3. Les teneurs finales sont bien supérieures dans ces cuves (voir partie 25.1), car les concentrations tendent à augmenter très fortement en fin de procédé d'élaboration.

Les fermentations malolactique dans ces cuves ont tendance à être rapidement achevées entre la fin de la phase 2 et le début de la phase 4 (voir Figure 9). Il semblerait ainsi que la fermentation malolactique inhibe dans un premier temps la production d'acides carboxyliques. Une fois cette étape réalisée (entre les phases 3 et 4), le milieu devient très favorable à leur apparition. Il est ainsi possible de penser qu'en fin de procédé des réactions d'oxydation puissent avoir lieu.

Nous étudierons par la suite l'évolution des composés volatils grâce à des courbes matérialisant leur niveau de présence pour les 4 phases de la fermentation alcoolique pour d'un côté les cuves où une fermentation malolactique a eu lieu et d'un autre côté les cuves où elle n'a pas eu lieu (Figures 14 à 18). Sur ces graphes les écart-types ont été représentés et peuvent paraître importants. Ils sont dûs au fait que chaque point représente le niveau de présence moyen dans des échantillons pouvant être en début ou en fin de phase (25 à 50% pour la phase 2 par exemple) et pouvant appartenir à un savoir-faire différent (fermier, artisanal ou industriel). Nous avons ici tenté de schématiser un cidre moyen normand ayant ou n'ayant pas réalisé une fermentation malolactique.

Les courbes d'évolution de l'acide acétique (voir Figure 10) sont assez semblables à celles trouvées pour les autres acides carboxyliques. On peut

remarquer que les levures sont peu productrices d'acide acétique en début de fermentation alcoolique (phase 1 à 3). De plus, comme dans le cas des autres acides carboxyliques, l'activité des bactéries lactiques inhibe quasi-totalement la formation d'acide acétique. La forte augmentation en acide acétique en 4<sup>ème</sup> phase peut être due :

- à l'activité de bactéries acétiques (Bartowsky E.J. *et al.* 2008) qui trouvent un terrain favorable après complétion de la fermentation malolactique ou dans une moindre mesure à une réponse au stress (manque de nutriments) des levures.
- A l'activité des bactéries lactiques sur les sucres résiduels.

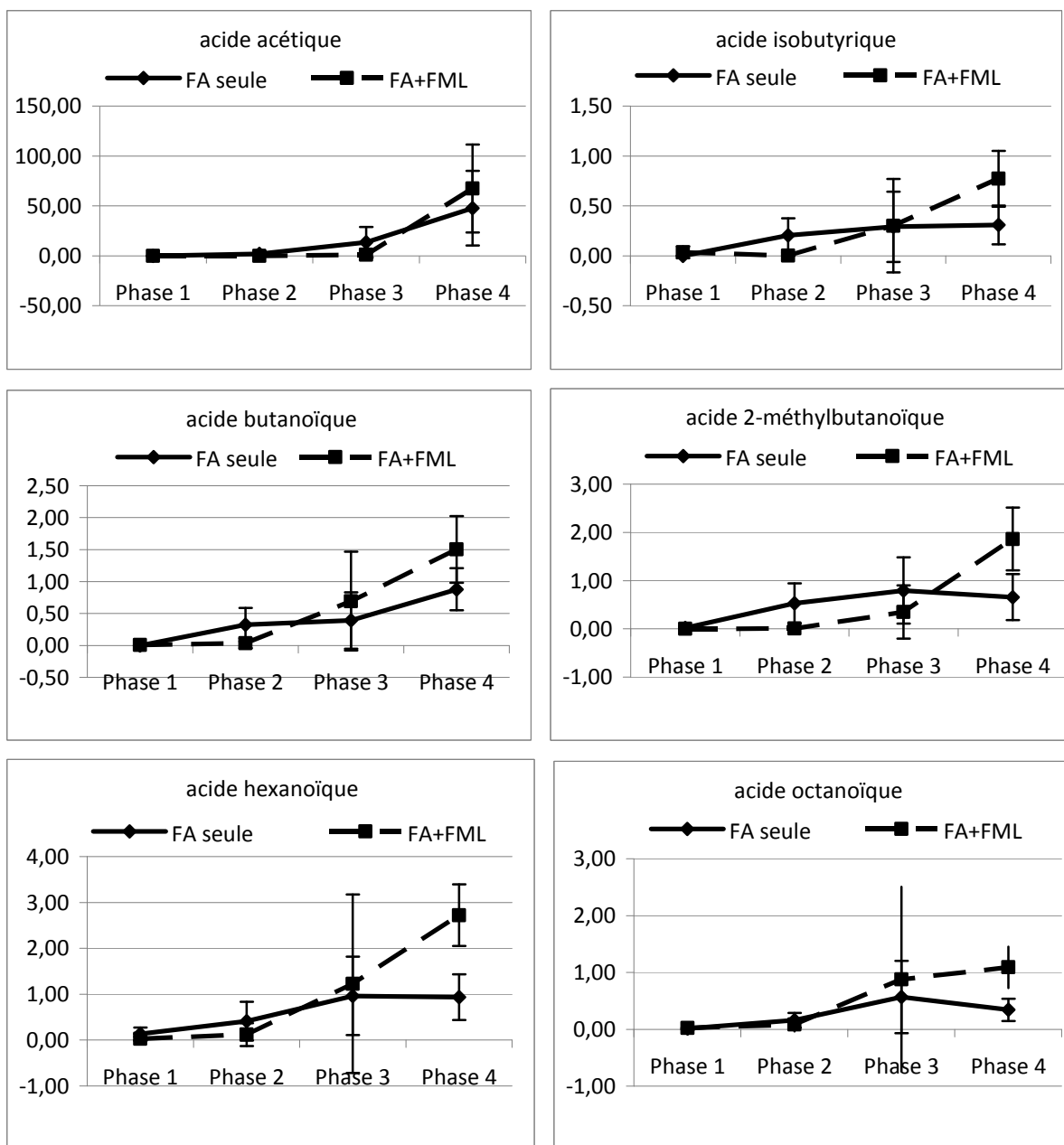


Figure 10 : Représentation de la variation des teneurs moyennes pour les acides carboxyliques en fonction des phases de la fermentation alcoolique (Aire relative moyenne en fonction des phases de la fermentation alcoolique).

Le **propanol**, l'**isobutanol** et les **isopentanols** voient leurs concentrations progresser régulièrement lors de la fermentation alcoolique des cidres à distiller qu'une fermentation malolactique ait lieu ou non (voir Figure 11). Ces composés sont reconnus pour être issus de l'activité des levures par métabolisation des sucres mais aussi des acides aminés : thréonine, valine, leucine et isoleucine (Lambrechts M.G. *et al.* 2000). Cependant, des quantités en isobutanol et isopentanols ont tendance à être plus fortement produites dans le cas où une fermentation malolactique a lieu. Les cuves où une fermentation alcoolique seule

a eu lieu appartenant principalement à un même type de production (fermière) et celle où une fermentation malolactique a été réalisée appartenant quasi-exclusivement à la production industrielle, on peut penser que les différences enregistrées en alcools supérieurs peuvent être dues à un patrimoine différent en levures. Il est même possible de prédire que les levures de type *Saccharomyces*, produisant plus d'alcools supérieurs (Xu Y. *et al.* 2006), sont sans doute plus actives dans les cuves industrielles que dans les cuves fermières. Un fléchissement de la production d'isobutanol et d'isopentanol est néanmoins observé pour les cuves ayant réalisé une fermentation malolactique entre les phases 2 et 3 (voir Figure 11). A ce niveau du processus d'élaboration, l'activité des bactéries lactiques est très forte et cette activité tend sans doute à diminuer l'activité des levures menant la fermentation alcoolique.

Le **2-phényléthanol** et le **méthionol** ont été classés avec les alcools supérieurs en raison de leur origine potentiellement identique. Ils peuvent en effet aussi provenir de la dégradation de deux acides aminés : la phénylalanine et la méthionine (Lambrechts M.G. *et al.* 2000). Leur évolution au cours de la fermentation alcoolique des cidres à distiller est relativement identique à celle de l'isobutanol et des isopentanol (voir Figure 11). Cependant, dans le cas d'une fermentation alcoolique seule, une baisse de leur quantité est observée entre la 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> phase. Ce phénomène pourrait être expliqué par une présence moins importante de phénylalanine et de méthionine pour ces cuves (fermières et artisanale la première année) qui induirait ainsi une limitation de leur apparition après consommation totale de ces deux acides aminés.

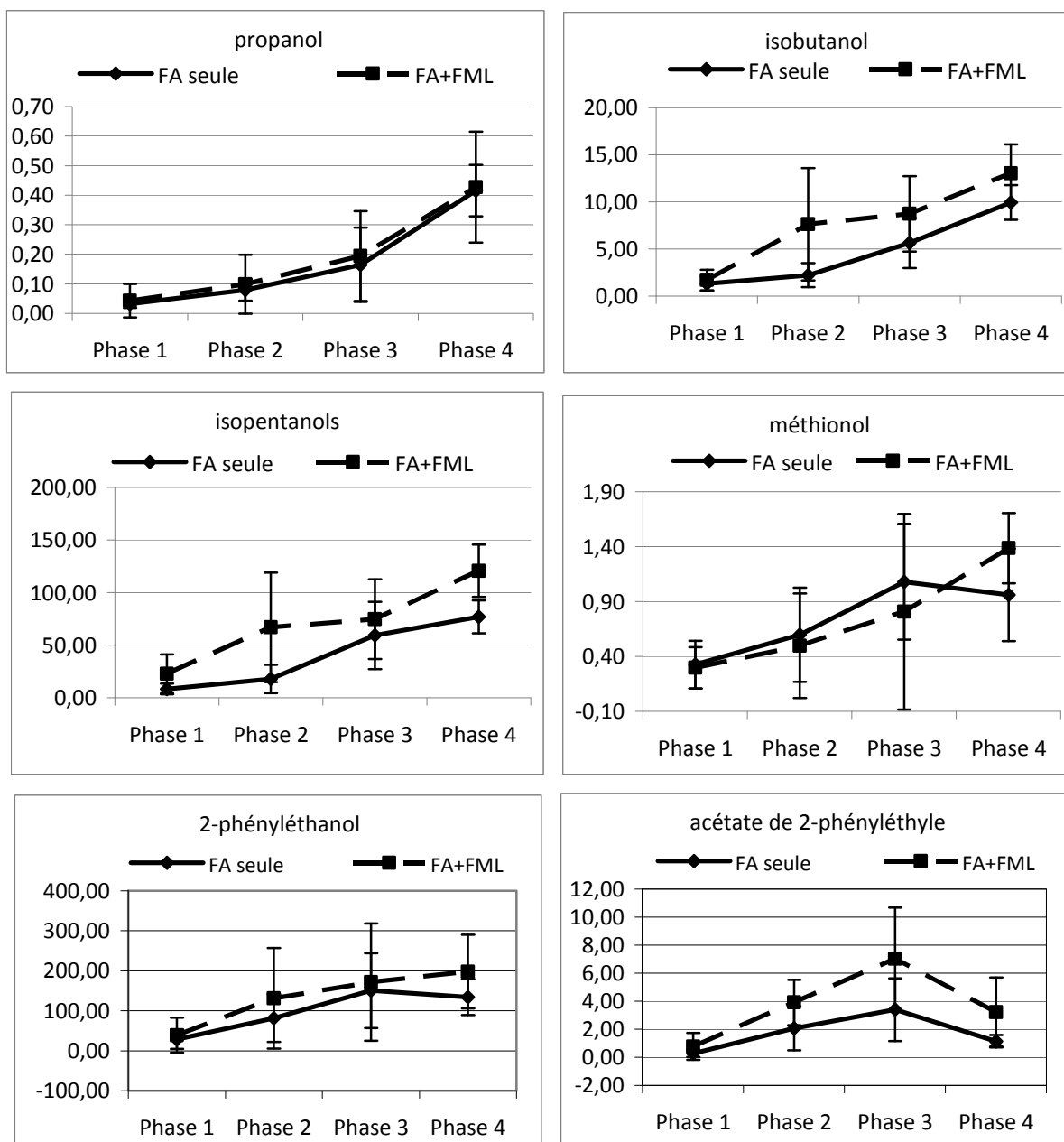


Figure 11 : Représentation de la variation des teneurs moyennes pour les alcools supérieurs, méthionol, 2-phényléthanol et l'acétate de 2-phényléthyle en fonction des phases de la fermentation alcoolique (Aire relative moyenne en fonction des phases de la fermentation alcoolique).

La présence d'acétate de 2-phényléthyle est généralement reliée à celle du 2-phényléthanol. Les acétyltransférases associées au métabolisme des levures permettent en effet la transformation d'un alcool en son acétate correspondant (Lilly M. *et al.* 2000). Jusqu'à la 3<sup>ème</sup> phase de la fermentation ces deux composés évoluent de façon similaire (voir Figure 11). Cependant, en fin de fermentation alcoolique une perte importante en acétate de 2-phényléthyle est enregistrée même en cas de fermentation malolactique. On peut supposer que

les microorganismes « utilisent » plus largement leur activité estérase en fin d'élaboration lorsque les nutriments deviennent peu abondants. La Figure 15 pourrait laisser croire que l'acétate de 2-phényléthyle soit quantitativement plus présent dans les cidres à distiller ayant réalisés une fermentation malolactique. Néanmoins, ce composé possède une concentration plus forte dans les cidres à distiller ou une fermentation alcoolique seule a eu lieu. En effet, les modèles présentés ici ne tiennent pas compte des variations internes à chaque phase de consommation des sucres. Or, il s'avère, pour les cuves où une FML a eu lieu, que dans un premier une très forte production d'acétate de 2-phényléthyle est observée. Elle devient maximale en début de 4<sup>ème</sup> phase puis tend à chuter énormément par la suite pour atteindre de très faibles valeurs lors de l'étape de maturation.

Les **phénols volatils** proposent dans leur grande majorité une croissance exponentielle au cours des 4 phases de la fermentation alcoolique (voir Figure 12). On peut néanmoins remarquer pour le 4-éthylphénol, le 4-éthylguaïacol et l'alcool benzylique une augmentation plus forte entre les phases 2 et 4 dans les cuves où une fermentation malolactique a eu lieu. Buron *et al.* (Buron N. *et al.* 2011) ont démontré qu'à la fois des levures (*Brettanomyces anomala*) et les bactéries lactiques (*Lactobacillus collinoides*) peuvent être impliquées dans la formation de phénols volatils dans les cidres. L'évolution forte du 4-éthylphénol et du 4-éthylguaïacol en fin de fermentation malolactique pourrait être due à un développement de *Lactobacillus collinoides* qui peuvent prendre le relais d'*Oenococcus oeni* en fin de FML (Wibowo D. *et al.* 1985) en raison de conditions plus favorables à leur développement (pH plus élevé). Les quantités en 4-éthylphénol et 4-éthylguaïacol semblent assez faibles en phase 4 pour les cuves où une fermentation alcoolique seule a eu lieu (voir Figure 12). Néanmoins, ces données cachent le fait que, dans ces cuves, leur concentration est très faible en début de phase 4, mais augmente de façon extrêmement forte lors de la maturation du cidre. Il en résulte que leur quantité est plus importante *in fine* dans les cidres à distiller où une FML n'a pas eu lieu (voir Tableau 31). Ce développement très tardif dans le procédé d'élaboration et non accompagné de dégradation d'acide malique pourrait être imputable à des levures de type *Brettanomyces anomala*.



Il est à noter que l'alcool benzylique n'a que peu évolué durant la phase de maturation et qu'il se retrouve par conséquent en quantité beaucoup plus importante dans les cidres à distiller des cuves ayant réalisé une FML.

L'eugénol a un comportement similaire à celui des deux premiers phénols volatils (voir Figure 12) avec néanmoins, une progression qui semble un peu plus importante dans les cuves où une FA seule a eu lieu. On peut penser que ce composé n'est pas issu des mêmes voies de dégradation que celles du 4-éthylphénol et du 4-éthylguaïacol.

L'analyse statistique sur les résultats d'aires relatives moyennes a montré dans un premier temps que le 2-(4-hydroxyphényl)éthanol avait l'évolution la plus significative (voir Tableau 33). Il se caractérise, par rapport aux autres composés présentés ici, par une inversion des courbes correspondant à une fermentation alcoolique seule et une fermentation alcoolique accompagnée d'une fermentation malolactique. Les deux premières phases de la FA semblent être très favorables à son développement lorsqu'une FML n'a pas lieu. Néanmoins, peu de données sont relatives à ce composé dans la littérature et il est possible que les cidres fermiers contiennent davantage de substrat permettant son apparition que les cidres industriels.

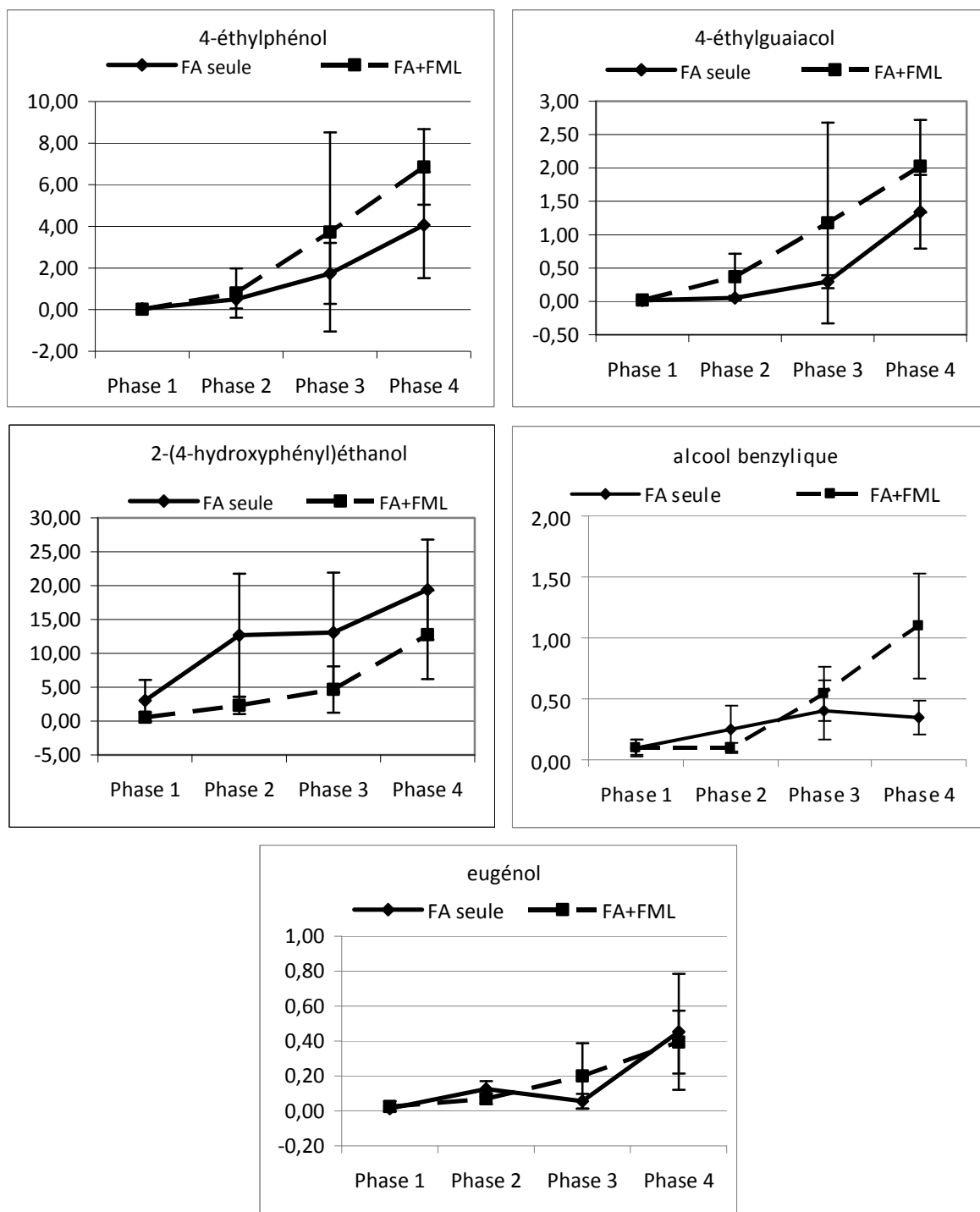


Figure 12 : Représentation de la variation des teneurs moyennes pour les phénols volatils en fonction des phases de la fermentation alcoolique (Aire relative moyenne en fonction des phases de la fermentation alcoolique).

Trois composés (le **2-éthylhexanol**, le **décanol** et le **2-méthylthioéthanol**) proposent des évolutions bien particulières au cours de la fermentation alcoolique des cidres à distiller (voir Figure 13). Aucune donnée de la littérature n'a pu nous permettre de les associer à un métabolisme particulier des levures ou des bactéries. Ils ont tous les trois la particularité de pouvoir être

présents dès la mise en cuve du jus de pommes mais à des niveaux très différents suivant le type de cuve étudié.

Le 2-éthylhexanol aurait pu être classé parmi les alcools supérieurs mais son évolution est bien différente de celles de l'isobutanol et des isopentanol (voir Figure 11). Ce composé est présent dès la mise en cuve (voir Tableau 31). Il semble être peu généré ou métabolisé pendant les trois premières phases de la fermentation alcoolique. Néanmoins, la fermentation malolactique semble jouer un rôle important en ce qui concerne son apparition en fin de procédé car il a été produit de façon très importante entre la 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> phase de la fermentation alcoolique seulement dans le cas où la FA a été accompagnée d'une FML.

Le décanol semble, pour sa part, croître de façon assez constante en fonction de l'avancement de la fermentation alcoolique (voir Figure 13). La légère décroissance observée entre la phase 2 et la phase 3 dans le cas où une FML a lieu est concomitante au ralentissement de la croissance en alcools supérieurs (voir Figure 11). On peut de nouveau penser dans ce cas de figure que la FML puisse inhiber (ou ralentir) dans un premier temps la synthèse des alcools aliphatiques avant de proposer un terrain très favorable aux levures pour une forte production en fin de fermentation alcoolique à partir de sucres résiduels.

A l'inverse le passage de la phase 2 à la phase 3 lors de fermentations simultanées semble être source de production importante de 2-méthylthioéthanol (voir Figure 13).

