



Etude des écosystèmes microbiens cidricoles : quel impact sur la qualité organoleptique ?

Boris Misery

► To cite this version:

Boris Misery. Etude des écosystèmes microbiens cidricoles : quel impact sur la qualité organoleptique ?. Agronomie. Normandie Université, 2021. Français. NNT : 2021NORMC209 . tel-03187453

HAL Id: tel-03187453

<https://theses.hal.science/tel-03187453>

Submitted on 1 Apr 2021

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.

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité SCIENCES AGRONOMIQUES, BIOTECHNOLOGIES AGRO-ALIMENTAIRES

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Etude des écosystèmes microbiens cidricoles : quel impact sur la qualité organoleptique ?

**Présentée et soutenue par
Boris MISERY**

**Thèse soutenue publiquement le 25/02/2021
devant le jury composé de**

M. PATRICK LUCAS	Professeur des universités, Université de Bordeaux	Rapporteur du jury
Mme STÉPHANIE WEIDMANN	Maître de conférences HDR, Université de Bourgogne	Rapporteur du jury
Mme MARINA CRETENET	Maître de conférences, Université Caen Normandie	Membre du jury
Mme FRANÇOISE RUL	Chargé de recherche, INRAE Jouy-en-Josas	Membre du jury
M. JEAN-MARIE LAPLACE	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Directeur de thèse
Mme CATHERINE BEAL	Professeur des universités, AgroParisTech Centre de Grignon	Président du jury

Thèse dirigée par JEAN-MARIE LAPLACE, Aliments bioprocédés toxicologie environnements

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur le professeur SICHEL François, directeur de l'unité de recherche Aliments Bioprocédés Toxicologie Environnements (ABTE) pour son accueil et son écoute tout au long de ma période de doctorat.

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés au laboratoire de l'équipe de recherche Matrices Alimentaires et Microbiotes (MALIM) de l'Université de Caen sous la direction de Madame la Professeure DESMASURES Nathalie. Je tiens à fortement la remercier pour son accueil au sein de l'équipe et de m'avoir partagé son expérience scientifique.

Je tiens à remercier Madame WEIDMANN Stéphanie, Maître de conférences à l'Université de Bourgogne et Monsieur le Professeur LUCAS Patrick de l'Université de Bordeaux, d'avoir eu la gentillesse d'examiner mon manuscrit. Mes remerciements s'adressent également à Madame la Professeure BEAL Catherine d'AgroParisTech et à Madame RUL Françoise, chargée de recherches INRAE (Paris) pour avoir accepté de juger mon travail.

Jamais je n'arriverai à exprimer toute la reconnaissance que je porte à mes deux encadrants, Monsieur LAPLACE Jean-Marie et Madame CRETENET Marina. Merci pour cette confiance que vous m'avez apportée pendant ces trois ans pour l'aboutissement de cette thèse. Vos conseils, tant professionnels que personnels, vos encouragements, votre soutien ainsi que votre patience m'ont particulièrement touché. Je vous remercie également pour votre disponibilité et pour m'avoir donné la chance d'enseigner pour la première fois.

Je tiens à remercier également les différents collaborateurs du projet MoNArC. Merci à GUICHARD Hugues, SIMON Jean-Paul pour leur expertise et les discussions passionnantes sur les produits cidricoles. Je tiens également à remercier Patrick et Jean-Christophe pour leur aide technique. Merci à Ludovic pour son accueil au sein de son établissement et de m'avoir fait découvrir, dès la 1^{ère} semaine de ma thèse, ce qu'était la production de cidre et de calvados (avec dégustation).

Je remercie l'ensemble de l'équipe MALIM pour leur aide précieuse, leurs avis et conseils tout au long de mon travail. Merci à Fabien et Marion pour leur aide précieuse mais aussi la rigueur scientifique dont vous faites preuve qui m'ont rapidement permis de m'acclimater aux travaux de recherche. Enfin, je tiens à remercier toute l'équipe, Jean-Michel, Boussad, Sara, Alexandra, Pierre, Margot, Marion, Virginie, et Céline pour votre bonne humeur et les discussions

passionnantes sur nos travaux respectifs. Merci aux nombreux stagiaires que j'ai eu l'occasion de rencontrer tout au long de cette aventure, notamment Nicholas et Eugenia.

J'ai une attention toute particulière pour Marie-Thérèse et Alexandre pour m'avoir fait découvrir la beauté de la Normandie, de cette amitié que nous nous portons et de votre aide, tant sur le plan professionnel que personnel. Je remercie Caroline pour sa confiance et son soutien sans faille. Enfin, mes derniers remerciements iront à ma famille pour leur soutien moral et financier, sans qui rien n'aurait été possible.

Abréviations

3-HPA : 3-Hydroxypropionaldéhyde

DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

ITS : Internal Transcribed Spacer

LAB : Lactic Acid Bacteria

NGS : Next-Generation Sequencing

nts: nucléotides

OTU : Operationnal Taxonomic Unit

pb : Paire de bases

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne

TML : Transformation malo-lactique

T-RFLP : Terminal restriction fragment length polymorphism

UFC : Unités formant des colonies

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	4
I. Le cidre à distiller et le calvados	4
1. Histoire et origine de la fermentation de la pomme.....	4
2. La fermentation et la distillation des cidres.....	5
3. Paramètres biotiques et abiotiques de fermentation du cidre à distiller.....	8
I.3.1. Les flores indigènes	8
I.3.1.1. Les levures	8
I.3.1.2. La flore bactérienne.....	8
I.3.1.3. La flore d'altération.....	10
I.3.2. Composition physico-chimique du cidre	11
4. La composition aromatique des cidres.....	13
I.4.1. Les esters	14
I.4.2. Les alcools supérieurs	15
I.4.3. Les phénols volatils	16
I.4.4. Les composés soufrés volatils.....	17
I.4.5. Les aldéhydes.....	17
II. Diversité microbienne et maîtrise de la fermentation	18
1. Maîtrise de la qualité sanitaire et organoleptique par la fermentation	18
II.1.1. Amélioration de la qualité sensorielle et nutritionnelle	18
II.1.2. Maîtrise et qualité sanitaire.....	19
II.1.3. Autres fonctionnalités.....	20
2. Outils d'étude de la biodiversité microbienne	20
II.2.1. PCR-DGGE	21
II.2.2. T-RFLP.....	21
II.2.3. PCR quantitative (qPCR).....	22
II.2.4. Apport de l'approche par métagénomique comme outil de surveillance du processus de fermentation	23
3. Le rôle de la diversité dans la maîtrise du produit.....	26
II.3.1. Les dynamiques microbiennes.....	26
II.3.2. Les particularités de l'écosystème cidricole	28
II.3.3. Les leviers technologiques dans la maîtrise de la fermentation.....	29
III. <i>Lactobacillus collinoides</i> et la piqure acroléique.....	31
1. La piqure acroléique	31
2. <i>Lactobacillus collinoides</i>	33
III.2.1. Caractéristiques générales	33
III.2.2. Physiologie	33
III.2.3. Génomique	34
3. Le métabolisme du glycérol et la piqure acroléique	35
III.3.1. Les différentes voies métaboliques.....	35
III.3.2. Structure génétique de l'opéron <i>pdu</i>	36
III.3.3. Molécules issues du métabolisme du glycérol.....	37
III.3.3.1. Le 3-hydroxypropionaldéhyde : précurseur de l'acroléine.....	37
III.3.3.2. L'acroléine	38
IV. Objectifs de la thèse.....	39