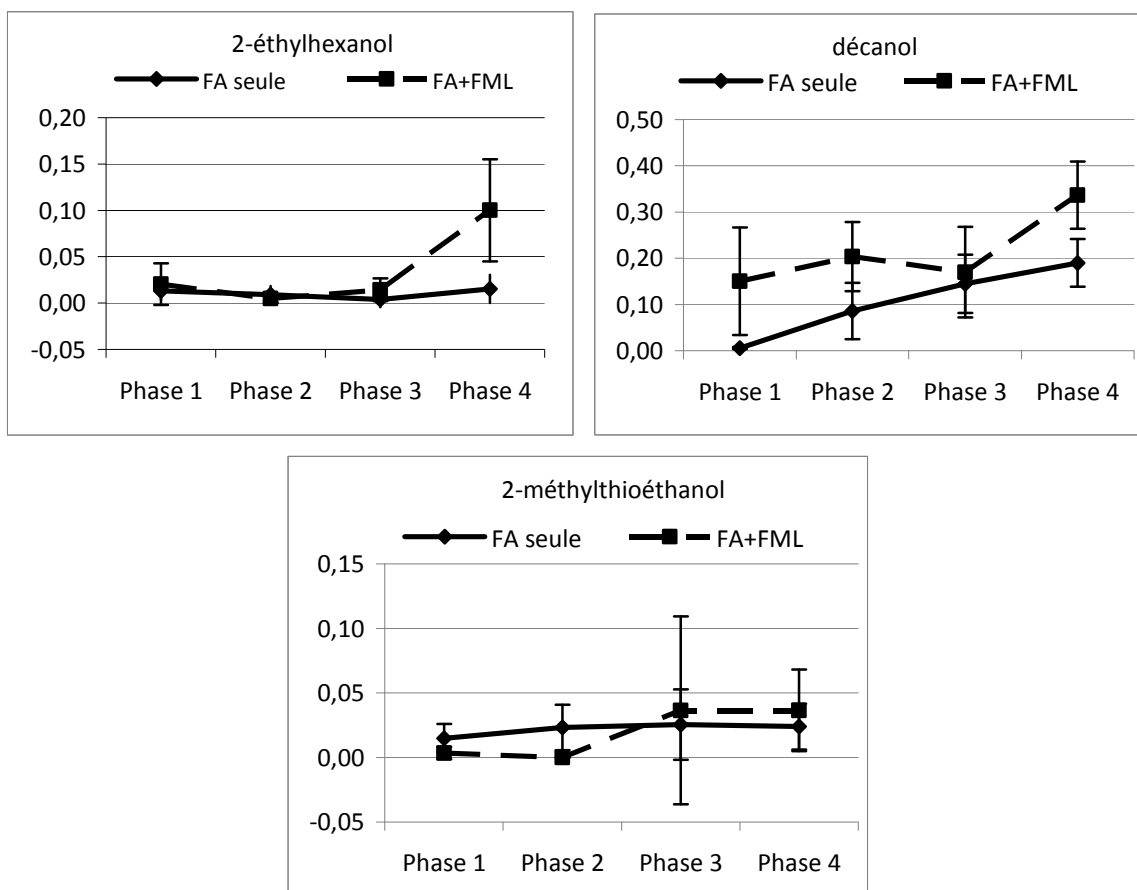


Figure 13 : Représentation de la variation des teneurs moyennes pour le 2-éthylhexanol, le décanol et le 2-méthylthioéthanol en fonction des phases de la fermentation alcoolique (Aire relative moyenne en fonction des phases de la fermentation alcoolique).

De fortes différences d'évolution pour les **dérivés volatils des acides lactique et succinique** peuvent remarquée suivant qu'une fermentation malolactique ait lieu ou non (voir Figure 14). Ces dérivés ont une tendance à progresser de façon lente et régulière lorsqu'une fermentation alcoolique seule est réalisée. Les levures permettent une libération assez faible d'acide lactique et succinique dans le milieu ; l'augmentation du titre alcoométrique et de la concentration en isopentanol permet leur estérification en esters éthyliques et isoamyliques. La fermentation malolactique est à l'origine d'une forte production d'acides lactique et succinique, une apparition exponentielle d'esters correspondants est alors observée au cours des dernières phases de la fermentation alcoolique pour les cuves où une FML a eu lieu.

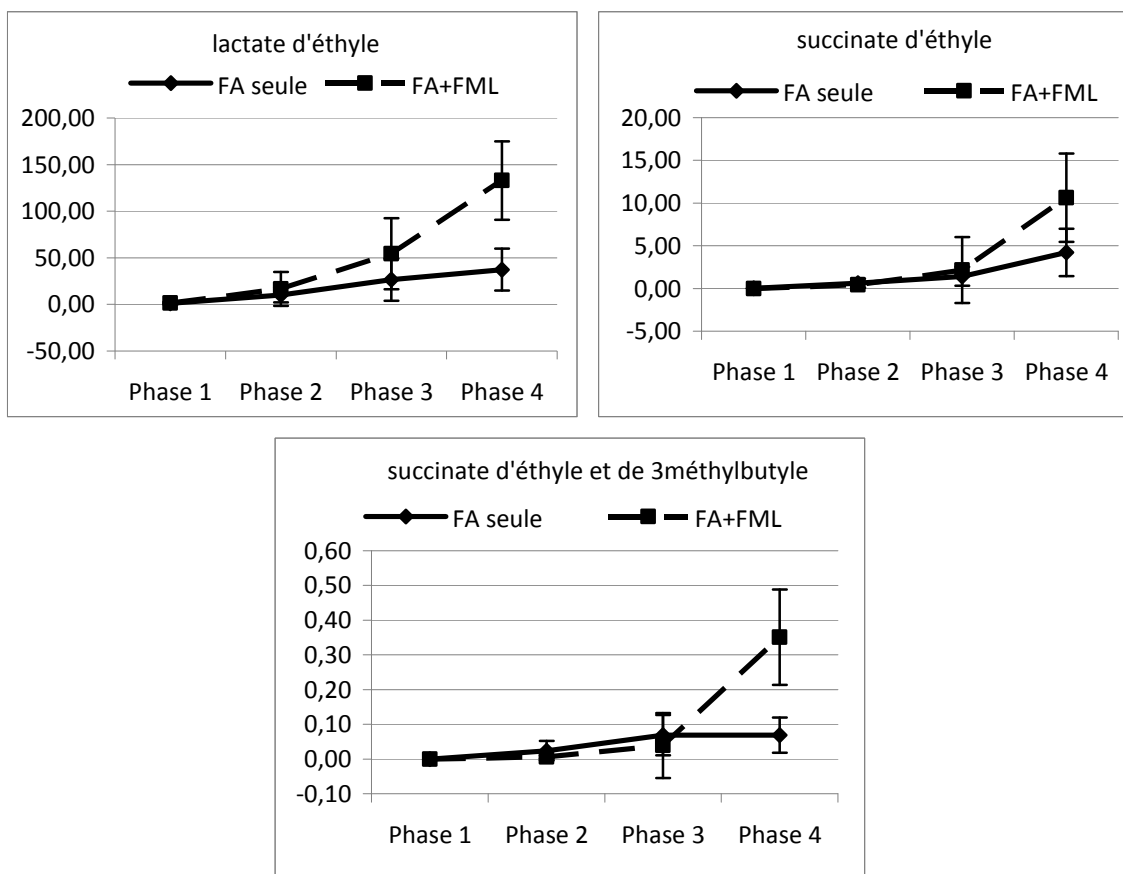


Figure 14 : Représentation de la variation des teneurs moyennes pour le lactate d'éthyle, le succinate d'éthyle et le succinate d'éthyle et de 3-méthylbutyle en fonction des phases de la fermentation alcoolique (Aire relative moyenne en fonction des phases de la fermentation alcoolique).

*Comparaison de l'évolution des composés volatils pendant la fermentation alcoolique pour les différentes cuves étudiées*

Les 24 composés dont l'ANOVA a permis de mettre en évidence des variations significatives pendant la fermentation alcoolique sont maintenant observés au moyen de plusieurs Analyses en Composantes Principales (ACP). Ces analyses statistiques sont réalisées à partir des valeurs d'aires relatives obtenues pour chaque cuve au cours de chacune des 4 phases de la fermentation alcoolique. Nous tenterons, ici, de vérifier si des différences majeures de composition volatile existent entre les types de cuves (industrielle, artisanale et fermière) pour chaque phase de la fermentation alcoolique.

- Différences de composition volatile entre les cuves étudiées lors de la première phase de la fermentation alcoolique

Peu d'échantillons ont pu être récoltés lors de la première phase de la fermentation alcoolique. Lors de la première campagne, 3 échantillons fermiers correspondaient à la phase 1, 2 artisanaux et 2 industriels de chaque AOC soit un total de 9 échantillons. Pour l'année suivante, la phase 1 a pu être caractérisée grâce à 3 prélèvements fermiers, 2 artisanaux et 4 industriels de chaque AOC, ce qui représente un total de 13 échantillons. Des ACP ont néanmoins été réalisées sur les données de cette première phase de la fermentation alcoolique (Figure 15 pour la 1<sup>ère</sup> année et Figure 16 pour la 2<sup>ème</sup> année). Elles permettent de constater, même pour un faible nombre d'échantillons, que les 3 types de production sont difficilement discernables au niveau de leur composition volatile malgré une forte explicativité des composantes principales (70,4% pour l'année 1 et 50,7% pour l'année 2). Les projections des individus (échantillons) qu'ils appartiennent aux groupes artisanal, fermier ou industriel se retrouvent mélangées. On peut en conclure que la composition volatile de toutes les cuves en début de fermentation est très proche.

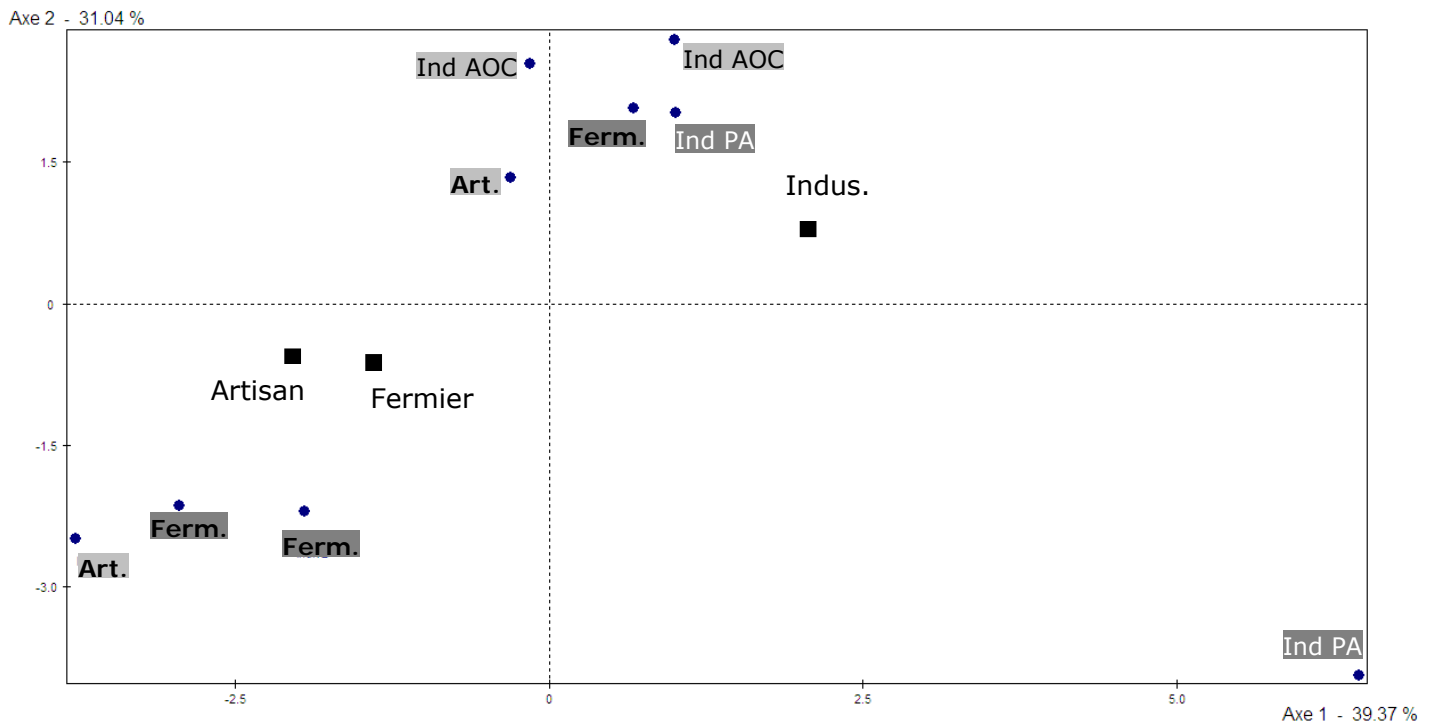


Figure 15 : ACP réalisée sur les aires relatives de 24 composés volatils pour les échantillons (individus) prélevés lors de la première phase de la fermentation alcoolique l'année 1

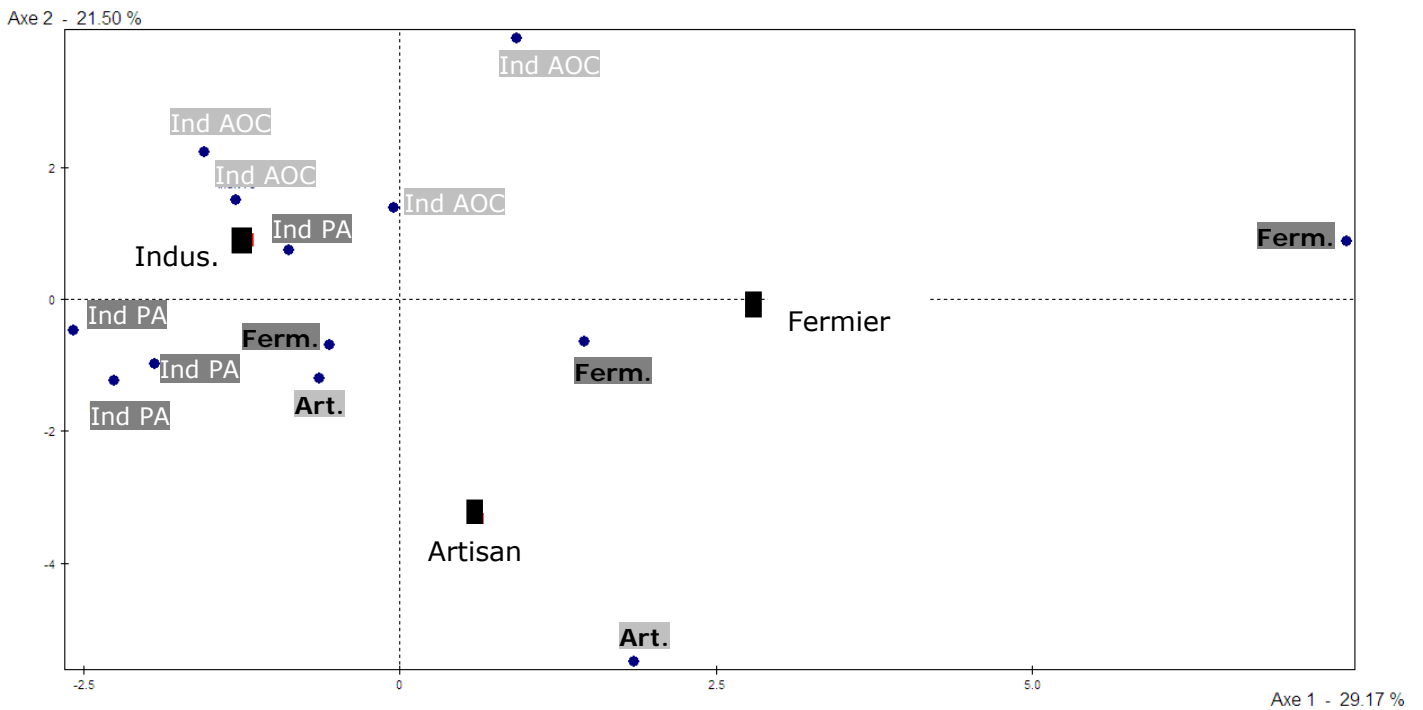


Figure 16 : ACP réalisée sur les aires relatives de 24 composés volatils pour les échantillons (individus) prélevés lors de la première phase de la fermentation alcoolique l'année 2

- Différences de composition volatile entre les cuves étudiées lors de la deuxième phase de la fermentation alcoolique

La deuxième phase de la fermentation alcoolique correspond à une consommation de la quantité de sucres initiale comprise entre 25 et 50%. L'analyse en composantes principales des échantillons de cidres à distiller récoltés pour cette phase tend à montrer une nette différenciation de la composition volatile des productions fermières, artisanales et industrielles (Figure 17 et Figure 18) pour les deux années. Alors que la composition volatile de la cuve artisanale semble être proche de celle de la cuve fermière la 1<sup>ère</sup> année (projections à gauche du modèle présenté en Figure 17), elle tend plutôt à se rapprocher de celle des cuves industrielles la 2<sup>ème</sup> année (projections à droite du modèle présenté en Figure 18). Cette différence majeure peut être expliquée par une apparition d'une fermentation malolactique pour la cuve artisanale lors de la deuxième année alors qu'elle n'a pas lieu la première année (22.2). Il est aussi possible de remarquer la proximité des deux cuves industrielles (« Pays d'Auge » et « AOC ») en terme de composition volatile. En effet, les analyses statistiques les ont regroupées au sein de mêmes clusters. Cependant, la projection des variables sur les modèles élaborés (résultats non montrés) n'ont pas permis de définir le ou les composés volatils qui permettent de discriminer les différents types de cuves lors de cette deuxième phase de la fermentation alcoolique.



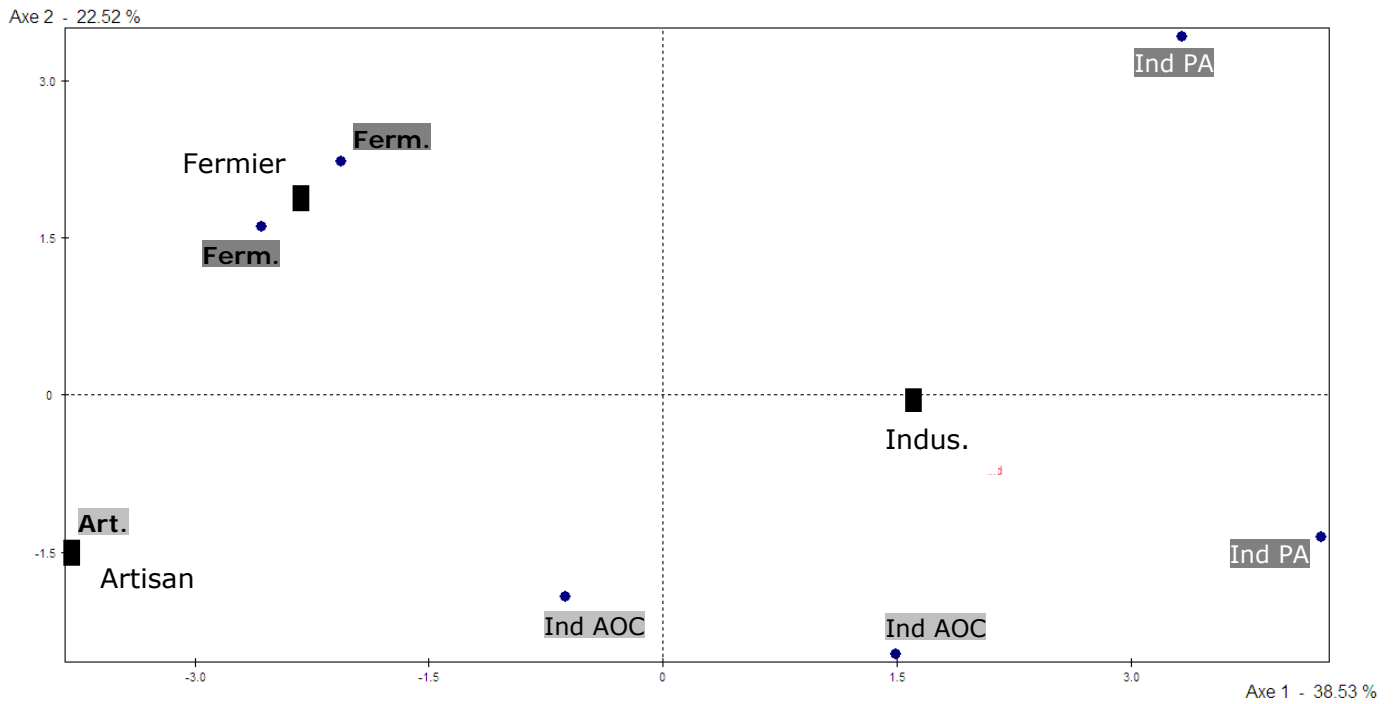


Figure 17 : ACP réalisée sur les aires relatives de 24 composés volatils pour les échantillons (individus) prélevés pendant la seconde phase de fermentation alcoolique l'année 1

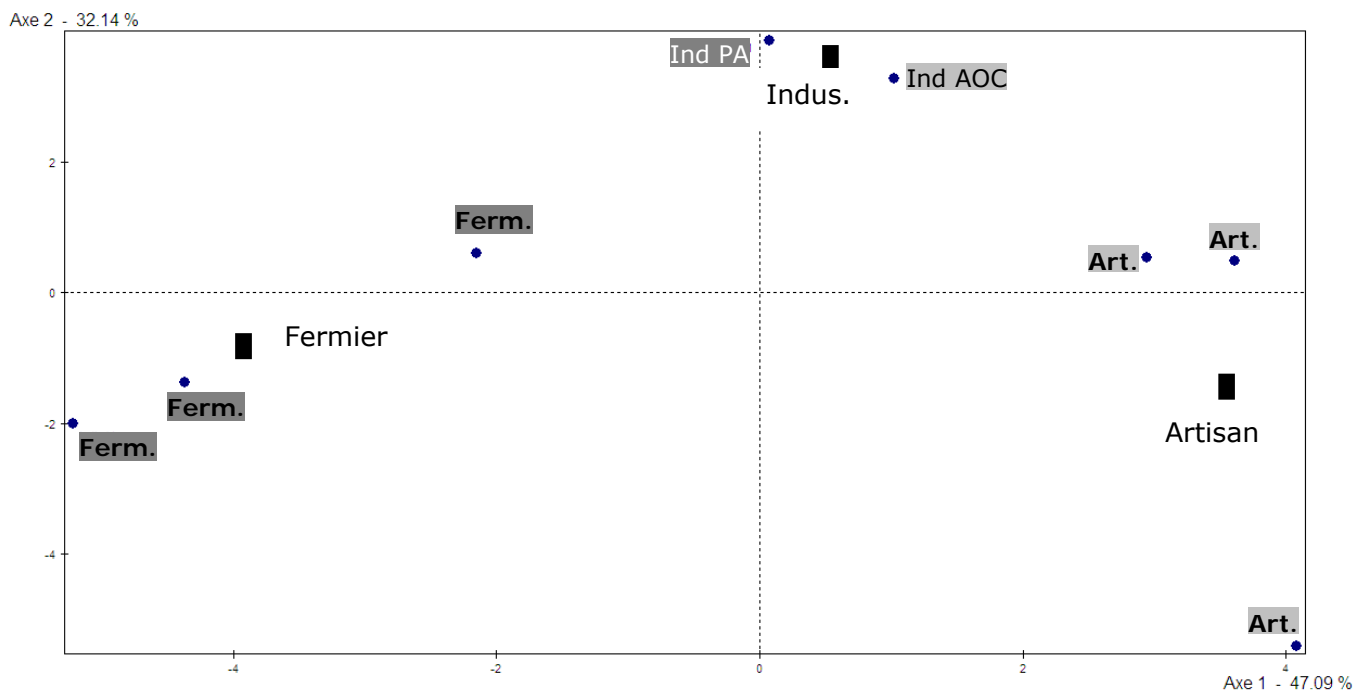


Figure 18 : ACP réalisée sur les aires relatives de 24 composés volatils pour les échantillons (individus) prélevés pendant la seconde phase de fermentation alcoolique l'année 2

- Différences de composition volatile entre les cuves étudiées lors de la troisième phase de la fermentation alcoolique

La nette différenciation des cuves observée pour les échantillons prélevés en seconde phase de la fermentation alcoolique tend à se confirmer lors de la troisième phase. Des clusters peuvent être clairement déterminés pour chaque méthodologie de production (fermière, artisanale et industrielle) pour la première année comme pour la seconde année (Figure 19 et Figure 20). Les résultats obtenus pour la première année ne seront pas discutés à cause du faible nombre d'échantillons prélevés : 1 pour la cuve artisanale, 2 pour la cuve fermière et 1 pour chacune des cuves industrielles. *A contrario*, le nombre élevé d'échantillons recoltés la deuxième année (8 pour la cuve artisanale, 4 pour la cuve fermière et 3 pour les cuves industrielles) permet de dresser un constat des différences entre types de production. Dans un premier temps, il est possible de voir que les différences de composition volatile entre les deux cuves industrielles sont minimales ; à l'instar de la seconde phase de la fermentation alcoolique, l'analyse statistique regroupe les AOC « Pays d'Auge » et « Calvados » au sein d'un même environnement (Figures 17, 18, 19 et 20). Le modèle élaboré en Figure 20 permet dans un deuxième temps de vérifier que les cuves où une fermentation malolactique a eu lieu (artisanale et industrielles) peuvent être distinguées de celles où elle n'a pas eu lieu (fermière). Le modèle expliquant une majorité des différences de composition volatile (56% pour les première et deuxième composantes) une projection des variables a été réalisée (Figure 21). Si on considère les 24 composés volatils sélectionnés, les variations les plus significatives sont observées pour la cuve artisanale (barycentre situé en bas sur le côté droit) ; il est ainsi possible de statuer que lors de cette troisième phase de la fermentation alcoolique la cuve artisanale est celle qui subit les plus profondes modifications de composition volatile. A l'inverse, les cuves industrielles (barycentre situé approximativement sur la gauche) et les cuves fermières (barycentre situé approximativement vers le haut) semblent subir des modifications moins importantes de leur composition volatile.

Au cours de cette troisième phase, le 2-éthylhexanol, le propanol et le décanol évoluent le plus significativement dans les cuves industrielles. Le 2-(4-hydroxyphényl)éthanol, l'acétate de 2-phényléthyle, l'alcool benzylique et l'acide acétique voient leurs quantités se modifier le plus fortement dans la cuve fermière.

La cuve artisanale se caractérise, outre par l'évolution significative d'un grand nombre de composés volatils, par des augmentations très importantes (Figure 21) en lactate d'éthyle et en alcools supérieurs (isobutanol, isopentanol et 2-phényléthanol). On peut s'apercevoir ici, qu'à production d'éthanol identique (échantillons tous situés entre 50% et 75% de sucres consommés), l'action des levures sur les acides aminés semble être plus intense. Ceci peut être expliqué par le fait qu'en 3<sup>ème</sup> phase de la fermentation alcoolique la cuve artisanale est la seule pour laquelle la fermentation malolactique est terminée (Figure 9). Beaucoup d'acide lactique a été produit juste avant cette 3<sup>ème</sup> phase ce qui nous a même fait penser qu'une « piqûre lactique » était apparue pour cette cuve (Tableau 29). Cela engendre par conséquent une apparition très significative de lactate d'éthyle dans le milieu en raison de l'augmentation concomitante de la teneur en éthanol au cours de la fermentation alcoolique. L'action des bactéries lactiques devient limitée en raison du manque de substrat (acide malique) nécessaire à leur survie ce qui peut permettre une activité plus importante des levures notamment sur les sucres et les acides aminés et par conséquent une accumulation d'alcools supérieurs. En raison de cette complétion rapide de la fermentation malolactique en comparaison à l'avancement de la fermentation alcoolique, le moût devient nécessairement moins acide (augmentation du pH grâce à la fermentation malolactique) et donc perméable à l'apparition de microorganismes indésirables ; cette hypothèse peut être partiellement vérifiée par des apparitions significatives pour la cuve artisanale en troisième phase de la fermentation alcoolique (Figure 21) de phénols volatils (4-éthylphénol et 4-éthylguaïacol) et de divers acides carboxyliques (acides 2-méthylpropanoïque, butanoïque, hexanoïque, octanoïque et 2-méthylbutanoïque).

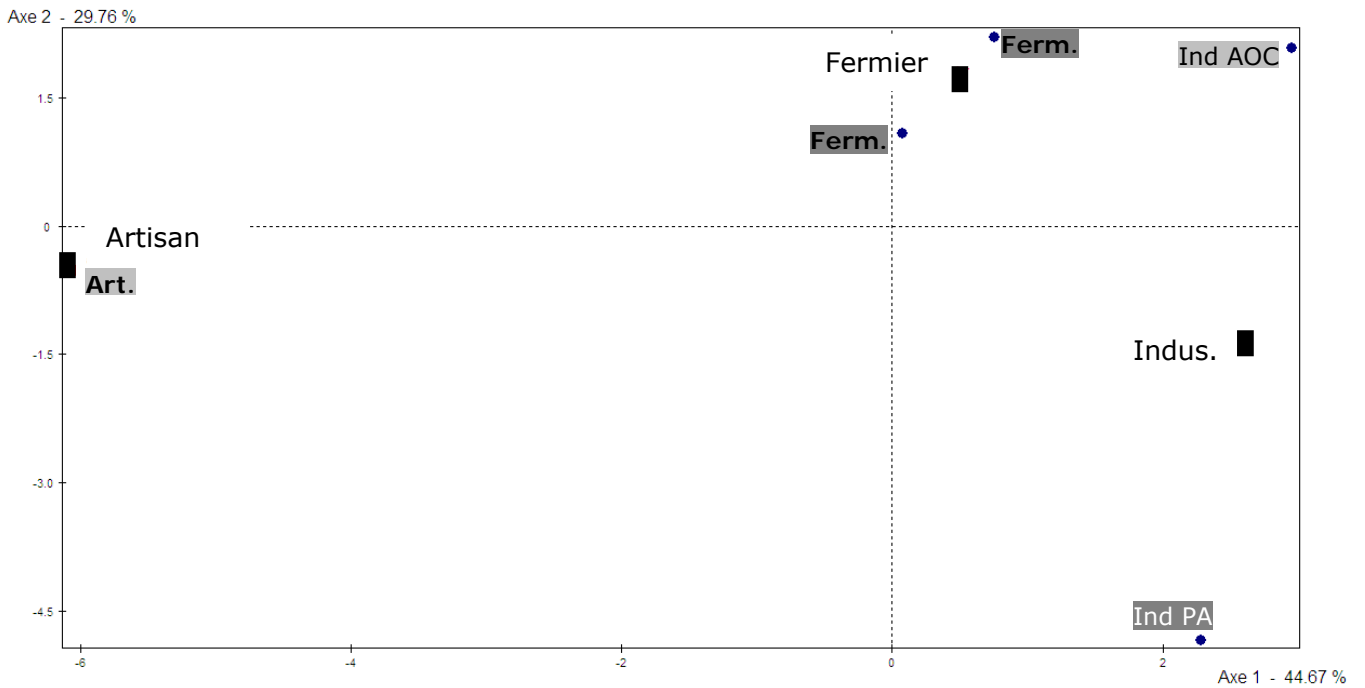


Figure 19 : ACP réalisée sur les aires relatives de 24 composés volatils pour les échantillons (individus) prélevés lors de la troisième phase de la fermentation alcoolique l'année 1

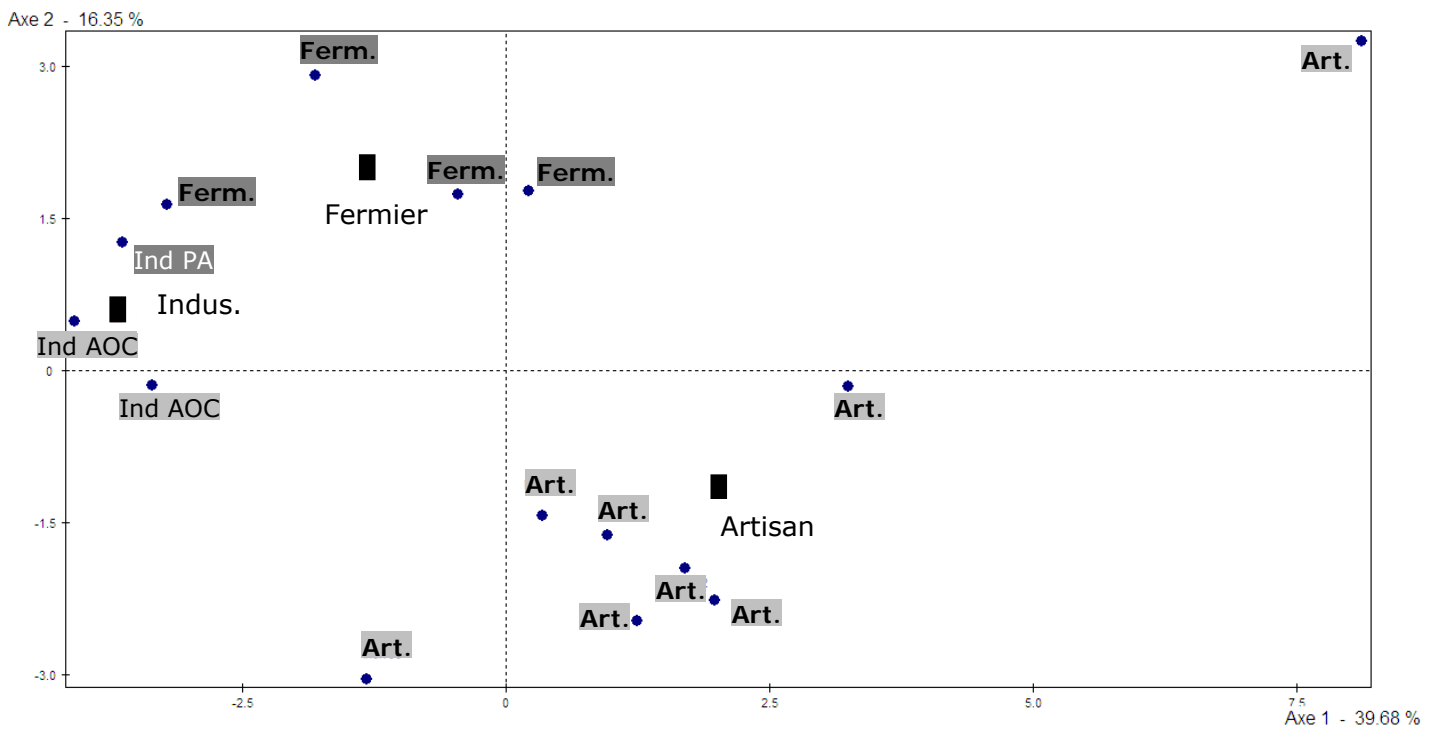


Figure 20 : ACP réalisée sur les aires relatives de 24 composés volatils pour les échantillons (individus) prélevés lors de la troisième phase de la fermentation alcoolique l'année 2

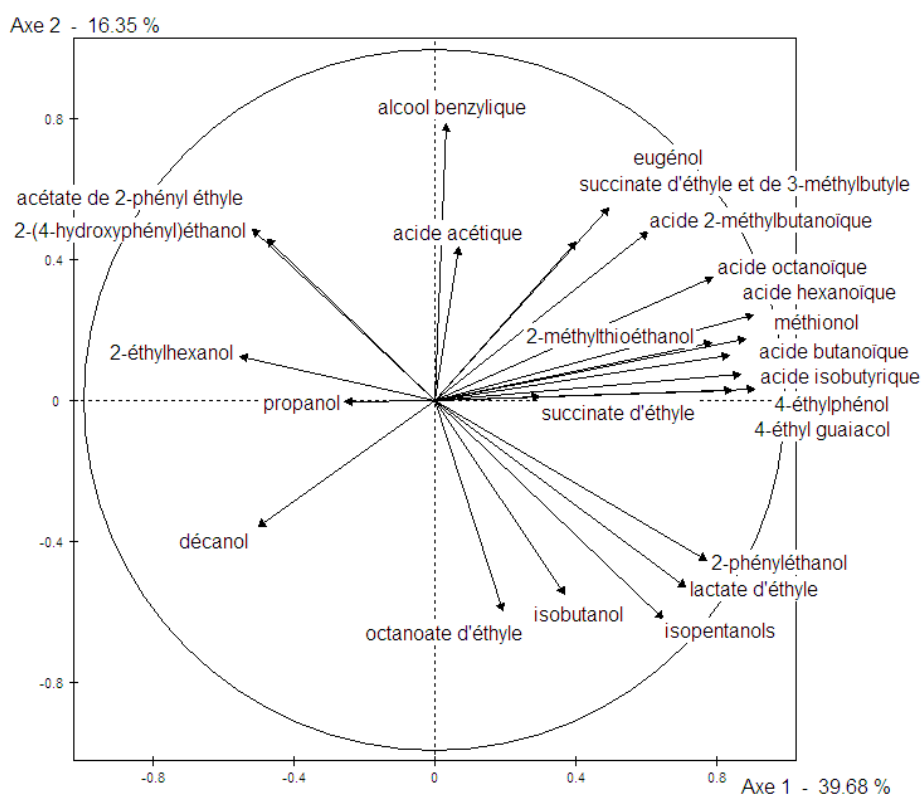


Figure 21 : Projection des variables d'après l'ACP réalisée sur les aires relatives de 24 composés volatils pour les échantillons prélevés lors de la troisième phase de la fermentation alcoolique l'année 2

- Différences de composition volatile entre les cuves étudiées lors de la dernière phase de la fermentation alcoolique

Nous avons pu remarquer que précédemment les cuves industrielles « AOC Calvados » et « AOC Pays d'Auge » étaient difficilement discernables du point de vue de leur composition volatile. Sur les résultats obtenus en dernière phase de la fermentation alcoolique, il semble qu'elles puissent être légèrement différenciées (Figure 22 et Figure 23). Néanmoins, elles sont replacées dans un environnement statistique proche et cette potentielle discrimination peut être due au fait que nous comparons le contenu de deux cuves pouvant avoir subi de légères variations au cours de leur fermentation. Il n'en reste pas moins que l'évolution de la composition volatile notamment lors de cette dernière phase est très différente entre deux cuves pourtant destinées à la même appellation d'origine. En effet, le comportement de la cuve fermière (AOC Pays d'Auge) est très différent de celui de la cuve industrielle « Pays d'Auge » (Figure 22). La méthodologie de travail (à petite ou grande échelle) semble par conséquent

avoir plus d'impact sur la composition volatile du cidre à distiller que l'appartenance à un label particulier. Grâce aux résultats obtenus la 1<sup>ère</sup> année nous comparerons spécifiquement l'évolution globale des composés volatils au cours de la quatrième phase de la fermentation alcoolique entre la cuve fermière et les cuves industrielles (1 seul échantillon provenant de la cuve artisanale a pu être étudié). Les résultats obtenus pour la 2<sup>ème</sup> année pourront permettre de comparer les tendances d'évolution au cours de cette phase pour les trois types de cuves.

En Figure 24, nous avons réalisé une projection des variables à partir du modèle élaboré (Figure 22) pour la 1<sup>ère</sup> année au cours de la dernière phase de la fermentation alcoolique. Les projections pointant en haut à gauche sont celles de composés volatils dont on retrouve une forte variation au cours de cette phase dans la cuve fermière. A l'inverse, les projections pointant en bas à droite correspondent à des composés volatils dont la teneur évolue beaucoup dans les cuves industrielles. Il est possible de voir que peu de composés volatils ont un comportement spécifique à une de ces cuves. Néanmoins, l'environnement statistique de la classe correspondant aux cuves industrielles est caractérisé par la présence de dérivés éthylés des acides lactique et succinique. Dans les cuves industrielles, la fermentation malolactique est arrivée à son terme juste avant la fin de la fermentation alcoolique et il est donc logique d'observer ces composés volatils dans un milieu où l'éthanol devient très abondant. A l'instar de ce qui a été observé en 3<sup>ème</sup> phase pour la cuve artisanale, on retrouve ici des acides carboxyliques qui apparaissent plus fortement ; cependant, à l'inverse on pourra noter que les phénols volatils ne semblent pas évoluer plus dans les cuves industrielles que dans la cuve fermière.

Le positionnement du barycentre des échantillons de la cuve artisanale très éloigné du centre du modèle statistique (Figure 23) tend à montrer que les plus fortes évolutions sont enregistrées pour ce type de cuve. Les projections des variables sur ce modèle (Figure 25) attestent que, comme lors de la 3<sup>ème</sup> phase, les dérivés lactique et succinique, les phénols volatils et les acides carboxyliques y évoluent très fortement. Il est à noter que cette cuve n'a jamais atteint une consommation totale des sucres.

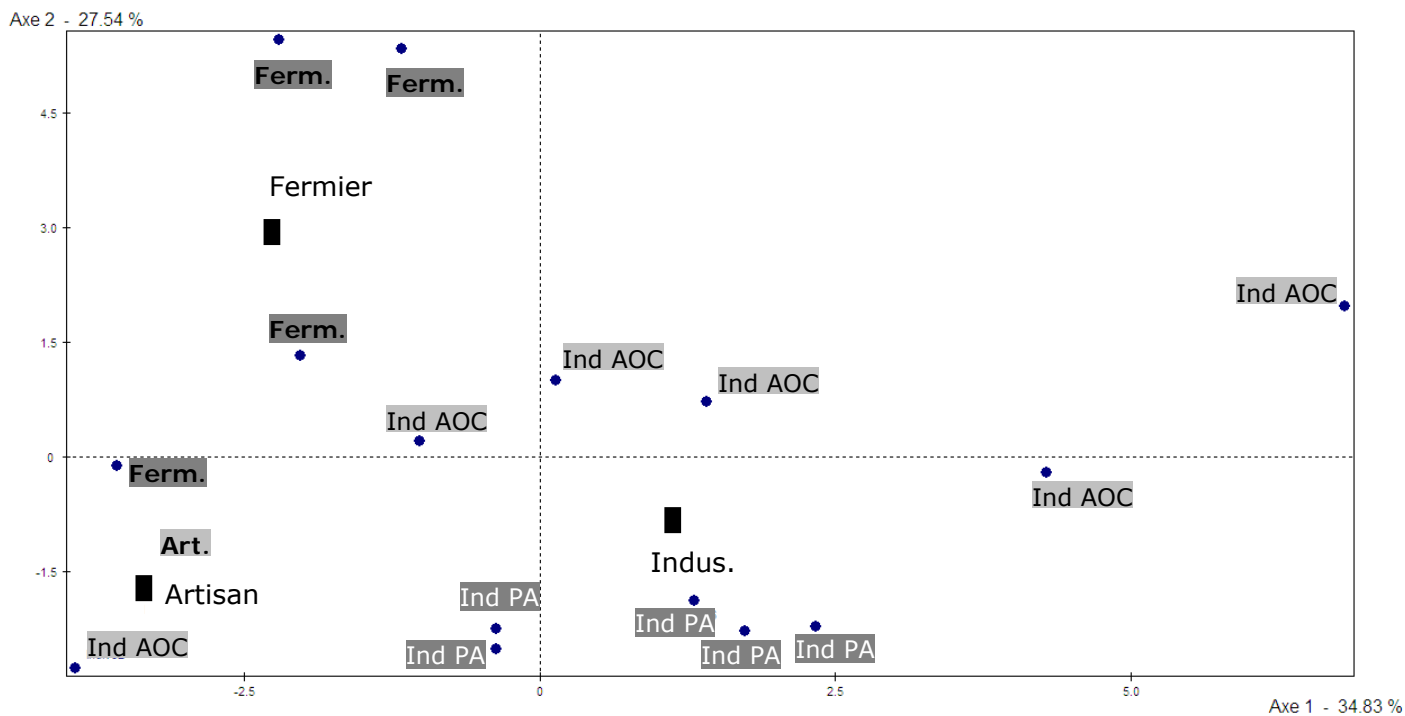


Figure 22 : ACP réalisée sur les aires relatives de 24 composés volatils pour les échantillons (individus) prélevés lors de la dernière phase de la fermentation alcoolique l'année 1

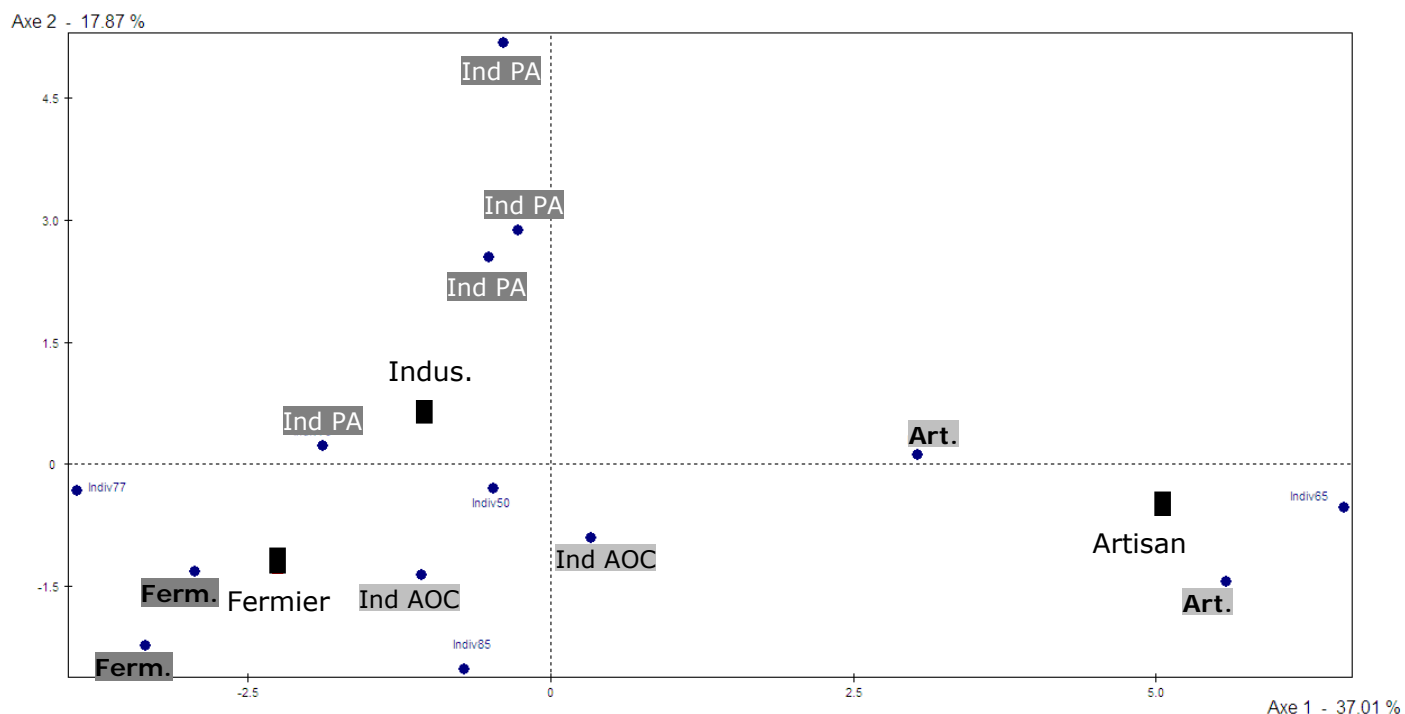


Figure 23 : ACP réalisée sur les aires relatives de 24 composés volatils pour les échantillons (individus) prélevés lors de la dernière phase de la fermentation alcoolique l'année 2