CHAPITRE I : Diversité et dynamique des communautés bactériennes et fongiques lors de la fermentation du cidre de distillation	41
CHAPITRE II : Liens entre les écosystèmes microbiens et la composition aromatique des cidres de distillation et du calvados.....	76
CHAPITRE III : Comparaison des productions cidricoles chez les producteurs et en atelier pilote	113
CHAPITRE IV : Dégradation du glycérol chez les souches de <i>Lactobacillus</i> isolées de cidre de distillation	125
CHAPITRE V : Comparaison génomique de huit souches de <i>Lactobacillus collinoides</i> isolées du cidre de distillation et déterminants génétiques du métabolisme du glycérol.	146
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	176
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	186

Liste des tableaux et des figures :

Introduction

Tableau 1. Variétés de pomme utilisées pour les cidres de distillation et leurs caractéristiques.

Tableau 2. Diversité microbienne identifiée lors du processus d'élaboration du cidre.

Tableau 3. Liste de quelques esters, alcools supérieurs et phénols volatiles avec leurs descripteurs associés, le seuil de perception analysé dans les vins et la bière, et les *concentrations* maximales retrouvées lors de la fermentation des pommes.

Tableau 4. Liste des composés aromatiques (désirables, questionnable, indésirable) analysés dans les cidres de distillation.

Tableau 5. Résumé des avantages et des inconvénients des méthodes d'identification des communautés microbiennes dans les produits fermentés.

Tableau 6. Études de l'écologie microbienne de divers produits alimentaires fermentés par approche métagénomique.

Tableau 7. Caractères biochimiques de *L. collinoides*.

Figure 1. Processus de production industrielle de cidre et de calvados.

Figure 2. Voie métabolique schématique de production de l'acroléine à partir du glycérol chez *Lactobacillus sp.*.

Figure 3. Voies métaboliques de dégradation du glycérol selon Toraya *et al.* (1999) et Sauvageot *et al.* (2000).

Figure 4. Organisation génétique de l'opéron *pdu* chez *Lactobacillus collinoides*.

Chapitre I

Table 1. Duration, average outside temperature, volume data and location of cider tanks A, B, C1, C2, D1 and D2.

Table 2. Ciders characteristics of producers A, B, C, and D.

Figure 1. Diagram of cider analysis workflow. Modified (m) MRS, MLO, PSM and ZPP media were supplemented with 100 mg.L⁻¹ pimaricin and 7 mg.L⁻¹ cycloheximide.

Figure 2. Density, lactic acid bacteria (□), *Oenococcus* (■), yeasts (Δ) countings during cider fermentation of producer tanks A, B, C1 and C2, D1 and D2.

Figure 3. Identification of lactic acid bacteria from mMRS, mMLO, mPSM media at different steps of cider elaboration (I and M).

Figure 4. MDS/PCoA representing A) bacterial and B) fungal OTUS distribution according to fermentation steps and C) bacterial and D) fungal OTUS distribution according to cider tanks.

Figure 5. Phylogenetic taxonomy for bacterial communities showing dynamic changes at the genus level during cider fermentation of producer tanks A, B, C1, C2, D1 and D2.

Figure 6. Phylogenetic taxonomy for fungal communities showing dynamic changes at the genus level during cider fermentation of producer tanks A, B, C1, C2, D1 and D2.

Figure A1. Principal component analysis of physicochemical parameters of ciders for distillation (A). The distribution of cider samples was displayed according to (B) fermentation, (C) tanks and (D) producers.

Figure A2. Rarefaction curves according to A) Fermentation initiation (I), B) end of alcoholic fermentation (F), C) maturation period (M).

Figure A.3. Bacterial alpha diversity measurement according to A) fermentation steps (bacteria) and B) tanks (I: fermentation initiation; F: end of alcoholic fermentation; M: maturation period).

Figure A.4. Fungal alpha diversity measurement according to A) fermentation steps and B) tanks (I: fermentation initiation; F: end of alcoholic fermentation; M: maturation period).

Chapitre II

Table 1. Duration, average outside temperature, volume data and location of cider tanks A, B, C1, C2, D1, D2, E1, E2 and F.

Table 2. Ciders characteristics of producers A, B, C, D, E and F.

Table 3. Aromatic compounds of interest in ciders of producers A, B, C, D, E and F.

Table 4. Scheirer–Ray–Hare analysis results of physical-chemical and aromatic parameters in 10 tanks distributed at F and M.

Table A1. List of aromatic compounds analysed in this study.

Figure 1. MDS/PCoA representing A) bacterial and B) fungal OTUS distribution according to fermentation steps.

Figure 2. Phylogenetic taxonomy for bacterial communities showing dynamic changes at the genus level during cider fermentation of producer tanks A, B, C1, C2, D1, D2, E1, E2 and F.

Figure 3. Phylogenetic taxonomy for fungal communities showing dynamic changes at the genus level during cider fermentation of producer tanks A, B, C1, C2, D1, D2, E1, E2 and F.

Figure 4. MDS/PCoA representing A) bacterial and B) fungal OTUS distribution at the beginning of fermentation (I) and C) bacterial and D) fungal OTUS distribution at F and M.

Figure 5. Principal component analysis of physicochemical parameters of ciders for distillation (A). The distribution of cider samples was displayed according to (B) fermentation, (C) tanks.

Figure 6. Principal component analysis of A) the 45 aromatic compounds of the microdistillates of ciders of the ten tanks. B) Distribution of the tanks according to the aromatic complexity.

Figure 7. Network analysis based on the co-occurrence of physical-chemical and aromatic characteristics and the microbial communities. Relationships with a) *Oenococcus oeni* (Cluster-B2) b) *Lactobacillus collinoides* (Cluster-B3) c) *Dekkera sp.* (Cluster-L12/L14) d) volatile acidity.

Chapitre III

Table 1. Duration, average outside temperature, volume data and location of cider tanks from producers and in controlled condition.

Figure 1. Phylogenetic taxonomy for bacterial communities showing dynamic changes at the genus level during cider fermentation of producer tanks (A, B, C1, C2, D1, D2, E1, E2 and F) and the cider fermentation in controlled conditions (Ab, Bb, C1b, C2b, D1b, D2b, E1b, E2b and Fb.)

Figure 2. Phylogenetic taxonomy for fungal communities showing dynamic changes at the genus level during cider fermentation of producer tanks (A, B, C1, C2, D1, D2, E1, E2 and F) and the cider fermentation in controlled conditions (Ab, Bb, C1b, C2b, D1b, D2b, E1b, E2b and Fb).