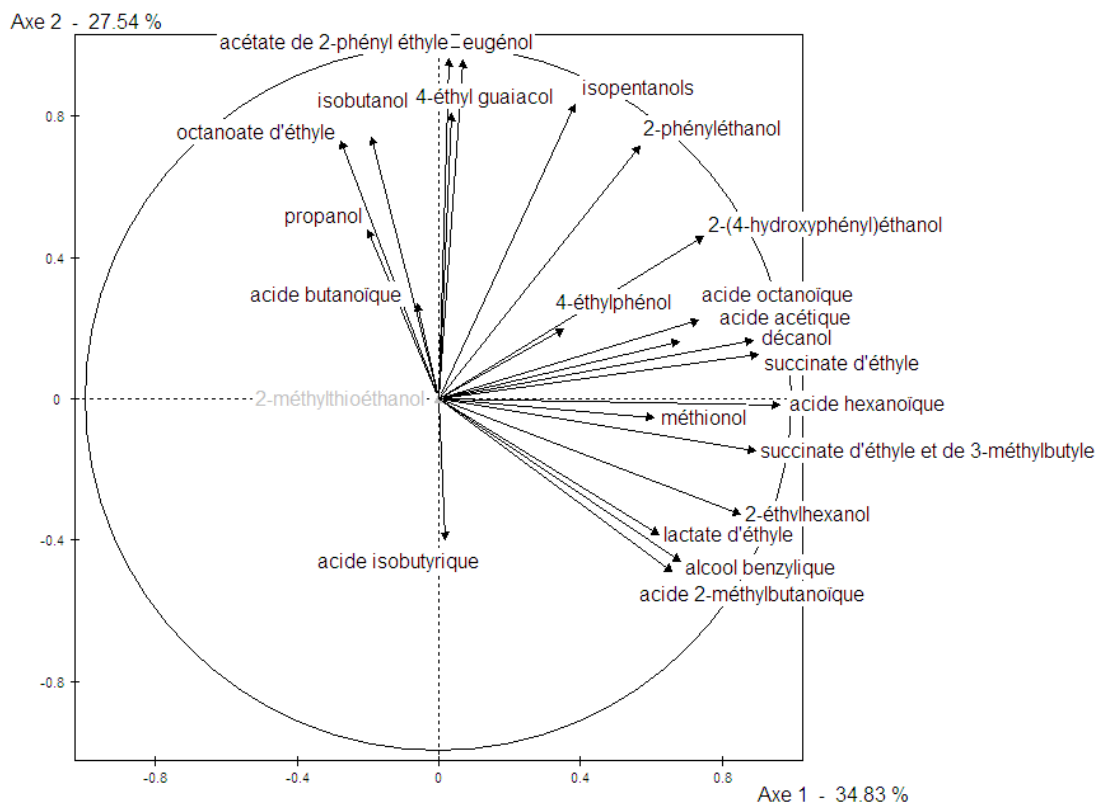


Figure 24 : Projection des variables d'après l'ACP réalisée sur les aires relatives de 24 composés volatils pour les échantillons prélevés lors de la dernière phase de la fermentation alcoolique l'année 1

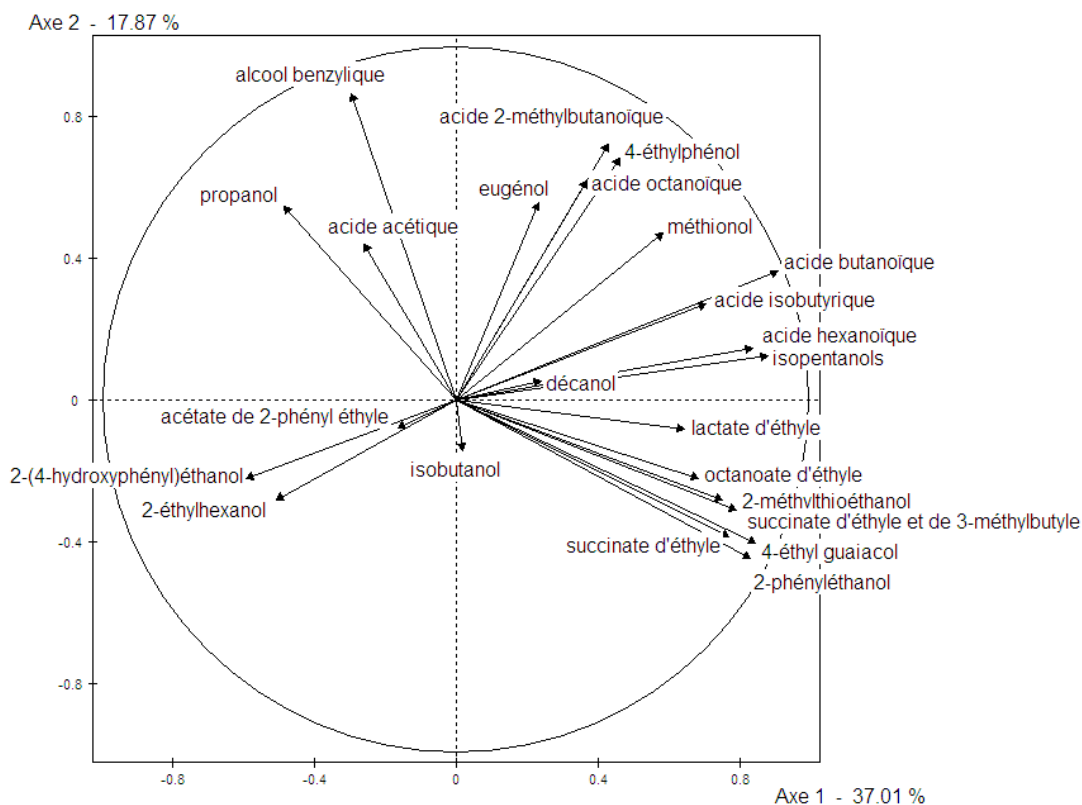


Figure 25 : Projection des variables d'après l'ACP réalisée sur les aires relatives de 24 composés volatils pour les échantillons prélevés lors de la dernière phase de la fermentation alcoolique l'année 2



Nous pouvons en conclure, dans un premier temps, que le contenu des cuves est relativement homogène au début du procédé d'élaboration. La composition volatile évolue nettement au cours de la deuxième phase de la fermentation alcoolique et tend à être très différente pour des cuves dont la méthodologie de production n'est pas la même. Cette différenciation est aussi régie en grande partie par l'apparition ou non d'une fermentation malolactique. Les différences de composition volatile continue à s'accroître au cours de la troisième phase de la fermentation alcoolique avec notamment une diversification très importante du patrimoine volatil pour les cuves où la fermentation malolactique est achevée avant que 50% des sucres soient consommés. En fin de processus la composition volatile semble se stabiliser surtout pour les cuves où une fermentation alcoolique seule a eu lieu.

#### *Evolution des composés volatils au cours de la fermentation malolactique*

Comme nous avons pu le voir précédemment la fermentation malolactique influence fortement l'évolution des composés volatils. Nous avons voulu par conséquent vérifier spécifiquement leur évolution au cours de cette transformation.

La fermentation malolactique dans le cas des cuves étudiées ici est un processus très rapide qui arrive à complétion au bout de quelques jours seulement. La fréquence des prélèvements n'a pas été suffisante pour étudier plusieurs phases pour suivre le comportement d'une cuve en particulier. Néanmoins, sur la globalité des cuves étudiées où elle a eu lieu (4 cuves industrielles et 1 cuve artisanale), nous avons pu attribuer à chaque point de prélèvement une appartenance à une phase de la fermentation malolactique. Cette transformation a été découpée sur le même principe que la fermentation alcoolique en 4 phases qui correspondent à un avancement de la consommation en acide malique :

- la phase 1 inclut tous les prélèvements pour lesquels la teneur en acide malique est restée entre 75 et 100% de la teneur initiale en acide malique,
- la phase 2 ; prélèvements pour lesquels la teneur en acide malique est entre 50 et 75% de la teneur initiale,

- la phase 3 ; prélèvements pour lesquels la teneur en acide malique est entre 25 et 50% de la teneur initiale,
- la phase 4 ; prélèvements pour lesquels la teneur en acide malique est inférieure à 25% de la teneur initiale en acide malique.

Comme pour l'étude des phases de la fermentation alcoolique, les composés proposant les évolutions les plus significatives entre les phases 1, 2, 3 et 4 ont été sélectionnés après analyse de la variance (ANOVA) sur les résultats d'aires relatives moyennes pour chaque phase. De même, seuls les composés proposant les probabilités d'erreur les plus faibles ( $p < 0,001$ ) sont présentés en Tableau 34 accompagnés des aires relatives moyennes pour chaque phase de la fermentation malolactique.

Tableau 34 : Aires relatives moyennes des composés volatils présentant les variations de concentrations les plus importantes ( $p < 0,001$ ) sur les 4 phases de la fermentation malolactique. Résultats pour les cuves où une fermentation alcoolique est accompagnée d'une fermentation malolactique (FA+FML).

	Moyenne dans la généralité	Phases de la fermentation malolactique			
		Phase 1	Phase 2	Phase 3	Phase 4
2-éthylhexanol	0,041	0,020	0,014	0,021	0,077
2-phényléthanol	173,970	92,921	164,396	186,470	277,638
4-éthylguaïacol	1,138	0,426	0,606	1,310	2,136
4-éthylphénol	4,101	1,660	0,617	2,297	8,166
acétate de 2-phényléthyle	2,958	2,318	5,328	10,544	2,349
acétate de 3-méthylbutyle	0,448	0,262	0,818	1,430	0,486
acide 2-méthylbutanoïque	0,836	0,491	0,005	0,220	1,525
acide butanoïque	0,766	0,405	0,005	0,369	1,435
acide hexanoïque	1,452	0,630	0,075	1,031	2,843
acide isobutyrique	0,404	0,199	0,002	0,148	0,782
acide octanoïque	0,730	0,316	0,103	0,446	1,423
alcool benzylique	0,505	0,288	0,072	0,242	0,905
butanol	4,318	2,497	5,444	4,509	6,373
hexanoate d'éthyle	0,178	0,084	0,360	0,401	0,232
isobutanol	8,610	5,031	8,319	10,643	12,980
isopentanol	80,484	42,592	83,242	105,111	125,141
lactate d'éthyle	60,511	18,844	19,906	56,783	122,606
méthionol	1,036	0,675	0,499	0,673	1,653
octanoate de 2-phényléthyle	0,187	0,301	0,262	0,392	0,000
succinate d'éthyle	3,743	1,521	1,586	2,649	7,162
succinate d'éthyle et de 3-méthylbutyle	0,124	0,041	0,046	0,061	0,253

Vingt et un composés ont une évolution significative au cours des 4 phases de la fermentation malolactique. La fermentation alcoolique et la fermentation malolactique étant simultanées pour les cidres à distiller étudiés, il est finalement assez logique de retrouver une base de composés assez identique à celle observée pour l'étude des 4 phases de la fermentation alcoolique.

Le comportement des **esters** (acétate de 2-phényléthyle, acétate de 3-méthylbutyle, hexanoate d'éthyle et octanoate de 2-phényléthyle) est particulier au cours de la fermentation malolactique. La FML semble dans un premier temps (phases 1 à 3) favoriser très largement leur apparition dans le milieu. Cette apparition est néanmoins très largement contrebalancée par une décroissance importante en phase 4. Il semble ainsi que les bactéries lactiques soient à l'origine en fin de fermentation malolactique de la perte des esters. Lors de cette dernière phase le niveau des esters revient finalement à un niveau très faible correspondant au niveau atteint en première phase (voir Tableau 34).

Pour leur part les **acides carboxyliques** (acides butanoïque, isobutyrique, 2-méthylbutanoïque, hexanoïque et octanoïque) proposent une évolution contraire à celle des esters au cours de la fermentation malolactique. Leur concentration est divisée par un facteur 2 entre les phases 1 et 2. Par contre, ils tendent à croître rapidement entre la phase 2 et la phase 3 pour atteindre un niveau similaire à celui obtenu en première phase. Ils sont 3 à 4 fois plus concentrés en phase 4, ce qui peut être expliqué en partie par un apport lié à la dégradation des esters éthyliques par des activités estérase/synthétase.

Une évolution similaire à celle des acides carboxyliques est retrouvée pour plusieurs composés : 2-éthylhexanol, 4-éthylphénol, alcool benzylique et méthionol. Leurs origines sont très diverses dans le produit. Néanmoins, cela tend à démontrer, en cours de fermentation malolactique, qu'une bonne partie de l'activité des levures est inhibée par la présence des bactéries lactiques.

De leur côté les **alcools supérieurs** (isobutanol, butanol et isopentanol) augmentent très fortement entre la phase 1 et 2 et il semble ainsi que la concomitance des deux transformations soit favorable à leur apparition dans un premier temps. Cependant, un léger fléchissement de leur croissance (voire une diminution pour le butanol) est observé entre les phases 2 et 3. Entre ces deux phases il est possible qu'ils continuent à être rapidement produits mais que des acétyltransférases puissent les transformer rapidement en acétates. L'activité estérase des bactéries lactiques en fin de FML (début de phase 4) peut permettre ensuite d'expliquer la perte des acétates (acétate de 2-phényléthyle et de 3-méthylbutyle) au profit des alcools correspondants (2-phényléthanol et isopentanol).

Les **dérivés volatils des acides lactique et succinique** (lactate d'éthyle, succinate d'éthyle et succinate d'éthyle et de 3-méthylbutyle) ont tendance à avoir une concentration relativement stable entre la 1<sup>ère</sup> et la 2<sup>ème</sup> phase de la fermentation malolactique. Néanmoins, leur quantité augmente très fortement en 3<sup>ème</sup> puis en 4<sup>ème</sup> phase de fermentation malolactique. En début de fermentation malolactique (qui coïncide généralement avec le début de la fermentation alcoolique), le milieu est peu riche en éthanol ; on peut donc

penser qu'à ce stade la réaction d'estérification des acides lactique et succinique n'est pas favorisée. Par contre, en 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> phase la proportion d'éthanol devient assez importante dans le milieu et favorise la transformation de ces deux acides en esters correspondants.

L'avancement de la fermentation malolactique a été modélisé au moyen d'une analyse en composantes principales (ACP) en prenant les valeurs d'aires relatives moyennes obtenues pour chaque phase et pour chaque composé proposant une évolution significative ( $p < 0,001$ ). Malgré un nombre réduit d'échantillons, les deux axes majeurs permettent d'expliquer plus de 73% des variations du modèle (Figure 26).

Cette représentation traduit le fait que les principaux changements issus de la fermentation malolactique ont lieu pendant la 4<sup>ème</sup> phase. En effet, les projections des barycentres des phases 1, 2 et 3 (notés FML 1, FML 2 et FML 3 en Figure 26) sur la 1<sup>ère</sup> composante (axe 1, expliquant plus de 58% de la variation du système) sont très proches les uns des autres. Le barycentre de la 4<sup>ème</sup> phase est situé pour sa part de l'autre côté du repère.

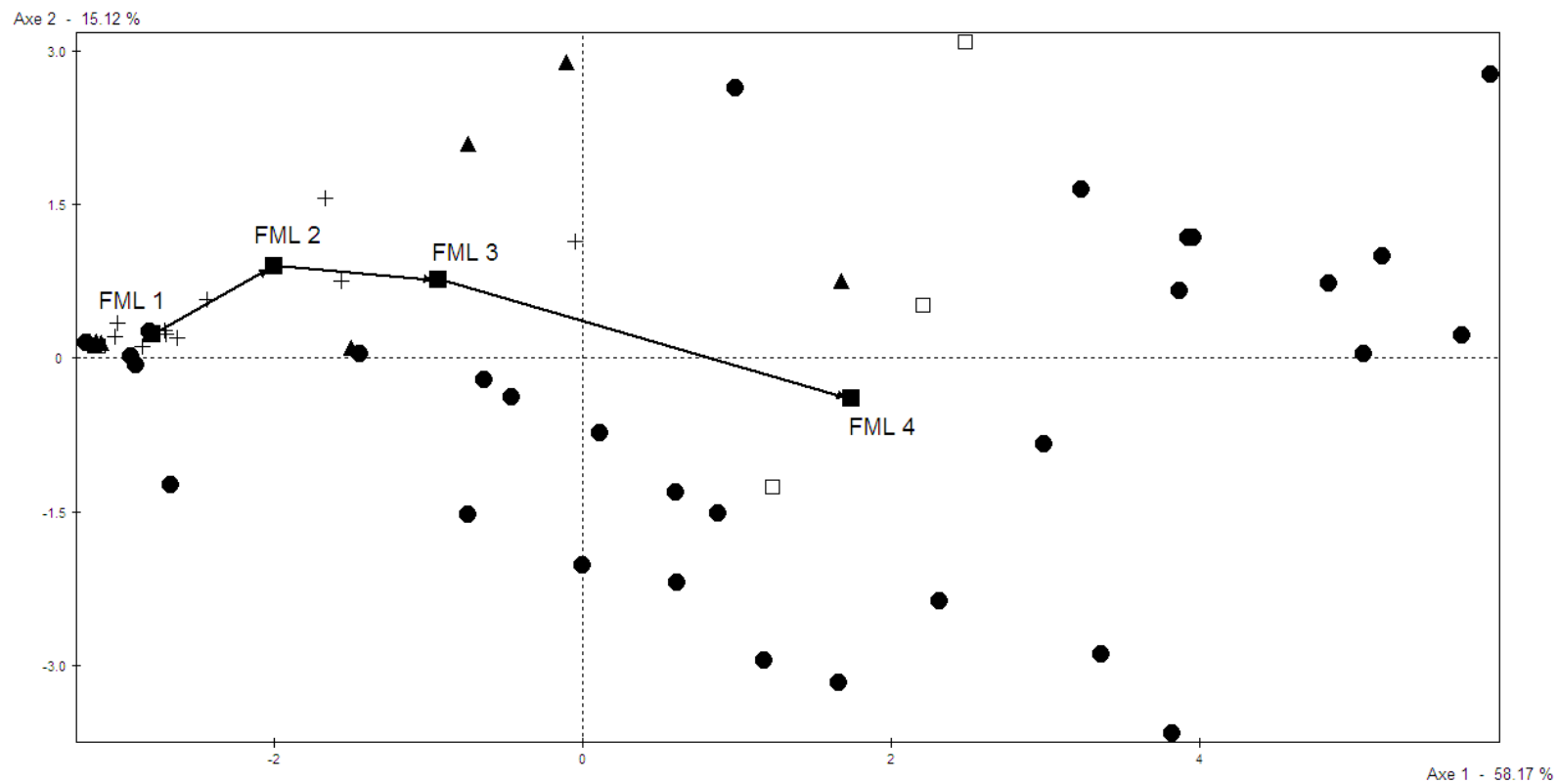


Figure 26 : ACP des individus pour le déroulement de la fermentation malolactique Avec, les échantillons de la phase 1 (+), de la phase 2 ( $\Delta$ ), de la phase 3 ( $\square$ ) et de la phase 4 (O).

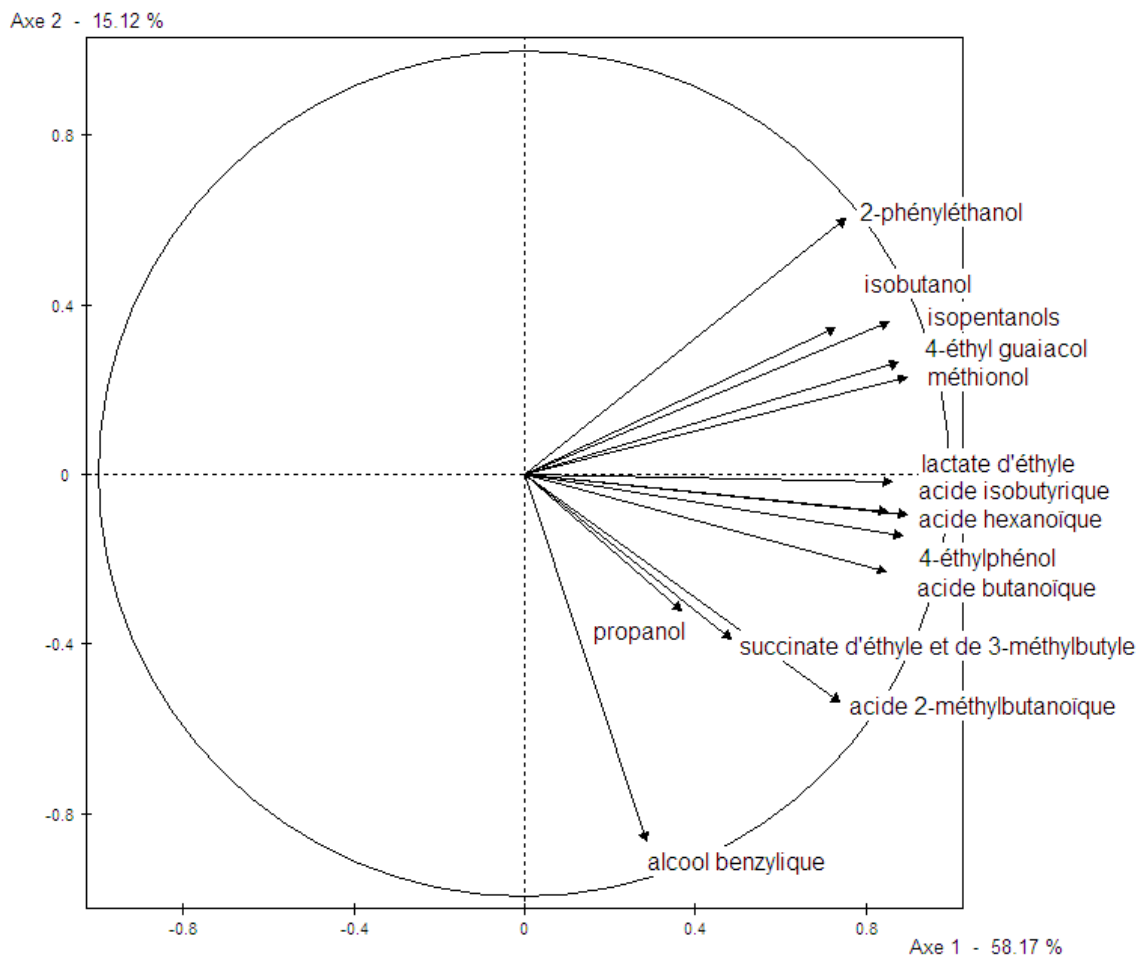


Figure 27 : ACP des variables très hautement significatives lors de la fermentation malolactique

La projection des variables les plus significatives sur ce modèle (Figure 27) permet de visualiser rapidement les principales phases d'apparition des composés volatils au cours des 4 phases de la fermentation malolactique. Dans un premier temps, aucun composé volatil ne semble atteindre son niveau maximal (phase 1 et phase 2). En fin de phase 3 (en haut à droite de la Figure 27), les alcools issus de la dégradation des acides aminés et/ou des sucres par les levures (2-phényléthanol, isobutanol, isopentanol et méthionol) atteignent leur proportion maximale. Le début et le milieu de la 4<sup>ème</sup> phase marquent une apparition importante d'acides carboxyliques (acides butanoïque, isobutyrique, hexanoïque puis 2-méthylbutanoïque). Dans le même temps, les dérivés de l'acide lactique et succinique atteignent leur niveau maximal. En fin de phase 4, qui peut être assimilée à la fin de la fermentation alcoolique, le propanol et l'alcool benzylique apparaissent de façon significative.

## CONCLUSION GENERALE

L'objectif de ce travail sur les cidres dédiés à la distillation en Calvados était tout d'abord de caractériser les fermentations pouvant intervenir lors de l'élaboration de ces produits. Sur la base d'une sélection de trois modes de fabrication (fermière, artisanale et industrielle) sur deux années, nous avons pu observer des différences majeures entre ces productions.

Pour les productions à petite échelle (fermière notamment) l'étape de fermentation alcoolique est généralement très longue et peut se poursuivre sur une dizaine de mois avant d'atteindre une concentration résiduelle en sucres. Ces cuves se caractérisent par une fermentation malolactique non accomplie qui peut être expliquée par une concentration d'acide malique peu importante dans le moût initial (comprise entre 1 et 1,5 g/L) mais aussi par une exposition à des températures relativement fraîches.