Figure 3. MDS/PCoA representing A) bacterial and B) fungal OTUS distribution according to tanks and C) microbial composition according to the two conditions of fermentation.

Figure 4. Principal component analysis of some aromatic compounds and physical-chemical characteristics of ciders for distillation.

Figure 5. Principal component analysis of the aromatic composition of calvados.

Supplemental data: Ciders characteristics of ciders in controlled condition Ab, Bb, C1b, C2b, C3b, D1b, D2b, E1b, E2b and Fb.

Chapitre IV

Table 1. Genetic profiles of the operon *pdu* in *Lactobacillus* strains isolated from ciders. Their ability to degrade the glycerol was previously tested according to Sauvageot *et al.* (2000).

Table 2. List of the primers used in this study.

Table 3. Bacterial strains used in this study (UCMA: Université de Caen Microbiologie Alimentaire).

Table 4. Main physical-chemical features, presence of acrolein and *L. collinoides* in the ten ciders for distillation and microdistillates.

Table 5. Glycerol degradation and 1,3 propanediol production by *Lactobacillus* species.

Table A1. List of media used for the selection of *Lactobacillus* strains in ciders.

Table A2. List of primers used for the identification of *Lactobacillus* species.

Figure 1. Metabolic and genetic profiles on glycerol metabolism in *Lactobacillus* species.

Chapitre V

Table 1. Bacterial strains used in this study (UCMA: Université de Caen Microbiologie Alimentaire).

Table 2. General genome features of the 8 genomes of *Lactobacillus collinoides*.

Table 3. List of predicted prophage regions of eight *L. collinoides* strains, as shown in Summary tab of PHASTER webserver.

Table 4. Number of core, accessory, and strain specific genes in *L. collinoides* strains.

Table 5. MicroCyc pathways of carbohydrates degradation in *L. collinoides*.

Table 6. MicroCyc pathways of amino acids degradation in *L. collinoides*

Table 7. MicroCyc pathways of amino acids biosynthesis in *L. collinoides*.

Figure 1. Pan-genome and core genome size evolution *L. collinoides*.

Figure 2. Cluster of Orthologous Groups (COG) classification of *L. collinoides*. Histograms represent COG predictions for each of the 8 *L. collinoides* isolates.

Figure 3. Visualization of the syntenies on *pdu* operon in *L. collinoides* strains with *L. collinoides* UCMA15777 (type II of operon *pdu*).

Figure 4. Molecular phylogenetic analysis by Maximum Likelihood method (bootstrapped $\times$ 1000 replicates) of sequences encoding the transcriptional regulator of the *pdu* operon extracted from MicroScope platform.

Introduction générale

Depuis des millénaires, la fermentation a été utilisée de façon empirique pour conserver les aliments. Parmi les aliments transformés par la fermentation nous pouvons retrouver les légumes, les fruits et les céréales qui combinent de nombreux avantages sanitaires et nutritionnels, mais aussi la viande, les produits laitiers, le cacao ou encore le café. Les produits fermentés sont consommés dans quasi toutes les zones géographiques du monde. La fermentation est soit alcoolique (production d'éthanol et de gaz carbonique), lactique (production d'acide lactique), ou encore acétique (production d'acide acétique). La fermentation est un processus d'oxydation des composés organiques n'impliquant pas d'agent oxydant exogène et elle est principalement réalisée par la population microbienne indigène. Un grand nombre de paramètres physico-chimiques, largement étudiés, influent sur le processus de fermentation (ex : température, taux de sucres, d'azote assimilable etc...). De plus, la connaissance de la composition microbienne des écosystèmes dans les aliments est maintenant largement accessible grâce aux méthodes moléculaires et non culturales qui se sont récemment développées et l'étude globale des interactions entre micro-organismes est rendue possible. Ainsi, comprendre les liens et mécanismes entre fermentation et amélioration de la qualité sensorielle du produit est devenue accessible via des méthodes globales d'analyse robustes.

Le calvados est une eau-de-vie de Normandie fabriquée par la distillation de cidre. Son élaboration est un processus complexe impliquant différents facteurs comprenant la matière première, la distillation mais aussi le processus de vieillissement. Bien que les pratiques et les choix des producteurs puissent influencer le profil aromatique du cidre destiné à la distillation, les différences aromatiques sont principalement dues aux activités microbiennes qui ont lieu aux différents stades de fermentation. Ainsi, identifier les micro-organismes présents aux différents stades de l'élaboration des cidres de distillation et distinguer ceux qui sont bénéfiques (flore technologique) de ceux qui sont indésirables (flore d'altération) est une étape clé pour améliorer la qualité aromatique de ces produits. De la surface de la pomme en passant par le système de pressage, beaucoup d'études ont été effectuées pour déterminer la diversité microbienne tout au long du procédé d'élaboration du cidre (Valles *et al.*, 2007; Yashiro *et al.*, 2011). Cependant, contrairement au domaine vinicole, peu se sont focalisées sur la composition des communautés microbiennes lors de la fermentation des cidres de distillation. La question est de savoir quels sont les principaux agents microbiens responsables

de l'apparition (ou la disparition) de certains composés, leur abondance mais aussi leurs dynamiques dans le cidre voué à la distillation. L'objectif final de ce travail est de connaître l'impact de cette diversité et de ces dynamiques sur la qualité organoleptique du calvados un fois le cidre distillé.

La fermentation alcoolique et la transformation malolactique sont les deux processus majeurs pouvant conduire à des modifications organoleptiques par un apport de saveurs fruitées ou florales. Ces processus impliquent la flore levurienne mais aussi lactique. Parmi les levures, nous pouvons distinguer les *Saccharomyces* des non-*Saccharomyces*. La TML, quant à elle, est principalement réalisée par les bactéries lactiques (LAB, Lactic Acid Bacteria) appartenant aux genres *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* et *Lactobacillus*. Bien que l'ensemble de cet écosystème participe à la qualité organoleptique du cidre de distillation, certaines LAB peuvent également être responsables de la production d'arômes indésirables. La "piqûre acroléique" est une des plus importantes altérations du cidre principalement due à des LAB, appartenant majoritairement au genre *Lactobacillus*. Cette piquûre résulte de la production d'acroléine, un aldéhyde connu pour ses propriétés irritantes à l'origine d'une odeur et d'un goût âcres. Limiter la production de cette molécule dans les cidres reste un enjeu décisif pour les producteurs et la filière cidricole.

Les produits cidricoles français ont un fort impact territorial et sont très divers selon les terroirs, les pommes utilisées ou encore les pratiques des producteurs. La filière cidricole, notamment celle des calvados, est une petite filière au regard d'autres secteurs des boissons. Du fait de la baisse continue des ventes depuis quelques années, les producteurs souhaitent aujourd'hui rajeunir l'image du calvados souvent perçu comme un produit agressif. En effet, les attentes des consommateurs ont évolué vers des eaux-de-vie plus jeunes et surtout plus fruitées. Ces constatations ont amené à une récente révision des cahiers des charges des différentes AOC existantes, ouvrant de nouvelles perspectives d'études. Les producteurs souhaitent disposer d'outils d'aide à la décision pour assurer un meilleur suivi des cidres de distillation par le contrôle de la fermentation, de la température ou d'ajouts de ferments et ainsi avoir des réponses sur les conduites possibles d'optimisation sur le moment de distillation en fonction de la qualité du cidre à distiller. Ainsi, les questionnements soulevés s'intègrent dans le projet MoNArC (Modulation des Notes Aromatiques des Calvados). Ce projet a pour objectif de dégager des leviers technologiques en vue d'un pilotage spécifique de l'élaboration des cidres de distillation, mais également d'orienter le choix du moment de distillation. Ainsi, ces

outils permettront de mieux répondre aux attentes du marché en augmentant le caractère fruité des calvados pour produire une eau-de-vie qualité, haut de gamme avec une image rajeunie.

Mes travaux de thèse présentés ici sont structurés autour d'une étude bibliographique et de quatre chapitres de résultats sous forme d'articles scientifiques. La synthèse bibliographique aborde une vue d'ensemble des connaissances sur le cidre suivie d'un état de l'art de la biodiversité microbienne dans les produits fermentés en lien avec les méthodes d'études utilisées. Enfin, la dernière partie se focalisera sur les mécanismes de la piqure acroléique, le métabolisme et l'exploration génomique de *L. collinoides*, agent principal de cette altération. Les chapitres I & II présentent sous le format de publications scientifiques les résultats relatifs à la diversité microbienne des cidres de distillation, son évolution et les proportions des flores microbiennes aux différentes étapes du processus de fermentation, couplées avec les caractéristiques physico-chimiques et aromatiques de chacun des produits étudiés. Une analyse du bouquet aromatique des différents calvados ainsi produits est également présentée. Le chapitre III présente sous le format de notre la comparaison des fermentations des cidres de distillation et des distillats en essai pilote. Les chapitres IV et V aborderont l'impact de différents paramètres environnementaux sur l'apparition de la piqure acroléique chez *L. collinoides* à l'aide d'un plan d'expérience. Enfin, nous présenterons les caractéristiques physiologiques de *L. collinoides*, corrélés avec l'exploration génétique de son génome.

Etude bibliographique

I. Le cidre à distiller et le calvados

1. Histoire et origine de la fermentation de la pomme

L'origine du cidre remonte au 1er siècle avant l'ère chrétienne. On trouve la trace de ce "vin de pomme" dès l'Antiquité chez les Hébreux, les Romains et les Grecs. Un breuvage obtenu en faisant bouillir des morceaux de pomme et du miel dans de l'eau nommé *Phitarra* au Pays Basque a même été mentionné. C'est à la fin du Moyen-Age que l'invention de la presse va marquer l'histoire du cidre, permettant le développement de la production et de la commercialisation du cidre. Les progrès apportés dans la sélection des espèces de pommiers, des pommes à cidres et des méthodes de fabrication vont permettre l'essor du cidre. Du fait de son faible coût et de son nombre important de producteurs locaux, le cidre tient une place importante dans la région normande puisqu'elle devient une boisson régionale. Le cidre est également produit dans d'autres régions françaises, comme la Bretagne mais aussi au Pays Basque. De nos jours, la consommation est largement inférieure à celle du vin ou de la bière, malgré les efforts de commercialisation à destination d'un public jeune en proposant de nouveaux cidres aromatisés (Cousin *et al.*, 2017).

Le cidre est produit dans plus de 25 pays à travers le monde, notamment en Europe (France, Angleterre, Espagne, Suisse, Belgique, Allemagne), aux États-Unis mais aussi en Amérique du Sud (Chili, Paraguay, Argentine et Brésil). La définition du terme "cidre" varie cependant d'un pays à l'autre, selon les réglementations, les standards de qualité de la pomme mais aussi de la biogéographie. Une fois les pommes pressées, le moût va subir des transformations sous l'action d'une microflore complexe et aboutir à deux types de cidres : le cidre de consommation et le cidre de distillation. Les modes de fabrication du cidre de consommation divergent selon les pays en raison des différences culturelles. Par exemple, le moût fraîchement pressé est directement traité au SO₂ au Royaume-Uni, et il est aussi possible de diluer le cidre avec du jus de pomme. L'ajout de sulfite permet de contrôler la flore microbienne au sein du cidre et d'obtenir une fermentation plus lente. D'autres ajouts comme des colorants ou des édulcorants sont possibles. Du gaz carbonique ou du sucre peuvent être ajoutés dans les cidres espagnols (ex : "sparkling ciders"). La différence entre le cidre français et les cidres étrangers réside dans l'utilisation de variétés de pommes dont l'acidité de titration

et la teneur en tanins restent des caractéristiques influençant la fabrication des cidres. Le choix de la variété de la pomme et les propriétés propres à chacune (acidité, douceur etc.) vont déterminer les qualités sensorielles de la boisson (Tableau 1). En France, plus de 300 variétés ont été listées et caractérisées par Boré *et al.* (1997).

Contrairement au cidre de consommation, le cidre de distillation est caractérisé par une fermentation spontanée non maîtrisée (“naturelle”) et une consommation totale des sucres. Les variétés recommandées pour l’élaboration des cidres de distillation vont être les pommes douces- amères et amères. D’après le cahier des charges pour les calvados, un cidre voué à la distillation ne doit subir aucune intervention de la part des producteurs (ajout de sucres, de levures, de SO₂). Ainsi, assurer un meilleur suivi de la fermentation des cidres de distillation est déterminant dans le choix du moment de distillation en vue d’une amélioration de la qualité organoleptique du calvados.

2. La fermentation et la distillation des cidres

Les pommes à cidre dites précoces sont généralement récoltées entre septembre et octobre alors que les pommes à cidre plus tardives le sont jusqu’à mi-décembre et peuvent mûrir à l’abri pendant 3 à 4 semaines (Figure 1). Les pommes sont par la suite acheminées jusqu’au pressoir où elles sont lavées, égouttées et triées. Le pressage va permettre de séparer la partie solide, “marc de pommes”, de la partie liquide le “moût de pommes”. Le moût est ensuite stocké en cuve et les pectines (principalement l’acide galacturonique) vont coaguler naturellement pour former une opacité dans le cidre. D’après les cahiers des charges, la teneur en sucres du moût initial représente l’unique caractéristique physico-chimique à respecter (>78 g/L). Les étapes de défécation (clarification du moût pour ralentir la fermentation des sucres) ou encore l’ajout de levure ou de sulfite (30-80 mg/L) ne concernent que les cidres de consommation. La fermentation alcoolique, conversion des sucres du moût en éthanol et CO₂ se fait naturellement via la flore levurienne indigène présente sur les fruits et/ou dans l’environnement (système de pressage, cuves etc.). Les levures à l’origine de la fermentation alcoolique peuvent être classées en deux catégories : les levures *Saccharomyces* (prédominantes durant la fermentation alcoolique) et les non-*Saccharomyces* (présentes au début de la fermentation alcoolique) et seront présentées plus tard aux chapitres I, II et III. La fermentation du mout de pomme sera interrompue en fonction de la quantité de sucres résiduels et le degré alcoolique du produit désiré (Figure 1). Les cidres voués à la distillation ne doivent plus présenter aucun sucre résiduel, atteignant jusqu’à 8% (v/v) d’alcool. En fin de fermentation, le sucre résiduel principal

est le fructose. Même si les producteurs préfèrent attendre la consommation totale des sucres, le fructose reste souvent présent en faible quantité dans les cidres à distiller.