Les dimensions des cuves constituent un élément très important pour une tenue rapide de la fermentation alcoolique. Dans le cas de cuves industrielles de grande contenance (2500 hL) et exposées à un fort ensoleillement, un déroulement rapide de la fermentation alcoolique est observé. Cette transformation qui vise à transformer les sucres en alcool peut être achevée en moins de 2 mois seulement. La fermentation alcoolique a été découpée en 4 phases qui correspondent à des consommations en sucres de 25% de la teneur initiale. Nous avons pu ainsi observer que les trois premières phases (de 0 à 75% de sucres consommés) qui comprennent notamment les phases apiculée et alcoogène, sont très rapides et sont accomplies en deux semaines maximum. A titre de comparaison, pour une production fermière, un même niveau de consommation est atteint au plus tôt à 45 jours. Néanmoins, la dernière phase de consommation des sucres est la plus lente et peut durer quelques semaines. Dans ce cas des cuves industrielles, la fermentation alcoolique a été systématiquement accompagnée d'une fermentation malolactique, elle aussi très rapide (réalisée en moins d'un mois). Ces deux transformations sont simultanées dès les premiers jours après mise en cuve du moût de pommes après une très courte phase de latence (1 à 4 jours).



Une production artisanale de cidres à distiller a été aussi étudiée. Elle s'est caractérisée par de très fortes différences suivant l'année d'étude. Néanmoins, sur ces deux années, les mêmes cuves ont été utilisées (80 hL – de dimension équivalente à celle de la production fermière), les teneurs initiales en sucres étaient très proches (avoisinant les 85 g/L) et le moût initial était relativement riche en acide malique (de 2 à 3,5 g/L). Ces deux années se sont soldées par un non-achèvement de la fermentation alcoolique, le cidre final possédant des concentrations résiduelles en sucres de l'ordre de 12 à 13 g/L. Ce phénomène a pu être expliqué par l'exposition des cuves situées dehors et à l'ombre à un moment de l'année où des températures négatives peuvent être enregistrées. Lors de ces deux années, la première phase de consommation des sucres a été relativement rapide (moins d'une dizaine de jours), mais elle a été suivie par un ralentissement important de la fermentation alcoolique. La première année, une consommation tardive d'acide malique concomitante à une apparition d'acide lactique a pu être observée ; néanmoins l'acide malique n'a pas été totalement dégradé et une teneur avoisinant les 1,6 g/L a été déterminée dans le dernier prélèvement. Lors de la 2<sup>ème</sup> année, une fermentation malolactique a eu lieu très rapidement après mise en cuve du jus de pommes (comportement similaire à celui des cuves industrielles). Néanmoins, cette transformation semble avoir activé la consommation des sucres par les bactéries lactiques (cas supposé de « piqûre lactique ») et ainsi engendré une très forte présence en acide lactique dans le cidre à distiller final (de l'ordre de 6 g/L). Ces désordres ont sans doute conduit à l'arrêt de la fermentation alcoolique par la suite.

Les moûts de pommes non-fermentés utilisés pour élaborer les cidres à distiller sont caractérisés par de très faibles teneurs en composés volatils. 5 composés principaux y ont néanmoins été remarqués : le 2-phényléthanol, les isopentanol, l'acétoïne, l'hexanol et le butanol. De son côté, la fermentation alcoolique permet un accroissement très important de leur concentration (augmentation d'un facteur 20 à 25 pour le 2-phényléthanol et les isopentanol) entre la mise en cuve du jus et le cidre à distiller.

Les cidres à distiller pour les cuves où une fermentation malolactique a eu lieu contiennent des proportions plus importantes en acides carboxyliques

(acides propanoïque, isobutyrique, butanoïque, 2-méthylbutanoïque, hexanoïque, octanoïque). Ils sont, de plus, riches en acides organiques ou dérivés tels que l'acide acétique, le lactate d'éthyle, le succinate d'éthyle et le succinate d'éthyle et de 3-méthylbutyle. Les alcools supérieurs (isobutanol, isopentanol) ainsi que d'autres alcools issus de la métabolisation des acides aminés par les levures (2-phényléthanol et méthionol) se retrouvent en quantité relativement équivalentes dans les cidres à distiller des cuves ayant réalisées ou non une fermentation malolactique.

Les cidres à distiller où une fermentation alcoolique seule a été opérée contiennent pour leur part des concentrations beaucoup plus importantes en acétoïne, butanol et hexanol. Il est possible de penser que les bactéries lactiques présentes lors de la fermentation malolactique dégradent fortement l'acétoïne et que cette dégradation n'est que peu réalisée en l'absence de cette fermentation. Ils se caractérisent aussi par des teneurs plus importantes en acétates (acétate de 2-phényléthyle et de 3-méthylbutyle).

Les acétates sont produits dans un premier temps de façon plus importante au cours d'une fermentation alcoolique accompagnée d'une fermentation malolactique. Cependant, leur quantité tend à diminuer en fin de fermentation malolactique à cause certainement des activités estérase des bactéries lactiques.

La production d'acides carboxyliques est relativement régulière dans le cas d'une fermentation alcoolique seule. Une fermentation malolactique opérée en simultané tend dans un premier temps à inhiber leur apparition puis dans un deuxième temps (fin de fermentation alcoolique) à laisser un terrain très favorable à leur développement. Ce phénomène a été aussi observé pour l'acide acétique ; ce dernier se retrouve en forte proportion après une FML à cause potentiellement de la présence de bactéries acétiques ou de la transformation par les bactéries lactiques d'acide lactique. De la même façon, les dérivés volatils des acides lactique et succinique tendent à apparaître busquement en fin de fermentation malolactique du fait d'une proportion importante en éthanol et isopentanol.

L'apparition d'alcools supérieurs dans les cuves de cidres à distiller semble être intimement liée au type de levures utilisées pour mener la fermentation alcoolique. Il semble néanmoins que leur croissance dans le produit puisse être légèrement ralentie au plus fort de l'activité des bactéries lactiques dans le cas de fermentations simultanées

La composition volatile du cidre à distiller est ainsi très dépendante des vitesses de fermentation et de l'occurrence ou non d'une fermentation malolactique au cours du procédé d'élaboration. Elle peut avoir une incidence directe sur la composition du Calvados en sortie d'alambic et sur sa qualité organoleptique.

En guise d'ultime conclusion à ce travail nous pouvons émettre l'hypothèse que la tenue d'une fermentation malolactique n'est pas indispensable pour les cidres à distiller. Un travail complémentaire d'évaluation sensorielle permettrait de vérifier cette hypothèse. Cependant, nous avons pu montrer que la fermentation malolactique, s'il elle a lieu au cours du procédé d'élaboration, doit être relativement encadrée. Une fermentation malolactique trop vite achevée pendant la fermentation alcoolique semble être un facteur d'apparition prématurée de composé volatil reconnu pour être à l'origine de défauts aromatiques (phénols volatils, acides carboxyliques) voire même d'arrêt de la fermentation alcoolique.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abfi, and Wwww.Abfi.Ie (2011). "The Irish Cider Industry". Alcohol Beverage Federation of Ireland
- Alexandre H., Costello P.J., Remize F., Guzzo J. and Guilloux-Benatier M. (2005). "Saccharomyces cerevisiae–Oenococcus oeni interactions in wine: current knowledge and perspectives." *Int. J. Food Microbiol.* **93**(2): 141-154.
- Alonso-Salces R.M., Guyot S., Herrero C., Berrueta L.A., Drilleau J-F., Gallo B. and Vicente F. (2005). "Chemometric classification of Basque and French ciders based on their total polyphenol contents and CIELab parameters." *Food Chem.* **91**: 91-98.
- Alonso-Salces R.M., Guyot S., Herrero C., Berrueta L.A., Drilleau J.F., Gallo B. and Vicente F. (2004). "Chemometric characterisation of Basque and French ciders according to their polyphenolic profiles." *Anal. Bioanal. Chem.* **379**: 464-475.
- Alonso-Salces R.M., Herrero C., Barranco A., Lopez-Marquez D.M., Berrueta L.A., Gallo B. and Vicente F. (2006). "Polyphenolic compositions of Basque natural ciders : a chemometric study." *Food Chem.* **97**: 438-446.
- Antalick G., Perello M-C. and De Revel G. (2010). "Development, validation and application of a specific method for the quantitative determination of wine esters by headspace-solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry." *Food Chem.* **121**: 1236-1245.
- Arias Abrodo P., Margolles Cabrales I., Mangas Alonso J.J. and Blanco-Gomis D. (2005). "Fatty acid composition of cider obtained either by traditional or controlled fermentation." *Food Chem.* **92**: 183-187.
- Arthurs C.E. and Lloyd D. (1999). "Kinetics, stereospecificity and expression of the malolactic enzyme." *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(8): 3360-3363.
- Bartolozzi F., Bertazza G., Bassi D. and Cristoferi G. (1997). "Simultaneous determination of soluble sugars and organic acids as their trimethylsilyl derivatives in apricot fruits by gas-liquid chromatography." *J. Chrom. A* **758**(1): 99-107.
- Bartowsky E.J. and Henschke P.A. (2008). "Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine - a review." *Int. J. Food Microbiol.* **125**: 60-70.
- Bauer R., Cowan D.A. and Crouch A. (2010). "Acrolein in wine: importance of 3-hydroxypropionaldehyde and derivatives in production and detection." *J. Agric. Food Chem.* **58**: 3243-3250.
- Beech F.W. (1972). "Cider making and cider research : a review." *J. Inst. Brew.* **78**: 477-491.
- Beech F.W. (1993). Yeast in cider-making. The Yeasts. A. Press. NY. 5, Yeast Technology: 169-213.
- Blanco Gomis D., Gutierrez Alvarez M.D., Mangas Alonso J.J. and Noval Vallina A. (1988). "Determination of sugars and alcohols in apple juice and cider by High Performance Liquid Chromatography." *Chromatographia* **25**(8): 701-706.

- Blanco Gomis D., Gutierrez M.D. and Moran M.J. (1991). "Analytical control of cider production by two technological methods." *J. Inst. Brew.* **97**: 453-456.
- Blanco Gomis D., Herrero-Sanchez I. and Mangas J.J. (1998). "Characterization of apple cider cultivars using data from high-performance liquid chromatography and flow injection analysis." *The Analyst* **123**: 1187-1191.
- Blanco Gomis D., Mangas Alonso J.J., Margolles Cabrales I. and Arias Abrodo P. (2001). "Gas chromatography analysis of total fatty acids in cider." *J. Agric. Food Chem.* **49**: 1260-1263.
- Blanco Gomis D., Mangas Alonso J.J., Margolles Cabrales I. and Arias Abrodo P. (2002). "Characterization of cider apples on the basis of their fatty acid profiles." *J. Agric. Food Chem.* **50**: 1097-1100.
- Blanco Gomis D., Moran M.J., Gutierrez M.D. and Mangas J.J. (1988). "Application of HPLC to characterization and control of individuals acids in apples extracts on ciders." *Chromatographia* **25**: 1054-1058.
- Blanco Gomis D., Muro Tamayo D. and Mangas Alonso J.J. (2003). "Evolution of sugars in cider brandy aged in oak barrels: contribution to its characterization." *J. Agric. Food Chem.* **51**: 923-926.
- Bozoglu T.F. and Yurdugül S. (2004). Malolactic fermentation. Encyclopedia of food microbiology. A. Press: 2311-2316.
- Buron N., Coton M., Desmarais C., Ledauphin J., Guichard H., Barillier D. and Coton E. (2011). "Screening of representative cider yeasts and bacteria for volatile phenol-production ability." *Food Microbiol.* **acceptée**.
- Buron N., Guichard H., Coton E., Ledauphin J. and Barillier D. (2011). "Evidence of 4-ethylcatechol as one of the main phenolic off-flavour markers in French Ciders." *Food Chem.* **125**(2): 542-548.
- Cabranes C. and Mangas J.J. (1996). "Controlled production of cider by induction of alcoholic fermentation and malolactic conversion." *J. Inst. Brew.* **102**: 103-109.
- Cabranes C., Mangas J.J. and Blanco D. (1997). "Selection and biochemical characterization of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* strains isolated from spanish cider." *J. Inst. Brew.* **103**: 165-169.
- Cabranes C., Moreno J. and Mangas J.J. (1991). "Aspectos microbiologicas y bioquimicos de la elaboracion de sidra natural en lagares asturianos." *Acta Alim.* **221**: 63-69.
- Calleja A. and Falqué E. (2005). "Volatile composition of Mencia wines." *Food Chem.* **90**: 357-363.
- Carr J.G. (1959). "Some special characteristics of cider *Lactobacilli*." *J. Appl. Microbiol.* **22**: 165-169.
- Carr J.G. and Davies P.A. (1970). "Homofermentative *Lactobacilli* of ciders including *Lactobacillus mali* nov.spec. ." *J. Appl. Bacteriol.* **33**: 768.
- Caspritz G. and Radler F. (1983). "Malolactic enzyme of *Lactobacillus plantarum*." *J. Biol. Chem.* **258**(25): 4907-4910.

- Castiñeira A.M., Peña R., Herrero C. and Garcia-Martin S. (2002). "Analysis of Organic Acids in Wine by Capillary Electrophoresis with Direct UV Detection." *J. Food Comp. Anal.* **15**: 319-331.
- Chinnici F., Spinabelli U., Riponi C. and Amati A. (2005). "Optimization of the determination of organic acids and sugars in fruit juices by ion-exclusion liquid chromatography." *J. Food Comp. Anal.* **18**: 121-130.
- Claisse O. and Lonvaud-Funel A. (2000). "Assimilation of glycerol by a strain of *Lactobacillus collinoides* isolated from cider." *Food Microbiol.* **17**: 513-519.
- Coton E. and Coton M. (2003). "Microbiological origin of "framboisé" in French ciders." *J. Inst. Brew.* **109**(4): 299-304.
- Coton E., Coton M., Levert D., Casaregola S. and Sohier D. (2006). "Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations." *Int. J. Food Microbiol.* **108**: 130-135.
- Coton M., Laplace J.M., Guichard H. and Coton E. (2008). "Factors affecting *Zymomonas mobilis* subsp. *francensis* growth and acetaldehyde production." *J. Inst. Brew.* **114**(2): 114-121.
- Cox D.J. and Henick-Kling T. (1989). "The malolactic fermentation: a chemiosmotic energy-yielding (ATP) decarboxylation reaction." *J. Bacteriol.* **171**: 5750-5752.
- De Quiros A.R., Lage-Yusty M.A. and Lopez-Hernandez J. (2009). "HPLC analysis of organic acids using a novel stationary phase." *Talanta* **78**(2): 643-646.
- De Revel G., Martin N., Pripis Nicolau L., Lonvaud-Funel A. and Bertrand A. (1999). "Contribution to the knowledge of malolactic fermentation influence on wine aroma." *J. Agric. Food Chem.* **47**: 4003-4008.
- De Vuyst L. and Degeest B. (1999). "Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria." *FEMS Microbiol. Rev.* **23**: 153-177.
- Del Campo G., Santos J.I., Berregi I., Velasco S., Ibarburu I., Dueñas M.T. and Irastorza A. (2003). "Ciders produced by two types of presses and fermented in stainless steel and wooden vats." *Inst. Guild Brew.* **109**(4): 342-348.
- Dueñas M., Irastorza A., Fernandez A., Bilbao A. and Huerta A. (1994). "Microbial populations and malolactic fermentation of apple cider using traditional and modified methods." *J. Food Sci.* **59**(5): 1060-1064.
- Dueñas M., Irastorza A., Fernandez K. and Bilbao A. (1995). "Heterofermentative *Lactobacilli* causing ropiness in Basque Country ciders." *J. Food Prot.* **58**: 76-80.
- Escobal A., Iriondo C., Laborra C., Elejalde E. and Gonzalez I. (1998). "Determination of acids and volatile compounds in red Txakoli wine by high-performance liquid chromatography and gas chromatography." *J. Chrom. A* **823**: 349-354.
- Fan W., Xu Y. and Yu A. (2006). "Influence of oak chips geographical origin, toast level, dosage and aging time on volatile compounds of apple cider." *J. Inst. Brew.* **112**(3): 255-263.
- Gagné S., Lucas P.M., Perello M.C., Claisse O., Lonvaud-Funel A. and De Revel G. (2010). "Variety and variability of glycosidase activities in an *Oenococcus oeni* strain

- collection tested with synthetic and natural substrates." *J. Appl. Microbiol.* **110**: 218-228.
- Garai-Ibabe G., Ibarburu I., Berregi I., Claisse O., Lonvaud-Funel A., Irastorza A. and Dueñas M.T. (2008). "Glycerol metabolism and bitterness producing lactic acid bacteria in cidermaking." *Int. J. Food Microbiol.* **121**: 253-261.
- Gil J.V., Mateo J.J., Jimenez M., Pastor A. and Huerta T. (1996). "Aroma compounds in wine as influenced by apiculate yeasts." *J. Food Sci.* **61**: 1247-1249.
- Giudici P., Romano P. and Zambonelli C. (1990). "A biometric study of higher alcohol production in *Saccharomyces cerevisiae*." *Can. J. Microbiol.* **36**: 61-64.
- Herraiz T., Reglero G., Herraiz M., Martin Alvarez P.J. and Cabezudo M.D. (1990). "The influence of the yeast and type of culture on the volatile composition of wines fermented without sulphur dioxide." *Am. J. Enol. Vitic.* **41**: 313-318.
- Herrero M., Cuesta I., Garcia L.A. and Diaz M. (1999 a). "Changes in organic acids during malolactic fermentation at different temperatures in yeast-fermented apple juice." *J. Inst. Brew.* **105**(3): 191-195.
- Herrero M., De La Roza C., Garcia L.A. and Diaz M. (1999 b). "Simultaneous and sequential fermentations with yeast and lactic acid bacteria in apple juice." *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 48-51.
- Herrero M., Garcia L.A. and Diaz M. (1999 c). "Organic acids in cider with simultaneous inoculation of yeast and malolactic bacteria : effect of fermentation temperature." *J. Inst. Brew.* **105**(4): 229-232.
- Herrero M., Garcia L.A. and Diaz M. (2003 a). "The effect of SO<sub>2</sub> on the production of ethanol, acetaldehyde, organic acids and flavor volatiles during industrial cider fermentation." *J. Agric. Food Chem.* **51**: 3455-3459.
- Herrero M., Garcia L.A. and Diaz M. (2006). "Volatile compounds in cider: inoculation time and fermentation temperature effects." *J. Inst. Brew.* **112**(3): 210-214.
- Herrero M., Laca A., Garcia L.A. and Diaz M. (2001). "Controlled malolactic fermentation in cider using *Oenococcus oeni* immobilized in alginate beads and comparison with free cell fermentation." *Enzyme and micro. tech.* **28**: 35-41.
- Herrero M., Noriega E. and Garcia L.A. (2005). "Influence of a malolactic starter on the quality of the cider produced on an industrial scale." *Eur. Food Res. Technol.* **221**: 168-174.
- J. Off. Repub. Fr. (1963). Décret du 10 avril 1963 concernant les eaux-de-vie de cidre, de poire à appellations réglementées de Normandie, de Bretagne et du Maine INAO.
- J. Off. Repub. Fr. (1987). Décret relatif à l'orientation de la production cidricole et à la commercialisation des cidres et des poirés. n° 87-600.
- J. Off. Repub. Fr. (2009). Décret n° 2009-1350 du 29 octobre 2009 relatif aux appellations d'origine contrôlées « Martinique », « Marc d'Alsace » suivie de la dénomination « Gewurztraminer », « Calvados », « Calvados Domfrontais », « Calvados Pays d'Auge », « Cornouaille », « Domfront », « Pays d'Auge », « Pommeau du Maine » et « Pommeau de Normandie ». n° 0254, texte 9.

- Jarvis B. (2003). Chemistry and microbiology of cidermaking. Encyclopedia of food sciences and nutrition. E. S. Ltd.: 1318-1323.
- Jarvis B. (2004). Cider (Hard Cider). Encyclopedia of food microbiology. A. Press: 421-427.
- Jussier D., Dubé Morneau A. and Mira De Orduna R. (2006). "Effect of simultaneous inoculation with yeast and bacteria on fermentation kinetics and key wine parameters of cool-climate chardonnay." *Appl. Environ. Microbiol.* **72**(1): 221-227.
- Kaneuchi C., Seki M. and Komagatak. (1988). "Production of succinic acid and citric acid and related acids by *Lactobacillus* strains." *Appl. Environ. Microbiol.* **54**(12): 3053-3056.
- Keller S.E., Chirtel S.J., Merker R.I., Taylor K.T., Tan H.L. and Miller A.J. (2004). "Influence of fruit variety, harvest technique, quality sorting and storage on the native microflora of unpasteurized apple cider." *J. Food Prot.* **67**(10): 2240-2247.
- Kerem Z., Bravdo B., Shoseyov O. and Tugendhaft Y. (2004). "Rapid liquid chromatography-ultraviolet determination of organic acids and phenolic compounds in red wine and must." *J. Chrom. A* **1052**: 211-215.
- Kritsunankul O., Pramote B. and Jakmunee J. (2009). "Flow injection on-line dialysis coupled to high performance liquid chromatography for the determination of some organic acids in wine." *Talanta* **79**(4): 1042-1049.
- Lafon-Lafourcade S., Geneix C. and Ribereau-Gayon P. (1984). "Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeasts and their elimination by yeast ghosts " *Appl. Env. Microbiol.* **47**: 1246.
- Lambrechts M.G. and Pretorius I.S. (2000). "Yeast and its importance to wine aroma – a review." *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **21**(special issue): 97-129.
- Laplace J-M., Apery S., Frère J. and Auffray Y. (1998). "Incidence of indigenous microbial flora from ustensils and surrounding air in traditional french cider making." *J. Inst. Brew.* **104**: 71-74.
- Larpin S., Sauvageot N., Pichereau V., Laplace J-M. and Auffray Y. (2002). "Biosynthesis of exopolysaccharide by a *Bacillus licheniformis* strain isolated from ropy cider." *Int. J. Food Microbiol.* **77**: 1-9.
- Le Queré J.M., Bauduin R. and Baron A. (2010). Elaboration des jus de pommes et des cidres. Techniques de l'Ingénieur. Procédés chimie-bio-agro.
- Le Queré J.M., Husson F., Renard C.M.G.C. and Primault J. (2006). "French cider characterization by sensory, technological and chemical evaluations." *LWT - Food Sci. Technol.* **39**: 1033-1044.
- Lea A. (2008). Craft Cider Making, Good Life Press.
- Lea A.G.H. and Drilleau J-F. (1995). Cidermaking. Fruit processing. B. A. Professional. London: 59-87.
- Ledauphin J. (2003). Thèse de doctorat Caractérisation chimique et sensorielle de Calvados "sortie-alambic". Sciences physiques mention chimie analytique. Université de Caen Basse-Normandie.



- Ledauphin J., Le Milbeau C., Barillier D. and Hennequin D. (2010). "Differences in volatile composition of french labeled brandies (Armagnac, Cognac, Calvados and Mirabelle) using GC-MS and PLS-DA." *J. Agric. Food Chem.* **58**: 7782-7793.
- Ledauphin J., Lefrançois A., Marquet N. and Barillier D. (2006). "Development of an accurate and sensitive gas chromatographic method for the determination of acrolein content in Calvados and cider." *LWT* **39**: 1045-1052.
- Ledauphin J., Saint-Clair J-F., Lablanquie O., Guichard H., Fournier N., Guichard E. and Barillier D. (2004). "Identification of trace volatile compounds in freshly distilled Calvados and Cognac using preparative separations coupled with gas chromatography-mass spectrometry." *J. Agric. Food Chem.* **52**: 5124-5134.
- Leguerinel I., Mafart P., Cleret J.J. and Bourgeois C. (1989). "Yeast strain and kinetic aspects of the formation of flavour components in cider." *J. Inst. Brew.* **95**: 405-409.
- Lilly M., Lambrechts M.G. and Pretorius I.S. (2000). "Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates." *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(2): 744-753.
- Liu S.-Q. and Pilone G. (2000). "An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications." *Int. J. Food Sci. Tech.* **35**: 49-61.
- Liu S.Q. and Pilone G. (2000). "An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications." *Int. J. Food Sci. Tech.* **35**: 49-61.
- Lonvaud-Funel A. and Strasser De Saad A.M. (1982). "Purification and properties of a malolactic enzyme from a strain of *Leuconostoc mesenteroides* isolated from grapes." *Appl. Environ. Microbiol.* **43**(2): 357-361.
- Mangas J.J., Cabranes C., Moreno J. and Blanco Gomis D. (1994). "Influence of cider-making technology on cider taste." *LWT* **27**: 583-586.
- Mangas J.J., Gonzalez M., Rodriguez R. and Blanco Gomis D. (1996). "Solid-phase extraction and determination of trace aroma and flavour components in cider by GC-MS." *Chromatographia* **42**(1/2): 101-105.
- Mangas J.J., Rodriguez R., Moreno J. and Blanco Gomis D. (1996). "Volatiles in distillates of cider aged in American oak wood." *J. Agric. Food Chem.* **44**: 268-273.
- Margalith P.Z. (1981). *Flavour microbiology*. Springfield, Charles C. Thomas.
- Massiot P., Le Quéré J.M. and Drilleau J-F. (1994). "Biochemical characteristics of apple juices and fermented products from musts obtained enzymatically." *Fruit Processing* **4**: 108-113.
- Mato I., Suarez-Luque S. and Huidobro J.F. (2005). "A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines." *Food Res. Int.* **38**: 1175-1188.
- Matthews A., Grbin P.R. and Jiranek V. (2007). "Biochemical characterisation of the esterase activities of wine lactic acid bacteria." *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 329-337.

- Maugenet J. (1962). "Métabolisme de l'acide lactique par *Acetobacter* dans les cidres "framboisés"." *C.R. Acad. Agri.* **48**: 214-217.
- Mauricio J.C., Moreno J., Luis Z., Ortega J.M. and Medina M. (1997). "The effect of grape must fermentation conditions on volatile alcohols and esters formed by *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Sci. Food Agric.* **75**: 155-160.
- Mercasa (2008). "Alimentacion en España,". Informacion por sectores
- Michel A. (1988). Production du cidre à la ferme. Pomme. 17, 9, 12.
- Morales M.L., Gustavo Gonzalez A. and Troncoso A.M. (1998). "Ion-exclusion chromatographic determination of organic acids in vinegars." *J. Chrom. A* **822**: 45-51.
- Morrissey W.F., Davenport B., Querol A. and Dobson A.D.W. (2004). "The role of indigenous yeasts in traditional Irish cider." *J. Appl. Microbiol.* **97**: 647-655.
- Nacm (2010). "International Facts".
- Nedovic V.A., Durieux A., Van Nederveelde L., Rosseels P., Vandegans J., Plaisnant A.M. and Simon J.-P. (2000). "Continuous cider fermentation with co-immobilized yeast and *Leuconostoc oenos* cells." *Enz. Micro. Technol.* **26**: 834-839.
- Nguyen H.V. and Panon G. (1998). "La levure *Metschnikowia pulcherrima* exerce un effet inhibiteur sur différentes espèces de levures " *Sci. Alim.* **18**(5): 515-526.
- Nielsen J.C. and Richelieu M. (1999). "Control of flavor development in wine during and after malolactic fermentation by *Oenococcus oeni*." *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(2): 740-745.
- Nogueira A. (2003). Thèse de doctorat Tecnologia de processamento sidricola: efeitos de oxigenio e do nitrogênio na fermentação lenta de sidra. Universidade Federal do Parana.
- Nogueira A., Le Queré J.M., Gestin P., Michel A., Wosiacki G. and Drilleau J.F. (2008). "Slow fermentation in french cider processing due to partial biomass reduction." *J. Inst. Brew.* **114**(2): 102-110.
- Nogueira A., Mongruel C., Silva Simoes D.R., Waszczynskyj N. and W. G. (2007). "Effect of biomass reduction on the fermentation cider." *Braz. archives of bio. and techn.* **50**(6): 1083-1092.
- Oiv (2006). Recueil des méthodes internationales d'analyses des vins et des moûts. Paris, OIV.
- Osborne J.P., Mira De Orduña R., Pilone G.J. and Liu S.Q. (2000). "Acetaldehyde metabolism by wine lactic acid bacteria." *FEMS Microbiol. letters* **191**: 51-55.
- Pando Bedriñana R., Querol Simon A. and Suarez Valles B. (2010). "Genetic and phenotypic diversity of autochthonous cider yeasts in a cellar from Asturias." *Food Microbiol.* **27**: 503-508.
- Peres R.G., Moraes E.P., Micke G.A., Tonin F.G., Tavares M.F.M. and Rodriguez-Amaya D.B. (2009). "Rapid method for the determination of organic acids in wine by capillary electrophoresis with indirect UV detection." *Food Control* **20**: 548-552.

- Perez-Ruiz T., Martinez-Lozano C., Tomas V. and Martin J. (2004). "High-performance liquid chromatographic separation and quantification of citric, lactic, malic, oxalic and tartaric acids using a post-column photochemical reaction and chemiluminescence detection." *J. Chrom. A* **1026**(1-2): 57-64.
- Picinelli A., Suarez B., Moreno J., Rodriguez R., Caso-Garcia L.M. and Mangas J.J. (2000). "Chemical Characterization of Asturian Cider." *J. Agric. Food Chem.* **48**: 3997-4002.
- Pilone G.J. and Kunkee R.E. (1976). "Stimulatory effect of malo-lactic fermentation on the growth rate of *Leuconostoc oenos*." *Appl. Environ. Microbiol.* **32**: 405-408.
- Plata C., Millan C., Mauricio J.C. and Ortega J.M. (2003). "Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts." *Food Microbiol.* **20**: 217-224.
- Pollard A., Kieser M. E. and Beech F.W. (1966). "Factors influencing the flavour of cider : the effect of fermentation treatments on fusel oil production." *J. Appl. Bacteriol.* **29**(2): 253-259.
- Pozo-Bayon M.A., G-Alegriäa E., Polo , Tenorio ., Martiän-Aä Lvarez P. J., Calvo De La Banda M. T., Ruiz-Larrea F. and Moreno-Arribas M. V. (2005). "Wine volatile and amino acid composition after malolactic fermentation: effect of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* starter cultures." *J. Agric. Food Chem.* **53**: 8729-8735.
- Rankine B.C. (1967). "Formation of higher alcohols by wine yeasts, and relationship to taste thresholds." *J. Sci. Food Agric* **18**: 583-589.
- Revilla I. and Gonzalez San-José M.L. (1998). "Methanol release during fermentation of red grapes treated with pectolytic enzymes." *Food Chem.*, **63**(3): 307-312.
- Ribereau-Gayon J., Peynaud E., Ribereau-Gayon P. and Sudraud P. (1975). *Traité d'oenologie : Sciences et techniques du vin.*
- Rodriguez Madrera R., Garcia Hevia A., Palacios Garcia N. and Suarez Valles B. (2008). "Evolution of aroma compounds in sparkling ciders." *LWT* **41**: 2064-2069.
- Rodriguez Madrera R., Palacios Garcia N., Garcia Hevia A. and Suarez Valles B. (2005). "Application of purge and trap extraction and gas chromatography for determination of minor esters in cider." *J. Chrom. A* **1069**: 245-251.
- Rodriguez Madrera R., Picinelli Lobo A. and Mangas Alonso J.J. (2010). "Effect on cider maturation on the chemical and sensory characteristics of fresh cider spirits." *Food Research Int.* **43**: 70-78.
- Rodriguez Madrera R., Suarez Valles B., Garcia Hevia A., Garcia Fernandez O., Fernandez Tascon N. and Mangas Alonso J.J. (2006). "Production and composition of cider spirits distilled in "Alquitara"." *J. Agric. Food Chem.* **54**: 9992-9997.
- Saerens S.M., Verstrepen K.J., Van Laere S.D.M., Voet A.R.D., Van Dijck P. and Delvaux F.R. (2006). "The *Saccharomyces cerevisiae* EHT1 and EEB1 genes encode novel enzymes with medium-chain fatty acid ethyl ester synthesis and hydrolysis capacity." *J. Biologic. Chem.* **281**(7): 4446-4456.
- Salih A.G., Drilleau J-F., Cavin F.F., Divies C. and B. C.M. (1988). "A survey of microbiological aspects of the cider making." *J. Inst. Brew.* **94**: 5-8.

- Sanchez A., Rodriguez R., Coton M., Coton E., Herrero M., Garcia L.A. and Diaz M. (2010). "Population dynamics of lactic acid bacteria during spontaneous malolactic fermentation in industrial cider." *Food Res. Int.* **43**: 2101-2107.
- Santalad A., Teerapornchaisit P., Burakham R. and Srijaranais. (2007). "Capillary zone electrophoresis of organic acids in beverages." *LWT* **40**: 1741-1746.
- Sauvageot N., Goufffi K., Laplace J.M. and Auffray Y. (2000). "Glycerol metabolism in *Lactobacillus collinoides*: production of 3-hydroxypropionaldehyde, a precursor of acrolein." *Int. J. Food Microbiol.* **55**: 167-170.
- Scanes K.T., Hohmann S. and Prior B.A. (1998). "Glycerol production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its relevance to wine: a review." *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **19**(1): 17-24.
- Schulthess D. and Ettlinger L. (1978). "Influence of the concentration of branched chain amino acids on the formation of fusel alcohols." *J. Inst. Brew.* **84**: 240-243.
- Schumacher K., Asche S., Heil M., Mittelstadt F., Dietrich H. and Mosandl A. (1998). "Methyl-branched flavor compounds in fresh and processed apples." *J. Agric. Food Chem.* **46**: 4496-4500.
- Shui G. and Leong L.P. (2002). "Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography." *J. Chrom. A* **977**: 89-96.
- Suarez Valles B., Palacios Garcia N., Rodriguez Madrera R. and Picinelli Lobo A. (2005). "Influence of yeast strain and aging time on free amino acid changes in sparkling ciders." *J. Agric. Food Chem.* **53**: 6408-6413.
- Suarez Valles B., Pando Bedriñana R., Fernandez Tascon N., Gonzalez Garcia A. and Rodriguez Madrera R. (2005). "Analytical differentiation of cider inoculated with yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) isolated from Asturias (Spain) apple juice." *LWT* **2005**: 455-461.
- Suarez Valles B., Pando Bedriñana R., Fernandez Tascon N., Querol Simon A. and Rodriguez Madrera R. (2007). "Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider." *Food Microbiol.* **24**: 25-31.
- Sumby K.M., Grbin P.R. and Jiranek V. (2010). "Microbial modulation of aromatic esters in wine: current knowledge and future prospects." *Food Chem.* **121**: 1-16.
- Swaffield C.H. and Scott J.A. (1995). "Existence and development of natural microbial populations in wooden storage vats used for alcoholic cider maturation." *J. Am. Soc. Brew.* **53**: 117-120.
- Swaffield C.H., Scott J.A. and Jarvis B. (1997). "Observations on the microbial ecology of traditional alcoholic cider storage vats." *Food Microbiol.* **14**: 353-361.
- Syndicat De Promotion Et De Défense Du Cidre Aoc Pays D'auge (1996). Cahier des charges de l'appellation d'origine contrôlée "Pays d'Auge". Interprofession des produits cidricoles, Journal Officiel.
- Tezcan F., Gültekin-Özgülven M., Diken T., Özçelik B. and Bedia Erim F. (2009). "Antioxidant activity and total phenolic, organic acid and sugar content in commercial pomegranate juices." *Food Chem.* **115**: 873-877.

- Valappil Z.A., Fan X., Zhang H.Q. and Rouseff R.L. (2009). "Impact of thermal and nonthermal processing technologies on unfermented apple cider aroma volatiles." *J. Agric. Food Chem.* **57**: 924-929.
- Van Del Dool H. and Kratz P. (1963). "A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography." *J. Chromatogr.* **11**: 463-471.
- Vérette E., Qian F. and Mangani F. (1995). "On-line dialysis with high-performance liquid chromatography for the automated preparation and analysis of sugars and organic acids in foods and beverages." *J. Chrom. A* **705**: 195-203.
- Versini G., Franco M.A., Moser S., Barchetti P. and Manca G. (2009). "Characterisation of apple distillates from native varieties of Sardinia island and comparison with others Italian products." *Food Chem.* **113**: 1176-1183.
- Vidrih R. and Hribar J. (1999). "Synthesis of higher alcohols during cider processing." *Food Chem.* **67**: 287-294.
- Viegas C.A., Rosa M.F., Correia I.S.A. and Novais J.M. (1989). "Inhibition of yeast growth by octanoic and decanoic acids produced during ethanol fermentation." *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 21-28.
- Walling E., Gindreau E. and Lonvaud-Funel A. (2005). "A putative glucan synthase gene dps detected in exopolysaccharide-producing *Pediococcus damnosus* and *Oenococcus oeni* strains isolated from wine and cider." *Int. J. Food Microbiol.* **98**(1): 53-62.
- Wang D., Xu Y., Hu J. and Zhao G. (2004). "Fermentation kinetics of different sugars by apple wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Inst. Brew.* **110**(4): 340-346.
- Wang L., Xu Y., Zhao G. and Li J. (2004). "Rapid analysis of flavor volatiles in apple wine using headspace solid-phase microextraction." *Inst. Guild Brew.* **110**(1): 57-65.
- Whiting G.C. (1976). "Organic acid metabolism of yeast during fermentation of alcoholic beverages. A review." *J. Inst. Brew.* **82**: 84-92.
- Wibowo D., Eschenbruch R., Davis C.R., Fleet G.H. and Lee T.H. (1985). "Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a review." *Am. J. Enol. Viti.* **36**: 302-313.
- Williams A.A. (1974). "Flavour research and the cider industry." *J. Inst. Brew.* **80**: 455-470.
- Xu Y., Fan W. and Qian M.C. (2007). "Characterization of aroma compounds in apple cider using solvent-assisted flavor evaporation and headspace solid-phase microextraction." *J. Agric. Food Chem.* **55**: 3051-3057.
- Xu Y., Zhao G.A. and Wang L.P. (2006). "Controlled formation of volatile components in cider making using combination of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora valbyensis* yeast species." *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **33**: 192-196.
- Zoecklein B.W., Fugelsang K.C., Gump B.H. and Nury F.S. (1995). Alcohol and extract. Wine analysis and production. The Chapman and Hall Enology Library: 97-114.
- Zott K., Tominaga T., Thibon C., Dubourdieu D., Lonvaud-Funel A. and Masneuf-Pomarède I. (2008). Les levures non-*Saccharomyces* : Intérêt en oenologie Rencontre technique micro-organismes et gestion thermique. IFV midi-pyrénées.





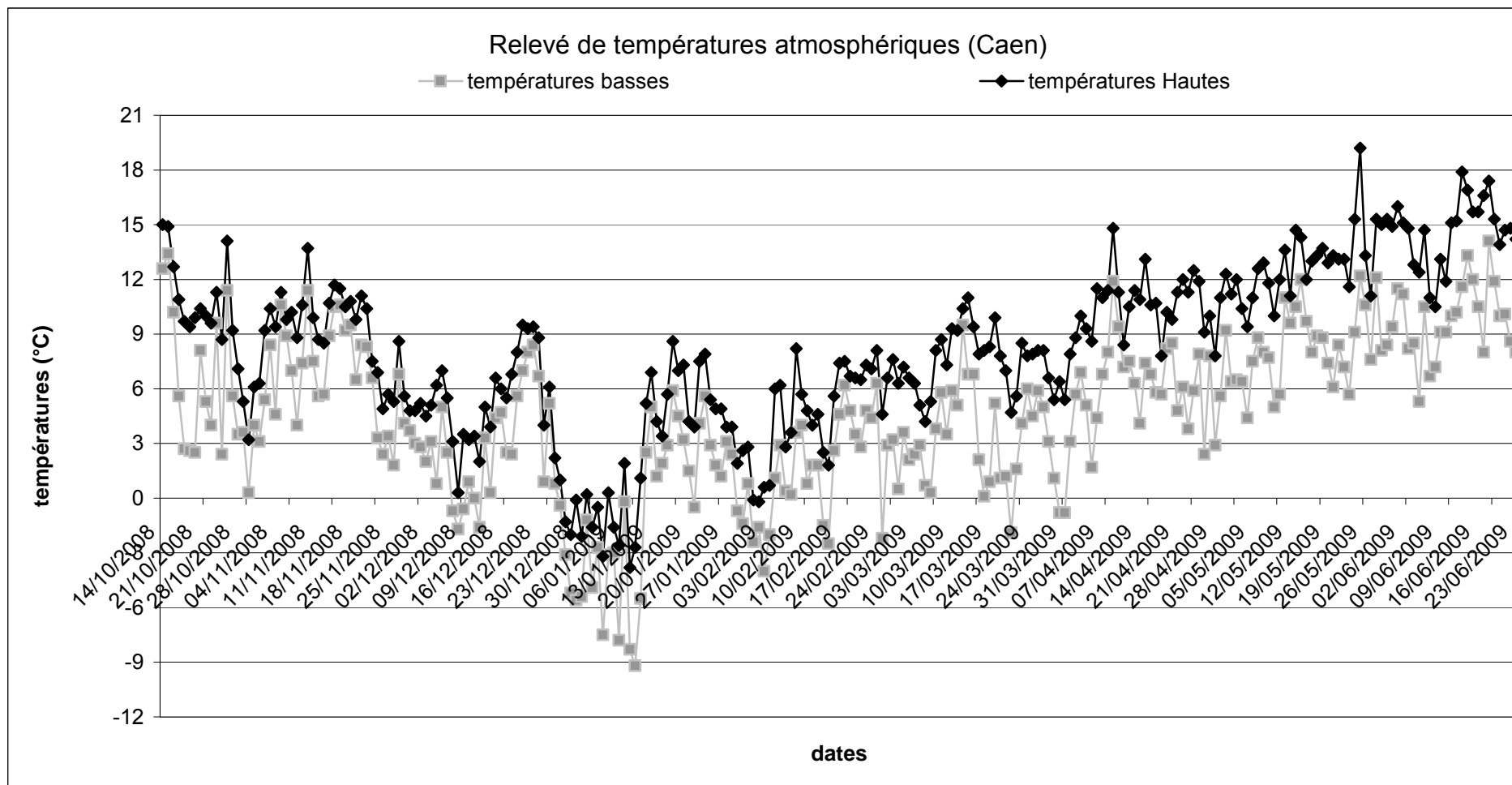
ANNEXES

Annexe 1: Unités utilisées

CFU/g	Unités formant des colonies par gramme
CFU/ mL	Unités formant des colonies par millilitre
M	Moles par litre
g/kg	Gramme par kilogramme
g/L	Gramme par litre
mg/L	Milligramme par litre
Ha	Hectare
m	mètre
cm	Centimètre
mm	Millimètre
µm	Micromètre
g	Gramme
mg	milligramme
hL	Hectolitre
L	Litre
mL	Millilitre
µL	Microlitre
mL/min	Millilitre par minute
°C	Degré Celcius



Annexe 2 : Températures relevées par la sonde MétéoFrance à Carpiquet sur la période de prélèvement de la cuve artisanale



### Préparation du distillat

Un échantillon de 20 mL de chaque cidre est introduit dans un ballon rodé de 100 mL avec quelques grains de pierre ponce et distillé (colonne de Vigreux de 20 cm avec contrôle de température à la sortie dans un réfrigérant droit) jusqu'à ce que la température de la sortie de colonne ne varie plus. Un entraînement complet des composés volatils est alors réalisé et le distillat est ainsi directement récupéré au bout d'environ une demi-heure dans une fiole de 20 mL réfrigérée par un bain de glace. Le propanol (100 µL) est ajouté au volume de la fiole comme étalon interne puis le volume complété avec de l'eau distillée après retour à la température ambiante. Cet échantillon est ensuite directement analysé par Chromatographie en Phase Gazeuse.

### Etalonnage

Des solutions hydroalcooliques étalon contenant 1%, 2%, ..., 9% d'éthanol ont été préparées dans l'eau distillée et, après ajout de 100 µL de propanol comme étalon interne, ont été elles-aussi injectés en CPG.

### Dosage de l'éthanol

Le taux d'alcool a été déterminé au moyen d'un Chromatographe en Phase Gazeuse de type Varian 3400 comportant un détecteur à ionisation de flamme (FID). La séparation de l'éthanol et de l'étalon interne est effectuée sur une colonne apolaire de type BPX-5 (commercialisée par SGE) d'une longueur de 30 m, d'un diamètre interne de 0,32 mm recouvert d'un film de phase stationnaire de 0,25 µm d'épaisseur. 0,6 µL de distillat supplémenté d'étalon interne est introduit à l'aide d'une micro-seringue dans l'injecteur chauffé à 200°C (taux de division fixé par réglage du débit de fuite à 30 mL.min<sup>-1</sup>). Le débit du gaz vecteur (H<sub>2</sub>) est fixé à 1 mL.min<sup>-1</sup>. L'analyse est menée en mode isotherme à 80°C pour une durée totale de 4 minutes. La flamme du détecteur est alimentée par un mélange d'hydrogène et d'air comprimé (200 mL.min<sup>-1</sup>). Le détecteur est maintenu à une température de 200 °C et le débit d'entrée est réglé à 20 mL.min<sup>-1</sup> par un « make up » d'azote. La colonne chromatographique subit un « cycle de nettoyage » quotidien pendant lequel sa température est portée à 220

°C pendant 2 heures. Les données analytiques sont traitées par le logiciel Varian Star et les aires des pics correspondant à l'éthanol (temps de rétention d'environ 1,24 min) et au propanol (temps de rétention d'environ 1,80 min) sont intégrées. Une aire relative est ainsi déterminée pour chaque distillat de cidre, elle permet de déterminer un pourcentage d'éthanol par lecture directe dans la droite d'étalonnage établie à partir des aires relatives obtenues pour les solutions hydroalcooliques standard.

#### Annexe 4 : Protocole de détermination de l'acidité totale et de l'acidité volatile

Selon les protocoles des méthodes officielles de l'OIV (OIV 2006), l'acidité totale a été déterminée par un dosage acido-basique au moyen de soude 0,05 M en présence de bleu de bromothymol (BBT) d'un échantillon de 20mL de cidre prélevé à la pipette. L'équivalence est marquée par le virage de la solution à une coloration marron/verte.

L'acidité volatile corrigée est déterminée en distillant préalablement un échantillon de 20 mL de cidre. Un dosage acido-basique de la totalité du distillat est réalisé par la soude à 0,05 M en présence de phénolphtaléïne.

Le SO<sub>2</sub> libre et recombinaé présent dans l'échantillon est dosé par iodométrie (protocole décrit dans le même recueil de méthodes officielles).