L'autre processus qui intervient dans l'élaboration des cidres de distillation est la transformation malolactique (TML) qui implique la conversion de l'acide malique en acide lactique via la flore lactique. L'acide lactique, possédant un pKa plus faible que celui de l'acide malique entraîne une augmentation du pH et donc une baisse de l'acidité de 30 à 50%. Dans les cidres de distillation, la TML reste une problématique majeure pour les producteurs puisque cette conversion peut entraîner des modifications organoleptiques désirables et indésirables dans le produit final. En effet, la désacidification du milieu et la production plus importante d'arômes font que la TML est recherchée par les producteurs (Sánchez *et al.*, 2014). Cependant, l'augmentation du pH peut favoriser le développement de micro-organismes responsables d'altération du cidre. Dans le vin, la TML intervient après la fermentation alcoolique et est un processus particulièrement bien maîtrisé. Cependant, son intervention ainsi que son impact sur l'élaboration du cidre à distiller restent encore mal connus dans le domaine cidricole.

Tableau 1. Variétés de pomme utilisées pour les cidres de distillation et leurs caractéristiques.

AMERE	AIGRE AMERE	DOUCE AMERE	DOUCE
C'Huero Briz (4.67 / 30.65) 1056	Cazo Jaune (3.28 / 196.2) 1054	Antoinette (2.73 / 36.79) 1050	Belle Fille de la Manche Blanchet (1.28 / 71.4) 1050
Chevalier Jaune (3.79 / 33.09) 1053		Argile Rouge Bruyère	Douce Coetligné (1.83 / 29.09) 1051
Cidor (4.02 / 25.9) 1055		Bedan (2.27 / 22.04) 1056	Doux Evêque Jaune (1.96 / 24.25) 1052
Domaines (3.6 / 31.81) 1067		Binet Blanc (2.52 / 26.5) 1060	Doux Normandie (1.42 / 24.56) 1065
Doux Joseph (3.61 / 31.04) 1058		Binet Rouge (2.41 / 26.54) 1063	Doux Veret de Carrouges (1.77 / 24.62) 1055
Fréquin Rouge Petit (5.06 / 36.35) 1065		Binet Violet (2.62 / 24.93) 1050	Muscadet Petit de l'Orne (1.9 / 24.23) 1061
Jeanne Renard (4.23 / 25.35) 1065		Bisquet (2.12 / 31.31) 1045	Queue Torte
Kemmerrien (4.32 / 22.17) 1062		C'Huero Ru	Rouge Duret (1.65 / 25.3) 1049
Marie Ménard (4.82 / 32.78) 1061		Cartigny (2.21 / 31.26) 1051	Rousse de la Sarthe (1.64 / 25.22) 1056
Marin Onfroy (3.25 / 25.5) 1059		Clos Renaux (2.2 / 36.91) 1052	
Mettais (3.78 / 25.61) 1063		Clozette Douce (2.32 / 33.25) 1054	
Petit Amer (4.43 / 29.65) 1055		Douce Moen (2.43 / 31.85) 1061	
Tardive de la Sarthe (3.68 / 29.51) 1059		Doux Lozon (2.13 / 21.21) 1053	
		Gros Bois (2.86 / 42.15) 1050	
		Gros Oeillet	
		Moulin à Vent (2.7 / 38.96) 1061	
		Muscadet de Dieppe (2.54 / 30.95) 1055	
		Noël des Champs (2.33 / 22.6) 1050	
		Omont (2.2 / 29) 1063	
		Peau de Chien (2.95 / 32.25) 1065	
		Saint Martin (2.27 / 30.09) 1055	

Polyphénols (g/L d'acide tannique), Acidité (méq/L), Masse volumique (kg/m³)

Source "Pommiers à cidre - Variétés de France", J.M. Bore et J. Fleckinger (1997)

Enfin, l'eau-de-vie est obtenue après distillation des cidres au moyen d'un alambic. De nos jours, trois types d'alambic sont utilisés : l'alambic à colonne, l'alambic charentais et l'alquitara (Madrera *et al.*, 2003 ; Rodríguez Madrera *et al.*, 2006). En France, l'utilisation du type d'alambic va dépendre du cahier des charges des AOC mais aussi des pratiques des producteurs pour la production de calvados non AOC (disponibilité, achat etc...). Par exemple, pour obtenir un "calvados Pays d'Auge", l'utilisation d'un alambic charentais est primordiale alors que le cidre doit être distillé dans un alambic à colonne pour obtenir l'AOC "calvados Domfrontais". Une fois distillé, le calvados avoisine les 70° en alcool et va subir un processus de vieillissement en fût.