Annexe 5 : Composition volatile des cidres fermiers, artisanaux et industriels

phases FA	1	1	1	2	2	3	3	4	4	4	4
phases FML	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
jours	0	7	13	20	23	39	42	57	73	109	199
hexan-3-ol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
propanol	0,02	0,06	0,07	0,04	0,02	0,01	0,05	0,34	0,79	0,60	0,65
isobutanol	0,06	0,24	0,60	0,50	0,47	0,49	0,98	11,51	18,01	14,93	13,90
pent-3-èn-2-ol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>E</i> -hex-3-èn-1-ol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2-éthylhexanol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
octanol	0,00	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,00	0,08	0,09	0,00	0,00
décanol	0,01	0,02	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,09	0,18	0,24	0,32
dodécanol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
butanol	0,30	0,37	0,34	0,23	0,19	0,18	0,24	2,76	4,10	3,57	3,84
isopentanol	0,36	0,99	2,58	2,11	2,97	4,07	4,76	60,88	72,79	111,19	136,00
pentanol	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,08	0,14	0,27	0,23
hexenol	0,55	0,63	0,50	0,31	0,46	0,42	0,35	4,09	4,72	6,86	9,01
acétate de 3-méthylbutyle	0,01	0,02	0,04	0,01	0,05	0,05	0,04	0,56	0,81	1,10	1,38
hexanoate d'éthyle	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,11	0,14	0,00	0,00
acétate d'hexyle	0,00	0,08	0,10	0,07	0,08	0,06	0,04	0,55	0,54	0,47	14,49
octanoate d'éthyle	0,00	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,18	0,23	1,25	0,36
3-hydroxybutanoate d'éthyle	0,08	0,15	0,10	0,07	0,13	0,11	0,07	0,75	0,95	1,72	1,71
décanoate d'éthyle	0,00	0,02	0,01	0,02	0,05	0,03	0,02	0,35	0,00	0,66	0,67
dodécanoate d'éthyle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3-hydroxyocténoate d'éthyle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,02	0,01	0,09	0,10	0,32	0,25
tétradécanoate d'éthyle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,01	0,19	0,17	0,61	0,17
acide acétique	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,29	10,17	0,00	19,79
acide propanoïque	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
acide isobutyrique	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,35	0,34	0,46	0,00
acide butanoïque	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,83	0,78	1,24	2,45
acide 2-méthylbutanoïque	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
acide hexanoïque	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,20	0,33	0,72	0,63
acide octanoïque	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,08	1,22	0,41	0,33
acide decanoïque	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,01	0,00	0,04	0,07	0,27	0,12
acétoïne	2,28	1,11	0,52	0,29	0,28	0,22	0,18	1,51	1,15	1,17	21,74
lactate d'éthyle	0,01	0,03	0,06	0,06	0,14	0,24	0,28	4,81	6,69	12,52	30,20
diacétone	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09	0,07	0,18	0,13
2-méthylthioéthanol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
succinate d'éthyle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,19	0,46	2,59
méthionol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,03	0,00	0,00

succinate d'éthyle et de 3-méthylbutyle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
succinate de monoéthyle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,30	0,43	3,99	16,66	
acétate de 2-phényl éthyle	0,00	0,01	0,02	0,03	0,11	0,12	0,09	0,88	1,21	3,02	2,76	
alcool benzylique	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,06	0,34	0,22	0,28	
2-phényléthanol	0,04	0,43	1,09	1,30	4,21	5,09	3,37	41,12	52,33	136,57	134,12	
4-éthyl guaiacol	0,01	0,05	0,03	0,03	0,08	0,08	0,05	0,58	0,85	3,02	3,46	
octanoate de 2-phenyléthyle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
eugénol	0,00	0,07	0,05	0,09	0,25	0,10	0,05	0,48	0,69	1,72	1,78	
2-méthoxy-4-vinylphénol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
4-éthylphénol	0,02	0,08	0,04	0,06	0,00	0,00	0,10	1,23	1,95	7,52	15,06	
hexanoate de 2-phényléthyle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
2-(4-hydroxyphényl)éthanol	0,00	0,11	0,18	0,66	1,75	1,19	0,25	4,68	6,91	19,84	13,38	
terpène	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,05	0,13	0,15	0,17	
dihydro-2-methyl-3(2H)-thiophenone	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
inconnu 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
inconnu 2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,87	1,85	3,44	7,09	

Cider fermier  
AOC Pays d'Auge  
Année 1



phases FA	1	1	1	2	2	2	3	3	3	3	4	4	4
phases FML	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
jours	0	1	15	29	37	50	64	71	78	85	150	170	226
hexan-3-ol	1,49	1,67	1,84	0,15	0,29	0,22	0,26	0,14	0,00	0,00	0,27	0,25	0,11
propanol	0,00	0,00	0,00	0,21	0,16	0,14	0,37	0,34	0,73	0,42	0,45	0,47	0,45
isobutanol	2,13	2,57	4,84	6,94	4,30	4,92	8,19	7,10	16,18	12,43	8,95	10,71	10,82
pent-3-èn-2-ol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,03	0,00	0,06	0,11	0,00	0,08	0,14	0,08
<i>E</i> -hex-3-èn-1-ol	0,20	0,17	0,23	0,41	0,22	0,30	0,40	0,23	0,50	0,48	0,27	0,27	0,19
2-éthylhexanol	0,04	0,04	0,03	0,04	0,00	0,04	0,00	0,05	0,00	0,00	0,06	0,08	0,00
octanol	0,00	0,00	0,00	0,06	0,04	0,07	0,04	0,21	0,00	0,00	0,12	0,11	0,12
décanol	0,00	0,00	0,00	0,22	0,16	0,33	0,17	0,27	0,27	0,37	0,23	0,37	0,30
dodécanol	0,00	0,00	0,00	0,15	0,19	0,22	0,18	0,16	0,00	0,00	0,00	0,27	0,20
butanol	1,63	1,43	2,04	2,99	1,59	1,95	3,06	2,05	5,44	4,39	2,47	2,53	4,24
isopentanol	15,49	26,86	22,37	17,08	55,78	68,56	116,42	80,72	173,26	156,56	98,79	100,60	112,88
pentanol	0,07	0,04	0,13	0,00	0,08	0,13	0,21	0,10	0,00	0,00	0,12	0,12	0,18
hexenol	4,18	4,10	5,00	8,72	4,78	6,07	8,17	4,94	10,38	8,23	5,39	4,90	5,89
acétate de 3-méthylbutyle	0,00	0,20	0,20	0,28	0,18	0,36	0,33	0,26	0,74	0,45	0,00	0,21	0,00
hexanoate d'éthyle	0,00	0,03	0,06	0,24	0,12	0,18	0,12	0,13	0,19	0,21	0,05	0,05	0,07
acétate d'hexyle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
octanoate d'éthyle	0,00	0,06	0,16	0,29	0,20	0,29	0,20	0,28	0,46	0,46	0,30	0,15	0,57
3-hydroxybutanoate d'éthyle	0,05	0,08	0,06	0,14	0,09	0,09	0,11	0,09	0,00	0,00	0,09	0,10	0,08
décanoate d'éthyle	0,00	0,00	0,27	0,71	0,40	0,74	0,69	1,00	1,31	0,12	0,23	0,12	0,28
dodécanoate d'éthyle	0,00	0,00	0,00	0,20	0,44	0,62	0,70	0,92	1,16	1,33	0,10	0,02	0,12
3-hydroxyocténoate d'éthyle	0,03	0,05	0,08	0,00	0,00	0,00	0,14	0,00	0,06	0,00	0,00	0,08	0,06
tétradécanoate d'éthyle	0,00	0,00	0,00	0,22	0,16	0,20	0,16	0,32	0,41	0,48	0,10	0,06	0,06
acide acétique	0,00	0,00	0,00	14,20	0,00	2,26	26,46	1,16	87,10	45,74	58,94	218,22	129,20
acide propanoïque	0,00	0,00	0,00	0,54	0,11	0,30	0,76	0,21	0,94	1,07	0,54	0,67	0,69
acide isobutyrique	0,00	0,00	0,00	0,87	0,37	0,61	0,89	0,57	0,00	2,02	0,00	0,00	1,26
acide butanoïque	0,00	0,00	0,00	1,32	0,66	0,95	1,66	0,73	0,00	2,30	1,16	1,20	1,58
acide 2-méthylbutanoïque	0,00	0,00	0,18	1,95	1,17	1,64	1,80	1,19	3,21	3,35	1,85	2,07	2,00
acide hexanoïque	0,00	0,56	0,67	1,92	0,08	1,69	2,25	1,22	3,60	4,47	2,00	2,18	2,83
acide octanoïque	0,00	0,00	0,11	0,70	0,35	0,37	0,58	0,44	2,28	3,48	0,47	0,18	0,90
acide decanoïque	0,00	0,00	0,00	0,45	0,41	0,49	0,52	0,39	0,79	1,62	0,05	0,00	0,04
acétoïne	11,16	21,43	32,28	29,23	12,62	13,76	18,41	11,14	25,06	20,80	39,17	88,69	49,69
lactate d'éthyle	0,39	1,80	7,06	31,18	22,81	36,30	57,47	40,33	106,87	110,62	72,02	88,68	130,84
diacétone	0,03	0,07	0,04	0,10	0,11	0,11	0,00	0,15	0,21	0,23	0,00	0,27	0,25
2-méthylthioéthanol	0,03	0,04	0,06	0,08	0,06	0,07	0,10	0,05	0,15	0,00	0,05	0,08	0,08
succinate d'éthyle	0,00	0,00	0,16	1,33	1,44	2,88	3,75	2,92	5,10	5,22	10,35	13,42	11,81
méthionol	0,69	0,85	1,13	1,95	1,32	1,84	2,31	1,49	2,71	2,46	1,45	1,57	2,00

succinate d'éthyle et de 3-méthylbutyle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,15	0,26	0,08	0,26	0,22	0,19	0,18	0,25
succinate de monoéthyle	0,00	0,00	1,23	31,46	27,42	163,74	275,89	109,64	233,99	217,67	226,89	257,67	280,10
acétate de 2-phényl éthyle	0,18	0,62	1,60	5,74	4,70	7,73	7,80	5,87	10,83	10,94	0,90	1,00	1,13
alcool benzylique	0,23	0,27	0,35	0,84	0,60	0,79	0,93	0,55	1,14	1,21	0,73	0,71	0,72
2-phényléthanol	32,73	86,12	137,58	280,17	202,57	228,13	290,06	192,83	492,97	455,37	251,67	231,41	286,14
4-éthyl guaiacol	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,17	0,31	0,26	0,61	0,52	1,31	1,49	2,54
octanoate de 2-phényléthyle	0,32	0,53	0,77	1,35	1,28	1,18	0,40	1,05	1,48	1,03	0,00	0,00	0,00
eugénol	0,00	0,00	0,00	0,26	0,18	0,19	0,23	0,15	0,00	0,00	0,14	0,16	0,26
2-méthoxy-4-vinylphénol	0,00	0,00	0,06	0,76	0,54	0,69	0,88	0,51	0,00	0,83	0,35	0,29	0,11
4-éthylphénol	0,00	0,00	0,23	0,96	1,02	2,48	3,73	2,84	7,12	7,00	0,00	7,68	9,59
hexanoate de 2-phényléthyle	0,000	0,000	0,000	0,000	2,203	2,572	2,193	0,080	0,000	0,000	0,168	0,168	0,348
2-(4-hydroxyphényl)éthanol	0,00	7,22	18,14	40,63	28,66	39,83	49,46	26,20	0,00	0,00	35,83	38,42	43,99
terpène	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,039	0,000	0,000	0,020	0,067	0,047
dihydro-2-methyl-3(2H)-thiophenone	0,137	0,180	0,117	0,034	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
inconnu 1	0,926	0,812	1,111	2,059	1,260	1,675	1,965	1,178	3,250	2,988	1,467	1,465	0,455
inconnu 2	0,221	0,123	0,204	0,208	0,247	0,384	0,536	0,402	1,012	1,153	1,825	2,148	2,625

Cider fermier  
AOC Pays d'Auge  
Année 2

phases FA	1	1	2	3	4
phases FML	1	1	1	1	1
Jours	0	7	12	74	122
hexan-3-ol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
propanol	0,04	0,06	0,04	0,00	0,19
isobutanol	0,37	0,60	0,79	5,21	5,07
pent-3-èn-2-ol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>E</i> -hex-3-èn-1-ol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2-éthylhexanol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
octanol	0,00	0,01	0,00	0,09	0,05
décanol	0,01	0,01	0,01	0,16	0,06
dodécanol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
butanol	0,49	0,34	0,45	2,56	2,18
isopentanol	1,01	3,18	4,01	41,52	31,52
pentanol	0,01	0,01	0,01	0,08	0,06
hexenol	0,40	0,36	0,33	2,66	1,65
acétate de 3-méthylbutyle	0,01	0,02	0,01	0,00	0,00
hexanoate d'éthyle	0,01	0,01	0,01	0,07	0,04
acétate d'hexyle	0,03	0,10	0,04	0,00	0,00
octanoate d'éthyle	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
3-hydroxybutanoate d'éthyle	0,01	0,10	0,01	0,07	0,05
décanoate d'éthyle	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
dodécanoate d'éthyle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3-hydroxyocténoate d'éthyle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
tétradécanoate d'éthyle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
acide acétique	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
acide propanoïque	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
acide isobutyrique	0,00	0,00	0,00	0,00	0,22
acide butanoïque	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
acide 2-méthylbutanoïque	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
acide hexanoïque	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
acide octanoïque	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
acide decanoïque	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
acétoïne	0,28	0,52	0,23	6,45	4,75
lactate d'éthyle	0,01	0,01	0,01	0,84	1,18
diacétone	0,01	0,01	0,01	0,17	0,16
2-méthylthioéthanol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
succinate d'éthyle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
méthionol	0,01	0,16	0,09	1,00	0,70
succinate d'éthyle et de 3-méthylbutyle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
succinate de monoéthyle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
acétate de 2-phényl éthyle	0,00	0,02	0,07	1,22	0,45
alcool benzylque	0,01	0,01	0,01	0,26	0,10
2-phényléthanol	0,12	1,09	5,35	89,31	55,83
4-éthyl guaiacol	0,00	0,03	0,00	0,40	0,27
octanoate de 2-phényléthyle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
eugénol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2-méthoxy-4-vinylphénol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4-éthylphénol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
hexanoate de 2-phényléthyle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2-(4-hydroxyphényl)éthanol	0,00	1,25	0,45	19,61	7,59
terpène	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
dihydro-2-méthyl-3(2H)-thiophenone	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
inconnu 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
inconnu 2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Cidre artisanal  
AOC Calvados  
Année 1



phases FA	1	1	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4
phases FML	1	2	2	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Jours	2	10	15	17	24	41	45	52	56	59	85	120	148	183	211
hexan-3-ol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,27	0,00	3,49	2,49	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
propanol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,65	0,00	0,00	0,87	0,82	0,00	0,00	0,40	0,00	0,00	0,00
isobutanol	0,00	5,37	26,86	13,18	34,07	12,63	20,45	30,50	24,03	12,09	16,43	17,88	14,80	13,61	14,68
pent-3-èn-2-ol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,07	1,05	1,00
<i>E</i> -hex-3-èn-1-ol	1,85	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2-éthylhexanol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
octanol	0,59	0,33	0,20	0,00	0,00	0,28	0,00	0,22	0,00	0,00	0,00	0,33	0,00	0,00	0,00
décanol	0,00	0,00	0,22	0,22	0,27	0,59	0,44	0,00	0,17	0,39	0,00	0,33	0,00	0,47	0,25
dodécanol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,30	0,00	0,00	0,00	0,29	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00
butanol	9,66	13,09	18,07	11,09	21,17	10,81	12,85	18,90	15,86	9,08	11,55	12,21	10,35	8,80	9,90
isopentanol	6,68	148,36	241,46	175,09	273,84	179,73	218,00	236,35	215,70	166,69	169,26	196,48	203,00	191,30	200,50
pentanol	0,00	0,21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,41	0,35	0,00	0,00	0,33	0,00	0,00	0,00
hexenol	14,53	8,84	10,51	7,27	10,08	7,49	10,62	9,38	8,42	8,31	11,80	9,44	9,49	9,21	8,52
acétate de 3-méthylbutyle	0,00	1,34	1,28	0,57	0,82	0,53	0,00	0,40	0,22	0,00	0,00	0,40	0,00	0,00	0,00
hexanoate d'éthyle	0,00	0,45	0,77	0,55	0,75	0,72	0,34	0,57	0,31	0,41	0,46	0,46	0,34	0,42	0,38
acétate d'hexyle	4,06	0,50	0,26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
octanoate d'éthyle	0,00	1,07	1,96	1,10	1,65	2,07	0,59	1,64	0,41	0,73	0,97	1,84	1,20	1,41	1,51
3-hydroxybutanoate d'éthyle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,28	0,19	0,00	0,00	0,00	0,48	0,16	0,16	0,00	0,00
décanoate d'éthyle	0,00	0,56	1,14	0,29	0,48	1,11	0,00	1,00	0,35	0,63	0,78	0,90	0,83	0,47	1,04
dodécanoate d'éthyle	0,00	0,21	0,62	0,00	0,00	0,42	0,00	0,14	0,19	0,36	0,00	0,00	0,80	0,16	1,15
3-hydroxyocténoate d'éthyle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
tétradécanoate d'éthyle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
acide acétique	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	11,08	0,00	9,32	0,00	10,98	2,72	8,93	3,05	12,69
acide propanoïque	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
acide isobutyrique	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,97	1,20	1,57	1,12	2,93	1,50	1,50	1,62	1,54
acide butanoïque	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00	0,47	2,33	2,53	2,31	4,94	3,16	2,91	3,07	3,23
acide 2-méthylbutanoïque	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,73	1,53	1,58	3,53	2,01	1,85	3,64	3,47
acide hexanoïque	0,00	0,00	0,00	0,00	1,61	0,61	7,95	2,75	3,06	2,98	14,26	4,15	4,47	4,73	4,56
acide octanoïque	0,00	0,00	0,00	0,00	0,80	0,54	4,14	0,96	2,20	3,37	12,52	0,13	1,60	1,02	1,50
acide decanoïque	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,90	0,00	0,00	0,00	0,00
acétoïne	1,31	13,87	6,16	5,24	10,29	4,54	0,00	1,94	3,15	1,72	0,72	1,46	1,64	4,63	3,49
lactate d'éthyle	3,73	8,65	45,51	48,27	114,40	123,39	226,39	153,51	147,03	142,30	142,96	214,75	222,04	238,78	234,21
diacétone	1,09	0,12	0,92	0,87	0,43	0,89	0,16	0,51	0,00	0,00	0,00	0,51	0,00	0,20	0,00
2-méthylthioéthanol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,23	0,23	0,00	0,46	0,26	0,19	0,15	0,25
succinate d'éthyle	0,00	0,00	0,62	1,25	2,35	5,24	2,73	3,76	2,51	3,62	5,78	3,61	30,66	33,41	33,09
méthionol	0,91	1,29	1,63	1,42	2,83	2,29	3,57	2,05	2,32	2,50	6,71	2,74	1,91	1,74	2,26

succinate d'éthyle et de 3-méthylbutyle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00	0,36	0,14	0,62	0,67	0,66
succinate de monoéthyle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	21,79	0,00	0,00	0,00	325,81	0,00	126,92	144,76	205,03
acétate de 2-phényl éthyle	0,32	1,74	2,69	1,85	3,13	3,38	3,76	2,66	2,39	2,86	8,52	2,58	1,59	1,32	1,42
alcool benzylique	0,35	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33	0,12	0,00	0,00	0,70	0,26	0,32	0,25	0,22
2-phényléthanol	10,17	344,24	530,76	410,52	667,78	670,44	860,38	522,48	521,00	677,88	677,77	559,71	746,28	642,86	656,78
4-éthyl guaia col	0,00	0,00	0,63	1,14	2,14	2,53	4,80	2,33	2,41	3,13	11,79	3,05	5,75	4,42	4,88
octanoate de 2-phényléthyle	0,00	1,83	0,00	0,88	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
eugénol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,26	0,00	0,67	0,45	0,70
2-méthoxy-4-vinylphénol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4-éthylphénol	0,00	0,00	0,00	1,69	7,67	9,76	19,43	9,72	9,56	11,10	36,76	13,00	9,56	6,02	11,81
hexanoate de 2-phényléthyle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2-(4-hydroxyphényl)éthanol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,12	0,11
terpène	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,19	0,17	0,15	0,17	0,06	0,00	0,25	0,00	0,35	0,00
dihydro-2-méthyl-3(2H)-thiophenone	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
inconnu 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
inconnu 2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Cidre artisanal  
AOC Calvados  
Année 2

phases FA	1	1	2	2	3	4	4	4	4	4
phases FML	1	2	3	4	4	4	4	4	4	4
Jours	0	6	8	12	20	78	99	139	157	168
hexan-3-ol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
propanol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,12	0,14	0,37	0,57	0,37
isobutanol	0,23	0,13	0,21	0,28	0,23	3,47	4,91	6,16	5,92	7,26
pent-3-èn-2-ol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>E</i> -hex-3-èn-1-ol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2-éthylhexanol	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,18	0,29	0,24	0,17	0,23
octanol	0,00	0,01	0,01	0,01	0,07	0,16	0,30	0,30	0,17	0,27
décanol	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02	0,28	0,30	0,43	0,23	0,55
dodécanol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
butanol	0,07	0,16	0,19	0,21	0,04	2,17	2,91	3,27	2,99	3,89
isopentanol	0,10	1,09	1,81	3,17	0,08	48,28	66,44	71,87	63,88	69,92
pentanol	0,00	0,00	0,01	0,01	4,72	0,12	0,22	0,19	0,16	0,00
hexenol	0,12	0,25	0,41	0,40	0,01	5,03	8,19	7,50	4,83	7,16
acétate de 3-méthylbutyle	0,00	0,00	0,03	0,05	0,02	0,17	0,28	0,29	0,30	0,27
hexanoate d'éthyle	0,00	0,00	0,02	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
acétate d'hexyle	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
octanoate d'éthyle	0,00	0,00	0,05	0,05	0,01	0,05	0,08	0,06	0,02	0,04
3-hydroxybutanoate d'éthyle	0,02	0,04	0,07	0,07	0,00	0,68	1,28	1,04	0,68	1,09
décanoate d'éthyle	0,00	0,00	0,13	0,11	0,01	0,05	0,19	0,07	0,00	0,00
dodécanoate d'éthyle	0,00	0,01	0,01	0,01	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3-hydroxyocténoate d'éthyle	0,00	0,00	0,01	0,01	0,04	0,11	0,22	0,17	0,10	0,16
tétradécanoate d'éthyle	0,00	0,00	0,04	0,03	0,32	0,05	0,10	0,07	0,05	0,06
acide acétique	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	8,07	13,77	18,93	19,09	17,26
acide propanoïque	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
acide isobutyrique	0,00	0,02	0,01	0,00	0,03	0,40	0,78	0,87	0,57	0,74
acide butanoïque	0,00	0,04	0,02	0,00	0,97	0,00	1,74	1,55	1,11	1,27
acide 2-méthylbutanoïque	0,00	0,03	0,03	0,02	0,02	0,88	2,08	2,10	1,43	1,75
acide hexanoïque	0,00	0,03	0,03	0,05	0,09	0,93	2,03	2,35	1,36	1,78
acide octanoïque	0,00	0,00	0,01	0,02	0,26	0,15	0,64	0,47	0,31	0,39
acide decanoïque	0,00	0,00	0,02	0,01	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
acétoïne	0,80	2,46	3,05	2,28	0,01	0,27	0,27	0,63	2,00	3,93
lactate d'éthyle	0,02	0,62	1,39	2,97	3,99	87,17	130,34	122,67	103,43	111,25
diacétone	0,01	0,02	0,01	0,01	0,39	0,32	0,74	0,51	0,61	0,61
2-méthylthioéthanol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
succinate d'éthyle	0,00	0,00	0,00	0,02	0,04	1,75	3,24	2,87	1,26	3,14
méthionol	0,00	0,00	0,02	0,03	0,00	0,50	1,00	0,66	0,56	0,70

succinate d'éthyle et de 3-méthylbutyle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,46	0,71	0,40	0,19	0,18
succinate de monoéthyle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
acétate de 2-phényl éthyle	0,00	0,00	0,12	0,14	0,17	0,55	0,93	0,57	0,29	0,61
alcool benzylique	0,01	0,02	0,04	0,08	1,64	1,36	2,41	2,41	1,70	2,04
2-phényléthanol	0,08	0,69	2,12	3,99	0,00	26,25	46,76	38,57	23,77	38,21
4-éthyl guaiacol	0,01	0,01	0,05	0,05	0,09	0,66	1,12	0,90	0,52	0,91
octanoate de 2-phényléthyle	0,00	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
eugénol	0,01	0,01	0,06	0,05	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2-méthoxy-4-vinylphénol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4-éthylphénol	0,00	0,00	0,00	0,20	0,01	7,30	13,84	9,61	6,56	8,92
hexanoate de 2-phényléthyle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2-(4-hydroxyphényl)éthanol	0,00	0,00	0,21	0,24	0,00	4,45	9,19	6,10	4,16	8,12
terpène	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
dihydro-2-methyl-3(2H)-thiophenone	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
inconnu 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
inconnu 2	0,00	0,01	0,01	0,02	0,06	0,50	1,17	0,95	0,33	0,87

Cidre Industriel  
AOC Pays d'Auge  
Année 1



phases FA	1	1	1	1	2	3	4	4	4	4	4
phases FML	1	1	1	1	2	3	4	4	4	4	4
Jours	0	1	2	5	7	14	21	33	61	79	97
hexan-3-ol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,24	0,00	0,18	0,21	0,00	0,18	0,09
propanol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16	0,36	0,38	0,41	0,68	1,46	0,54
isobutanol	0,40	2,16	4,95	5,58	5,79	11,31	13,57	11,64	18,60	12,30	18,53
pent-3-èn-2-ol	0,00	0,00	0,00	0,20	0,24	0,24	0,25	0,60	0,00	0,04	0,00
<i>E</i> -hex-3-èn-1-ol	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,08	0,03
2-éthylhexanol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,03
octanol	0,50	0,18	0,16	0,33	0,20	0,26	0,29	0,27	0,00	0,31	0,14
décanol	0,57	0,00	0,32	0,32	0,32	0,28	0,40	0,29	0,47	0,31	0,14
dodécanol	0,30	0,24	0,00	0,37	0,27	0,23	0,27	0,24	0,00	0,26	0,12
butanol	3,08	3,87	4,85	3,02	2,55	3,30	3,37	3,26	3,95	4,30	5,68
isopentanol	4,49	7,46	14,08	33,57	34,42	86,92	109,36	146,30	135,00	162,20	124,00
pentanol	0,22	0,15	0,11	0,16	0,20	0,14	0,17	0,21	0,00	0,24	0,09
hexenol	7,74	5,93	7,55	6,14	5,01	6,66	6,98	7,10	7,98	5,95	8,36
acétate de 3-méthylbutyle	0,07	0,00	0,00	0,82	1,18	3,64	3,25	1,31	0,71	0,60	0,34
hexanoate d'éthyle	0,00	0,00	0,00	0,18	0,18	0,36	0,30	0,28	0,00	0,11	0,09
acétate d'hexyle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,03
octanoate d'éthyle	0,34	0,00	0,00	0,00	0,39	0,59	1,13	0,91	0,75	0,32	0,21
3-hydroxybutanoate d'éthyle	0,93	20,33	2,79	1,92	1,58	2,03	1,25	1,98	2,00	0,00	0,00
décanoate d'éthyle	0,02	0,00	0,00	0,41	0,56	0,76	1,03	0,77	0,85	0,22	0,16
dodécanoate d'éthyle	0,00	0,00	0,00	0,33	0,36	0,50	0,66	0,26	0,39	0,06	0,06
3-hydroxyocténoate d'éthyle	0,12	0,07	0,00	0,17	0,11	0,15	0,14	0,17	0,00	0,17	0,07
tétradécanoate d'éthyle	0,00	0,00	0,00	0,12	0,12	0,15	0,30	0,12	0,00	0,05	0,03
acide acétique	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	36,50	97,80	294,30	249,30
acide propanoïque	1,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	14,32	0,00	0,00	5,53
acide isobutyrique	0,43	0,21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,73	1,30	0,00	1,58	0,58
acide butanoïque	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00	0,09	1,42	2,18	2,42	2,43	0,97
acide 2-méthylbutanoïque	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,62	3,32	4,12	4,15	1,57
acide hexanoïque	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,35	1,74	2,74	3,62	3,79	1,49
acide octanoïque	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16	0,76	1,55	2,13	2,26	0,75
acide decanoïque	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,38	0,00	0,31	0,12
acétoïne	16,26	17,59	23,86	0,00	25,29	13,47	0,00	0,32	0,00	0,87	0,00
lactate d'éthyle	0,00	0,00	0,00	1,49	3,48	79,63	126,74	20,05	324,78	19,32	13,47
diacétone	2,66	0,28	0,20	1,12	0,48	0,42	0,77	0,20	0,00	0,64	0,68
2-méthylthioéthanol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03
succinate d'éthyle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,88	4,82	3,40	2,52	3,73	1,47
méthionol	0,09	0,00	0,00	0,45	0,30	0,31	1,19	1,96	1,72	2,33	0,88

succinate d'éthyle et de 3-méthylbutyle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,12	0,19	0,00	0,23	0,07
succinate de monoéthyle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,03	84,85	55,12	72,57	34,34
acétate de 2-phényl éthyle	0,13	0,29	0,00	7,59	9,49	21,39	16,33	8,18	3,59	1,65	0,77
alcool benzylque	0,18	0,00	0,00	0,33	0,27	0,71	1,11	2,13	2,70	2,62	1,07
2-phényléthanol	2,94	1,28	7,44	0,00	31,32	97,97	45,02	31,45	59,98	73,48	38,80
4-éthyl guaiacol	0,00	0,00	0,00	0,06	0,05	0,25	1,23	1,42	1,25	1,58	0,58
octanoate de 2-phényléthyle	0,00	0,00	0,00	0,46	0,00	0,59	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
eugénol	0,00	0,00	0,00	0,22	0,20	0,63	0,89	0,95	0,00	1,06	0,40
2-méthoxy-4-vinylphénol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,02
4-éthylphénol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,58	3,11	7,86	9,08	10,66	11,70	4,15
hexanoate de 2-phényléthyle	0,00	0,00	0,00	0,00	1,66	1,22	0,12	0,18	0,00	0,27	0,09
2-(4-hydroxyphényl)éthanol	0,00	0,00	0,00	3,19	2,60	9,49	13,41	18,86	0,00	22,45	6,98
terpène	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00	0,06	0,02
dihydro-2-méthyl-3(2H)-thiophenone	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
inconnu 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,30	0,00	0,00	0,00	0,00
inconnu 2	1,39	0,00	0,00	0,00	0,00	0,42	0,97	1,14	2,06	1,33	0,54

Cidre Industriel  
AOC Pays d'Auge  
Année 2

phases FA	1	1	2	2	3	4	4	4	4	4	4
phases FML	1	1	2	2	4	4	4	4	4	4	4
Jours	0	2	6	8	14	22	37	58	81	101	108
hexan-3-ol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
propanol	0,01	0,02	0,00	0,02	0,04	0,03	0,66	1,02	0,71	0,34	0,00
isobutanol	0,08	0,20	0,03	0,57	0,69	0,69	10,92	15,14	11,88	7,61	5,48
pent-3-èn-2-ol	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,39	0,13	0,21	0,11	0,06
<i>E</i> -hex-3-èn-1-ol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2-éthylhexanol	0,00	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,25	0,18	0,21	0,26	0,31
octanol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
décanol	0,01	0,00	0,02	0,01	0,01	0,01	0,22	0,27	0,33	0,37	0,73
dodécanol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
butanol	0,26	0,26	0,24	0,22	0,26	0,26	0,28	4,94	4,38	3,70	2,57
isopentanois	0,41	0,93	3,62	4,01	4,24	4,56	72,83	88,27	78,71	63,39	112,70
pentanol	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,14	0,17	0,19	0,19	0,14
hexenol	0,38	0,35	0,35	0,33	0,38	0,39	4,46	6,32	7,49	9,21	8,81
acétate de 3-méthylbutyle	0,01	0,04	0,04	0,13	0,12	0,10	1,10	0,90	0,99	0,96	0,27
hexanoate d'éthyle	0,00	0,01	0,00	0,02	0,02	0,01	0,17	0,05	0,06	0,03	0,00
acétate d'hexyle	0,01	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
octanoate d'éthyle	0,00	0,01	0,00	0,03	0,05	0,05	0,31	0,07	0,06	0,06	0,07
3-hydroxybutanoate d'éthyle	0,02	0,08	0,10	0,09	0,10	0,10	0,92	1,56	1,89	2,33	2,41
décanoate d'éthyle	0,00	0,01	0,01	0,06	0,08	0,07	0,21	1,10	0,00	0,02	0,00
dodécanoate d'éthyle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3-hydroxyocténoate d'éthyle	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,11	0,17	0,19	0,27	0,43
tétradécanoate d'éthyle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
acide acétique	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,68	58,73	84,33	124,05	136,89	94,04
acide propanoïque	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
acide isobutyrique	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
acide butanoïque	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
acide 2-méthylbutanoïque	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,61	1,14
acide hexanoïque	0,00	0,00	0,04	0,02	0,08	0,08	0,47	1,00	1,84	4,09	4,38
acide octanoïque	0,00	0,00	0,02	0,01	0,03	0,03	0,00	0,09	0,15	1,49	2,04
acide decanoïque	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
acétoïne	0,90	1,22	0,69	0,59	0,31	0,10	6,95	0,65	0,49	0,55	1,21
lactate d'éthyle	0,02	0,06	2,51	2,63	3,50	4,25	75,13	105,03	77,73	161,14	33,79
diacétone	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,01	0,17	0,35	0,37	0,59	0,53
2-méthylthioéthanol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
succinate d'éthyle	0,00	0,00	0,17	0,05	0,12	0,11	2,43	4,42	5,88	5,72	6,94
méthionol	0,00	0,00	0,00	0,04	0,02	0,08	0,69	0,85	1,39	1,57	1,66

succinate d'éthyle et de 3-méthylbutyle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,08	0,19	0,28	0,52	1,16
succinate de monoéthyle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
acétate de 2-phényl éthyle	0,00	0,00	0,06	0,15	0,27	0,22	1,32	1,14	1,16	1,06	1,50
alcool benzylique	0,00	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,47	0,65	0,95	1,16	1,47
2-phényléthanol	0,11	0,18	4,76	3,56	6,24	6,55	80,59	121,43	131,37	111,17	243,11
4-éthyl guaiacol	0,00	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,34	0,50	0,62	0,87	1,14
octanoate de 2-phényléthyle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
eugénol	0,00	0,00	0,01	0,01	0,02	0,02	0,22	0,36	0,45	0,73	1,08
2-méthoxy-4-vinylphénol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4-éthylphénol	0,00	0,00	0,00	0,05	0,13	0,14	1,23	2,24	3,20	4,33	5,47
hexanoate de 2-phényléthyle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2-(4-hydroxyphényl)éthanol	0,00	0,00	0,64	0,47	0,86	1,19	12,71	17,48	18,04	28,54	55,35
terpène	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
dihydro-2-méthyl-3(2H)-thiophenone	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
inconnu 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
inconnu 2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Cidre Industriel  
AOC Calvados  
Année 1

phases FA	1	1	1	1	2	3	3	4	4	4
phases FML	1	1	1	1	1	1	2	3	4	4
Jours	0	1	3	4	7	9	16	23	36	100
hexan-3-ol	0,25	0,24	0,09	0,17	0,18	0,12	0,22	0,21	0,23	0,00
propanol	0,34	0,27	0,00	0,20	0,10	0,31	0,42	0,30	0,86	0,85
isobutanol	1,09	1,41	1,08	5,44	7,10	12,81	19,47	17,88	25,99	21,13
pent-3-èn-2-ol	0,11	0,08	0,84	0,00	0,00	0,00	0,08	0,11	0,09	0,00
<i>E</i> -hex-3-èn-1-ol	0,12	0,08	0,11	0,06	0,03	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00
2-éthylhexanol	0,09	0,07	0,14	0,07	0,00	0,05	0,08	0,08	0,05	0,05
octanol	0,26	0,23	0,48	0,22	0,27	0,21	0,32	0,34	0,00	2,15
décanol	0,34	0,29	0,72	0,37	0,43	0,30	0,40	0,40	0,22	0,43
dodécanol	0,26	0,21	0,46	0,25	0,32	0,25	0,29	0,28	0,19	0,25
butanol	8,53	5,22	2,08	2,92	2,09	3,20	3,77	3,46	4,12	3,62
isopentanoles	7,60	10,61	25,77	35,86	63,71	83,79	149,74	156,62	136,13	158,45
pentanol	0,34	0,23	0,24	0,17	0,09	0,14	0,17	0,17	0,13	0,00
hexenol	12,36	10,32	14,76	7,66	5,64	5,85	9,08	8,92	7,07	6,55
acétate de 3-méthylbutyle	0,15	0,09	0,23	0,55	0,75	0,99	1,76	1,48	1,09	0,54
hexanoate d'éthyle	0,01	0,05	0,34	0,30	0,41	0,39	1,10	0,67	0,42	0,53
acétate d'hexyle	0,05	0,10	0,84	0,76	0,37	0,19	0,16	0,17	0,09	0,00
octanoate d'éthyle	0,02	0,05	0,45	0,53	1,36	0,42	1,63	1,58	1,16	0,38
3-hydroxybutanoate d'éthyle	1,48	1,13	0,00	0,87	0,68	0,61	0,89	0,93	0,68	0,74
décanoate d'éthyle	0,06	0,05	0,72	1,17	1,70	0,35	2,20	1,98	0,81	0,96
dodécanoate d'éthyle	0,03	0,02	0,28	0,93	1,20	0,12	1,29	0,93	0,27	0,23
3-hydroxyocténoate d'éthyle	0,39	0,37	0,67	0,29	0,22	0,24	0,28	0,28	0,24	0,26
tétradécanoate d'éthyle	0,09	0,00	0,68	0,36	0,65	0,03	0,64	0,40	0,12	0,00
acide acétique	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,17	36,00
acide propanoïque	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	10,22
acide isobutyrique	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,58	0,76	1,15
acide butanoïque	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00	1,37	1,60	1,89
acide 2-méthylbutanoïque	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	0,00	0,85	0,87	1,08
acide hexanoïque	0,02	0,03	0,32	0,13	0,00	0,60	0,44	3,74	3,06	2,40
acide octanoïque	0,02	0,04	0,28	0,16	0,13	0,76	0,69	1,60	1,60	1,45
acide decanoïque	0,03	0,03	0,14	0,14	0,06	0,11	0,00	0,40	0,33	0,00
acétoïne	12,66	10,37	3,24	2,64	9,28	6,66	3,34	0,89	0,44	0,15
lactate d'éthyle	0,46	0,51	2,09	1,86	5,44	13,49	75,94	97,84	94,74	219,73
diacétone	0,86	0,36	0,71	0,87	0,66	0,99	0,79	0,63	0,57	0,00
2-méthylthioéthanol	0,02	0,03	0,02	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
succinate d'éthyle	0,00	0,00	0,04	0,04	0,64	1,54	10,27	7,46	5,04	31,59
méthionol	0,29	0,25	0,27	0,15	0,18	0,69	0,23	0,94	1,87	1,62

succinate d'éthyle et de 3-méthylbutyle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,04	0,32	0,24	0,25	0,55
succinate de monoéthyle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,85	35,83	81,79
acétate de 2-phényl éthyle	0,13	0,29	1,33	1,57	7,27	9,84	23,16	18,82	0,14	2,67
alcool benzylque	0,15	0,14	0,29	0,12	0,12	0,09	0,20	0,22	0,21	1,27
2-phényléthanol	2,05	2,68	21,74	29,07	81,21	100,45	235,45	235,28	191,14	208,31
4-éthyl guaiacol	0,09	0,07	0,09	0,07	0,45	1,04	3,53	3,80	3,12	2,88
octanoate de 2-phényléthyle	0,00	0,00	0,29	0,76	1,46	0,29	0,00	0,00	0,00	0,00
eugénol	0,07	0,00	0,11	0,07	0,09	0,11	0,23	0,25	0,20	0,43
2-méthoxy-4-vinylphénol	0,02	0,00	0,00	0,04	0,00	0,03	0,04	0,05	0,06	0,00
4-éthylphénol	0,06	0,06	0,15	0,06	0,15	0,55	3,69	4,39	4,34	3,78
hexanoate de 2-phényléthyle	0,21	0,11	0,76	2,94	1,52	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2-(4-hydroxyphényl)éthanol	0,20	0,32	3,25	4,12	8,20	12,96	22,64	25,63	30,78	11,60
terpène	0,16	0,08	0,24	0,08	0,00	0,09	0,13	0,15	0,10	0,29
dihydro-2-methyl-3(2H)-thiophenone	0,00	0,00	0,07	0,05	0,02	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00
inconnu 1	0,50	0,00	5,58	2,63	0,17	0,08	0,00	0,00	0,00	0,10
inconnu 2	0,05	0,05	0,19	0,10	0,09	0,37	1,64	2,05	2,12	1,59

Cidre Industriel  
AOC Calvados  
Année 2



## Annexe 6 : Validation de la méthode de dosage des acides organiques dans les cidres

Pour valider la méthode d'analyse des acides organiques dans les cidres en cours d'élaboration, après nous être assurés de la justesse de la méthode par obtention de courbes d'étalonnage linéaires par ajouts dosés, il a fallu vérifier les limites de détection (LD) et de quantification (Calleja A. et al.) (Calleja A. et al.). Des tests de répétabilité (r) et de reproductibilité (R) permettront de confirmer si la méthode mise au point est suffisamment précise.

### Détermination des limites de détection et de quantification

Les limites de détection et de quantification sont déterminées d'après les injections de solutions standards utilisées pour la linéarité. L'injection à 5 reprises de plusieurs niveaux de concentrations permet de tracer la droite d'étalonnage sans forcer par l'origine et d'utiliser la pente et l'ordonnée à l'origine proche de 0. Le Tableau a détaille les quatre niveaux de concentration pour lesquels a été vérifiée la linéarité. Le calcul de Feinberg donne les limites pour chaque acide. Ces résultats ont été intégrés dans le Tableau b.

	Niveau 4	Niveau 3	Niveau 2	Niveau 1
Ac. oxalique	1,5	3,0	4,5	6,0
Ac. tartrique	25	50	75	100
Ac. pyruvique	15	35	50	70
Ac. malique	100	200	300	400
Ac. lactique	125	250	375	500
Ac. acétique	25	50	75	100
Ac. citrique	37,5	75	100	150
Ac. succinique	50	100	150	200
Ac. propionique	300	600	900	1200

Tableau a: Niveaux de concentrations utilisées pour vérifier la linéarité de la méthode de dosage par CLHP des acides organiques dans les cidres (en mg.L-1)



Numéro		LD (mg.L <sup>-1</sup> )	LQ (mg.L <sup>-1</sup> )
1	Ac. oxalique	0,80	1,80
2	Ac. tartrique	13,5	43,8
3	Ac. pyruvique	2,00	21,2
4	Ac. malique	39,6	97,7
5	Ac. lactique	10,3	74,5
6	Ac. acétique	2,35	7,80
7	Ac. citrique	5,50	24,6
8	Ac. succinique	6,10	14,8
9	Ac. propionique	32,0	161

Tableau b : Limites de détection et de quantification déterminés pour les acides suivis par CLHP dans les cidres en cours de fermentation

Les limites de détection présentées (Tableau ) sont toutes largement inférieures aux concentrations du niveau 4 (le plus bas) (Tableau ). Par contre, les limites de quantification des acides oxalique, tartrique et pyruvique sont plus élevées que les concentrations du niveau 4. Néanmoins d'après les profils chromatographiques obtenus, ces acides là sont déjà présents dans les cidres. Par conséquent en ajoutant une concentration de niveau 4, il sera possible de mesurer la teneur existante dans la matrice.

Certaines limites de quantification peuvent paraître importantes comme celle de l'acide propionique par exemple (161 mg.L<sup>-1</sup>) mais il ne faut pas perdre de vue que c'est une méthode simple, mise au point avec un appareillage de base (spectrophotométrie) et une longueur d'onde fixe, pour un dosage d'un mélange de 9 acides dans une matrice très dense et difficile du point de vue analytique.

Un calcul de limites de détection et de quantification permet de juger de la sensibilité d'une méthode analytique. Néanmoins, cette méthode doit aussi être fiable et précise pour qu'elle puisse être appliquée par un autre laboratoire, par un autre opérateur et pour une autre période. Le moyen de vérifier de telles capacités se résume à déterminer la répétabilité et la reproductibilité pour chaque acide dosé.

#### Répétabilité et reproductibilité

Ces deux paramètres de méthodes ont été déterminés grâce à des injections répétées de deux solutions standards : l'une de niveau 4 et l'autre de niveau 1 (Tableau c). Le test de Cochran permet d'éliminer les valeurs suspectes ou aberrantes dans l'ensemble de la série qui se déroule sur 5 jours. Une valeur est

considérée comme aberrante quand le rapport Tf est supérieur à la valeur de la table au risque de 1%. Une valeur est « suspecte » quand le même rapport Tf est supérieur à la valeur de la table au risque de 5%.

La méthode est dite répétable à 5 % quand pour un même jour, sur 6 essais l'écart maximal observé (nommé « écart max jour » dans le Tableau 38) pour les valeurs obtenues est plus faible que la limite de répétabilité (limite r). Parallèlement, on parle de reproductibilité (toujours à 5%) quand l'écart observé pour l'ensemble des valeurs de la série sur les 5 jours (appelé « écart max série ») est plus faible que la limite de reproductibilité (limite R).

Que ce soit pour des concentrations fortes ou faibles, la totalité des acides peut être dosée de manière répétable et reproductible à la hauteur de 5 % (Tableau c) selon le protocole final qui a été détaillé dans le chapitre précédent « Matériel et Méthodes ».

		Ac. oxalique	Ac. tartrique	Ac. pyruvique	Ac. malique	Ac. lactique	Ac. acétique	Ac. citrique	Ac. succinique	Ac. propionique
Standard bas	Concentrations (mg.L <sup>-1</sup> )	1,5	25	15	100	125	25	37,5	50	300
	Limite r	0,006	0,005	0,035	0,032	0,017	0,004	0,032	0,020	0,008
	Limite R	0,013	0,007	0,125	0,120	0,019	0,004	0,003	0,020	0,012
	Ecart max jour	0,006	0,005	0,030	0,031	0,0066	0,0034	0,0029	0,014	0,0075
	Ecart max série	0,012	0,007	0,11	0,11	0,019	0,0036	0,018	0,018	0,011
	Répétable	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui
	Reproductible	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui
Standard haut	Concentrations (mg.L <sup>-1</sup> )	6	100	70	400	500	100	150	200	1200
	Limite r	1,302	1,89	6,51	5,57	2,77	0,70	0,99	0,83	2,01
	Limite R	1,189	1,72	6,49	5,08	2,53	0,64	0,91	0,76	1,83
	Ecart max jour	0,035	0,065	0,21	0,28	0,088	0,016	0,048	0,028	0,058
	Ecart max série	0,08	0,10	0,47	0,29	0,18	0,032	0,07	0,033	0,080
	Répétable	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui
	Reproductible	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui

Tableau c : Limites de répétabilité et de reproductibilité pour l'ensemble des acides dosés dans le cidre par CLHP (valeurs de concentrations en mg.L-1), avec « limite r » pour la limite de répétabilité déterminée par calcul pour chaque acide et « limite R » pour chaque acide et « limite R » pour la limite de reproductibilité déterminée aussi par calcul pour chaque acide