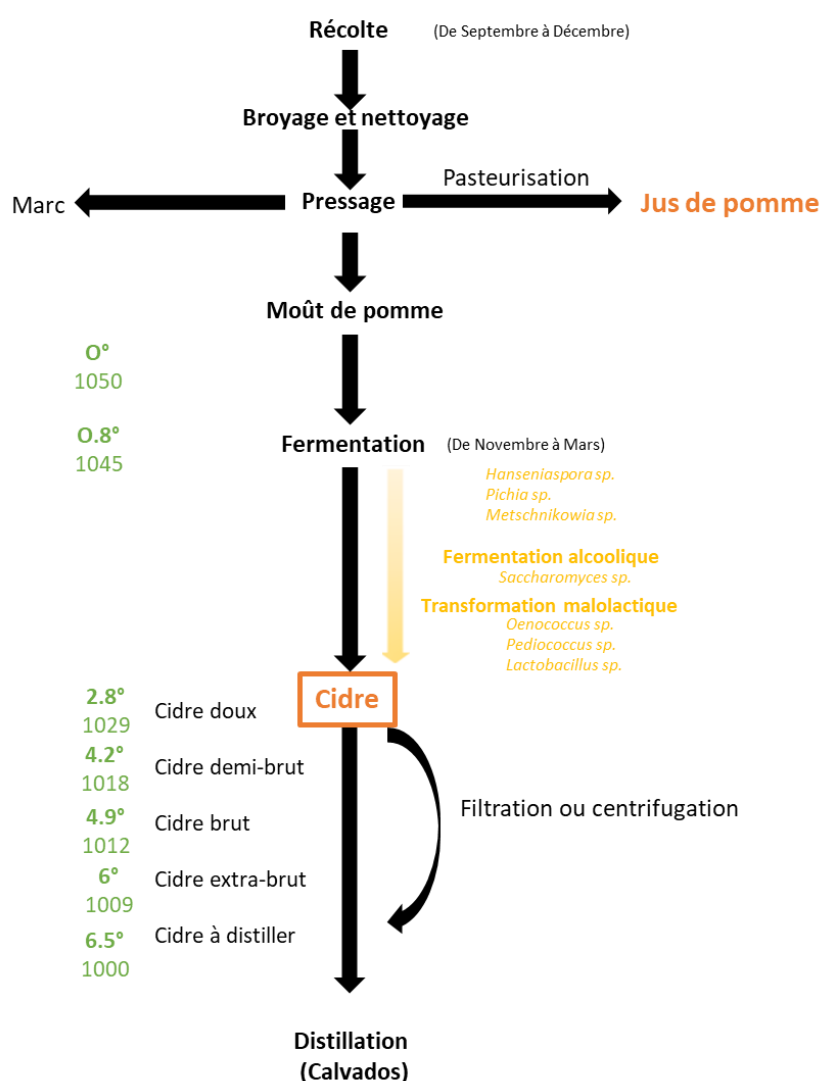


Figure 1. Processus de production industrielle de cidre et de calvados, d'après Cousin *et al.* (2017). Légende : **degré alcoolique et densité.** **Principales levures et bactéries impliquées lors du processus de fermentation.**

3. Paramètres biotiques et abiotiques de fermentation du cidre à distiller

I.3.1. Les flores indigènes

I.3.1.1. Les levures

L'écosystème microbien cidricole se caractérise par des mélanges de populations de genres, espèces et souches différents provenant du sol, de l'eau, des fruits, du matériel ou encore de la cave des producteurs. La surface de la pomme apparaît comme un réservoir naturel comprenant 3,6-7,1 log UFC/g (Unités formant des colonies) de levures. Cette flore complexe est composée majoritairement par des espèces comme *Hanseniaspora valbyensis*, *Metschikowia pulcherrima*, *Pichia anomala*, *Sacharomyces cerevisiae* *luvarum*, *Dekkera/Brettanomyces* et d'autres champignons phytopathogènes. *Metschikowia pulcherrima* et *Pichia anomala* sont des levures fréquemment retrouvées sur les pommes même si elles ne sont pas les principales actrices de la fermentation du cidre (Tableau 2). Le début de fermentation du cidre est caractérisé par la présence de levures dites non-*Saccharomyces* comme *Kloeckera*, *Hanseniaspora* et *Candida* (Valles *et al.*, 2007). La diminution progressive de la quantité d'oxygène lors de la fermentation entraîne le remplacement progressif de cette flore oxydative par les levures du genre *Saccharomyces* dont l'origine est principalement la surface de la pomme, même si elle serait considérée comme un contaminant naturel des matériels de pressage. *Saccharomyces* est la levure non-oxydative majoritaire lors du processus de fermentation du cidre, avec une population pouvant atteindre entre 10⁷ et 10⁸ UFC/mL (Morrissey *et al.*, 2004). Cette levure joue le rôle principal de convertir les sucres en éthanol dans le cidre. La présence naturelle de *Dekkera/Brettanomyces* sur les pommes et son impact sur la qualité organoleptique du cidre sont un problème récurrent pour les producteurs. Ce genre levurien est présent en plus grande quantité lors de la phase de maturation et est connu pour nuire à la qualité aromatique du cidre (Buron *et al.*, 2011a ; Guichard *et al.*, 2019).

I.3.1.2. La flore bactérienne

La diversité bactérienne dans les cides est représentée par un large panel de genres et d'espèces bactériens se succédant de la surface de la pomme jusqu'à la fermentation complète du moût de pomme. Les principales études sur la flore bactérienne dans le cidre portent sur les entérobactéries ou encore la flore d'altération (ex : *Zymomonas mobilis*), mais peu se concentrent sur les dynamiques associées au processus d'élaboration du cidre. Les bactéries présentes dans le cidre peuvent être divisées en trois grands groupes : les bactéries lactiques, les bactéries acétiques et les bactéries d'altération et Cousin *et al.* (2017) ont proposé un tableau

récapitulatif des différentes espèces retrouvées dans l'environnement cidricole (Tableau 2). Le groupe des bactéries lactiques présent lors de la fermentation de la pomme comprend 4 genres : *Lactobacillus*, *Oenococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* (Cousin *et al.*, 2017).

Tableau 2. Diversité microbienne identifiée lors du processus d'élaboration du cidre.

	Famille	Origine	Genres/espèces	Références
Diversité bactérienne	<i>Lactobacillaceae</i>	Fleur de la pomme	<i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus</i> <i>(para)collinoides</i> ,	Claisse <i>et al.</i> , (2001);
		Pomme	<i>Lactobacillus casei</i> ,	Garai <i>et al.</i> , (2007);
		Cidre	<i>Lactobacillus diolivorans</i> ,	Graça <i>et al.</i> , (2015);
			<i>Lactobacillus hilgardii</i> ,	Jung <i>et al.</i> , (2010);
			<i>Lactobacillus sicerae</i>	Puertas <i>et al.</i> , (2014);
			<i>Lactobacillus suebicus</i> , <i>Pediococcus ethanolidurans</i> <i>Pediococcus parvulus</i>	Sánchez <i>et al.</i> , (2010)
Diversité levurienne	<i>Leuconostocaceae</i>	Cidre	<i>Oenococcus oeni</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	El Khoury <i>et al.</i> , (2017); Sánchez <i>et al.</i> , (2012)
	<i>Acetobacteraceae</i>	Fleur de la pomme	<i>Acetobacter sp.</i> ,	Shade <i>et al.</i> , (2013);
		Cidre	<i>Komagataeibacter sp.</i> ,	Trček <i>et al.</i> , (2016)
		Vinaigre	<i>Gluconobacter sp.</i>	
	<i>Sporolactobacillaceae</i>	Cidre	<i>Sporolactobacillus sp.</i>	Coton <i>et al.</i> , (2010)
	<i>Sphingomonadaceae</i>	Cidre	<i>Zymomonas mobilis</i>	Bauduin <i>et al.</i> , (2006); Coton <i>et al.</i> , (2006b)
Diversité levurienne	<i>Saccharomycetaceae</i>	Surface de la pomme	Coliformes et	Graça <i>et al.</i> , (2015);
		Fleur de la pomme	<i>Enterobacteriaceae</i>	Shade <i>et al.</i> , (2013)
		Surface de la pomme	<i>Hanseniaspora valbyensis</i> , <i>Hanseniaspora uvarum</i> <i>Hanseniaspora osmophila</i> ,	Cabranes <i>et al.</i> , (1997); Coton <i>et al.</i> , (2006a); Kurtzman <i>et al.</i> , (2005); Valles <i>et al.</i> , (2007)
		Cidre	<i>Saccharomyces bayanus</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces uvarum</i>	
			<i>Kloeckera apiculata</i> , <i>Candida sp.</i> , <i>Kluyveromyces sp.</i> , <i>Lachancea sp.</i> , <i>Debaryomyces sp.</i> ,	
	<i>Metschnikowiidae</i>	Cidre	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Coton <i>et al.</i> , (2006a); Valles <i>et al.</i> , (2007)
Diversité levurienne	<i>Pichiaceae</i>	Cidre	<i>Pichia anomala</i> , <i>Dekkera/Brettanomyces anomala</i>	Buron <i>et al.</i> , (2011b); Coton <i>et al.</i> , (2006a);
			<i>Dekkera/Brettanomyces bruxellensis</i>	Gray <i>et al.</i> , (2011)
	<i>Trichocomaceae</i>	Surface de la pomme	<i>Penicilium sp.</i>	Tančimová <i>et al.</i> , (2015)

La plupart des LAB sont anaérobies facultatives, acidotolérantes et développent un métabolisme strictement fermentaire. Les travaux de Carr et Davies (1970) ont montré que dans les premiers temps de la fermentation, les bactéries comme *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus mali* se développent puis disparaissent pour laisser la place à *Lactobacillus*

collinoides. Lors de la fermentation alcoolique, la diversité bactérienne chute et les bactéries lactiques sont les mieux adaptées à survivre dans les conditions imposées par la fermentation du cidre (anaérobiose, acidité élevée, tolérance à l'alcool etc.) et à supporter la compétition avec les levures (Bartowsky *et al.*, 2005). G-Alegria *et al.* (2004) ont également montré que les souches d'*Oenococcus oeni* et de *Lactobacillus* sont capables de se développer à pH faible et avec une teneur élevée en alcool dans le vin. La présence des *Leuconostoc* est généralement associée aux conditions de stockage de la matière première et ces bactéries sont principalement retrouvées en début de la fermentation du cidre. Enfin, *Pediococcus* est aussi retrouvé dans le mout de pomme mais en plus faible abondance. Les genres *Oenococcus* et *Lactobacillus* sont les principaux genres bactériens qui participent à la TML, les bactéries du genre *Leuconostoc* n'y contribuant que marginalement (Bartowsky *et al.*, 2005 ; Jung *et al.*, 2010 ; Salih *et al.*, 1990 ; Sánchez *et al.*, 2010). Le genre *Pediococcus* ne participe pas ou peu à la TML.

Les bactéries acétiques sont principalement retrouvées dans le moût fraîchement pressé. Parmi elles sont retrouvés principalement les genres *Gluconobacter*, *Komagataeibacter* et *Acetobacter*. Lors de la fermentation alcoolique, le développement de la flore acétique reste relativement faible. En fin de fermentation, le cidre est majoritairement dominé par la flore lactique et les bactéries acétiques. Des travaux de Passmore *et al.* (1975) ont montré que les bactéries acétiques, bien qu'aérobies et donc incapables de survivre dans les conditions anaérobies, peuvent néanmoins se développer et survivre dans le moût lors de la fermentation et se développer davantage lors de la phase de maturation. Les bactéries acétiques peuvent devenir une flore responsable d'altération dans les cidres (piqûre acétique), entraînant la perte de la production vers du vinaigre, économiquement moins rentable.

I.3.1.3. La flore d'altération

Une fois le cidre stocké en cuve ou en tonneau, le développement de bactéries acétiques peut gravement altérer sa qualité en le rendant impropre à la consommation. Cette altération est liée à l'oxydation par des bactéries telles que *Acetobacter* et *Gluconobacter* de l'éthanol en acide acétique et acétate d'éthyle, ce qui implique qu'elle s'opère en fin de fermentation alcoolique et de maturation (De Roos *et al.*, 2018 ; Passmore *et al.*, 1975). Les conditions de contamination menant à de la piqure acétique dans le cidre sont principalement l'utilisation de fruits de mauvaise qualité et le matériel de stockage (tonneaux, fûtaille) non désinfecté. C'est le contact du cidre avec de l'air (ex : une cuve insuffisamment remplie) qui favorise la croissance des *Acetobacter* ou *Gluconobacter*. Les levures appartenant aux genres *Brettanomyces* et *Dekkera* sont aussi connues pour la production d'acide acétique (Freer *et al.*,

2002). Une teneur trop importante en acétate d'éthyle (120-150 mg/L) entraîne une odeur désagréable. Les autres conséquences sur le cidre sont une baisse du pH par une augmentation de l'acidité totale et volatile.

Les cidres étant riches en sucres et ayant un pH compris entre 3,3 à 4,3, sont sensibles à la prolifération d'une flore d'altération. Un des principaux problèmes organoleptiques rencontré dans le cidre est la "maladie du framboisé". Cette altération a souvent été observée dans les cidres contenant des sucres résiduels avec un pH supérieur à 3,7. Ces conditions favorisent le développement de *Zymomonas mobilis*. Cette bactérie à Gram négatif est capable de produire de l'éthanol à partir du glucose, du fructose et du saccharose via la voie d'Entner-Doudoroff et sa présence est associée à une altération dans la bière ou le poiré (Ingledew *et al.*, 1979 ; Jespersen *et al.*, 1996 ; Swings *et al.*, 1977). La croissance de *Z. mobilis* a été corrélée avec une forte production en acétaldéhyde, rendant le cidre non commercialisable. Les conditions favorisant le développement de *Zymomonas mobilis* sont multiples. Le rôle de l'azote assimilable comme facteur favorisant le risque de framboisé est clairement montré (Bauduin *et al.*, 2006). De plus, un pH bas permet de ralentir la croissance de *Zymomonas*, mais n'influe pas sur les niveaux de populations maximales et la quantité d'éthanal produit. La TML via la production d'acide lactique peut avoir un effet favorisant de façon indirecte (augmentation du pH) la maladie du framboisé.

Enfin, le développement de la flore lactique peut entraîner des désordres organoleptiques notamment via la dégradation du glycérol par le genre *Lactobacillus*. Cette altération, connue sous le nom de piqure acroléique, sera discutée dans le chapitre IV.

I.3.2. Composition physico-chimique du cidre

La pomme est naturellement riche en sucres (environ 10 à 15 % de sucres) et la teneur totale dans les moûts est dépendante des variétés de pommes utilisées (Keller *et al.*, 2004). Les sucres majoritaires dans le cidre de distillation sont le fructose (80 %), le glucose (15 %) et le saccharose (5 %). Lors de la fermentation alcoolique, ces sucres sont dans la quasi-totalité consommés par la flore indigène, notamment par les levures. Préférentiellement, le glucose et le saccharose vont être rapidement consommés et le fructose restera le dernier sucre présent lors de la fermentation. Des mélanges de variétés de pommes sucrées et acides sont utilisés pour l'élaboration des cidres de distillation, complexifiant ainsi la composition physico-chimique du milieu.

Les acides organiques sont multiples et sont principalement présents dans la pulpe. Dans le moût, les principaux acides identifiés sont l'acide malique (représentant 90 % des acides présents), l'acide lactique, l'acide quinique, l'acide succinique ou encore l'acide citrique. En terme quantitatif, la teneur en acide malique varie de 2 à 6 g/L dans le moût. Son pouvoir acidifiant joue un rôle important dans la stabilité bactériologique des produits, notamment dans la limitation du développement de la flore d'altération (exemple : certains genres de la flore lactique, *Zymomonas mobilis* etc.). Outre l'inhibition du développement de la flore d'altération, les acides présents dans le moût participent à la limitation des risques de casse ferrique.

Les composés phénoliques se distribuent en 3 grandes classes : les flavonoides (flavanols, (pro)anthocyanidines), les tanins et les acides hydroxycinnamiques (ex : acide chlorogénique). Leur concentration varie fortement selon les variétés de pommes (plus abondants dans les moûts de pommes amères), pouvant atteindre 200 mg/L dans les jus (Wicklund *et al.*, 2020). Ils sont très importants lors de la fermentation des pommes puisqu'ils participent grandement à l'astringence du produit. Cependant, une métabolisation des composés phénoliques par certaines levures (*Brettanomyces*) peut conduire à la formation de phénols volatils, composés indésirables dans le cidre (Šućur *et al.*, 2016).

Les substances azotées jouent un rôle important dans la biosynthèse des protéines et représentent un des composants essentiels à la croissance et au bon développement des levures (Mendes-Ferreira *et al.*, 2011). L'azote est souvent un facteur limitant dans les moûts, avec une concentration pouvant varier de 40 mg/L à plus de 150 mg/L et il joue donc un rôle primordial dans la cinétique fermentaire (Bell *et al.*, 2005). En effet, un taux trop faible en azote conduit à une fermentation rapide et incomplète alors qu'un trop fort taux peut entraîner une fermentation plus longue dans le temps et entraîner des interventions humaines (ex : clarification). L'azote est présent sous deux formes différentes : sous forme minérale (représenté majoritairement par de l'azote ammoniacal NH_3) ou sous forme organique (acides aminés). Parmi ces acides aminés nous pouvons noter l'asparagine, la glutamine, l'acide aspartique, l'acide glutamique et la sérine qui représentent environ 90 % des acides aminés du moût et peuvent être utilisés par les levures. Durant la fermentation alcoolique, les levures vont utiliser la grande majorité de l'azote présent dans le moût. Une fois la fermentation alcoolique terminée, la flore meurt et libère par la suite les différents acides aminés pouvant être réutilisés par les bactéries (ex : acide glutamique, valine). La composition en acides aminés change ensuite puisque le développement de la flore lactique conduit à la libération d'alanine, phénylalanine dans le moût. En plus de

jouer un rôle important pour le développement microbien, ce paramètre physico-chimique peut aussi influencer la composition aromatique lors de la fermentation des pommes.

4. La composition aromatique des cidres

La composition des composés volatils dans le cidre dépend des pratiques des producteurs, du choix des variétés de pommes, des conditions de stockage mais surtout du métabolisme microbien (Rosend *et al.*, 2019). Les précurseurs aromatiques sont des composés non volatils comme les précurseurs glycosylés, les acides phénols (formation de phénol volatils) et les acides gras insaturés (formation d'hexanol). En comparaison avec le vin, peu d'études ont été axées sur la qualité organoleptique mais des travaux amorcés par l'IFPC (Institut Français des Productions Cidricoles) ont pu mettre en évidence plusieurs composés volatils impliqués dans la perception aromatique des cidres de consommation (Tableau 3). Les composés les plus aromatiques présents dans les cidres sont les esters (78 à 92 % des composés volatils totaux), les alcools (6 à 16 % des composés volatils totaux) et les aldéhydes.

Dans les calvados, les composés aromatiques principaux sont les esters, les alcools et les aldéhydes (Guichard *et al.*, 2003). Les travaux de Ledauphin *et al.* (2010) ont montré la différence de composition aromatique entre 4 eaux-de-vie produites en France (Armagnac, Cognac, Calvados et Mirabelle). Les eaux-de-vie de calvados possèdent des caractéristiques aromatiques propres et se caractérisent par des concentrations plus importantes en 3-ethoxypropanal, en 1,1,3-triethoxypropane, en alcool allylique, en 3,3-diethoxypropanol, en acroléine, en butan-2-ol et en ethyl 2-methylbutyrate.

Même si les pratiques et les choix des producteurs influent le profil aromatique du cidre de consommations (ajout de sucres, SO₂, levure, variétés de pomme, température de fermentation), les différences perceptibles des arômes sont aussi attribuées aux différentes étapes de fermentation de la pomme, ce qui est d'autant plus vrai pour le cas d'une fermentation spontanée non maîtrisée comme le cas des cidres de distillation (Rita *et al.*, 2011). En effet, la fermentation représente un écosystème complexe mettant en avant de nombreuses interactions bactériennes et fongiques et est liée à diverses propriétés sensorielles (Bokulich *et al.*, 2016). Sans aucune intervention de la part des producteurs, la plupart des arômes sont produits pendant la fermentation du cidre de distillation et des précurseurs aromatiques vont donc directement provenir de l'activité microbienne.

La fermentation alcoolique conduit à la formation d'alcool, d'esters et de phénols (Álvarez-Pérez *et al.*, 2012). La transformation malolactique entraîne un des changements

majeurs organoleptiques du cidre (Bae *et al.*, 2006 ; Cousin *et al.*, 2017 ; Lonvaud-Funel *et al.*, 2009). Certains arômes présents ou produits lors de la fermentation alcoolique disparaissent ou changent après la fermentation malolactique (Lonvaud-Funel *et al.*, 1999 ; de Revel *et al.*, 1999). Une étude de Maicas *et al.* (1999) montre que la TML permet une production plus importante d'alcools, d'esters et d'acides. Les LAB peuvent également produire des alcools, des acides gras, des lactones et des composés sulfurés et azotés (Swiegers *et al.*, 2005). Les différents arômes produits ont été identifiés et décrits sensoriellement (Table 3).

I.4.1. Les esters

Les esters sont connus pour participer à la complexité aromatique du cidre et du vin (Sumby *et al.*, 2010). Ces composés sont des produits de l'estérification formés par réaction d'un oxacide (acide contenant de l'oxygène) avec de l'alcool et sont particulièrement intéressants puisqu'ils ont des seuils de perception bas (0,1 à 4 mg/L). La réaction d'estérification peut se faire sur des acides par l'éthanol (esters éthyliques) ou sur des alcools supérieurs par l'acetyl-CoA (esters d'acétate). Dans les cidres de distillation et les calvados, les esters sont retrouvés en grande quantité par rapport aux autres molécules aromatiques (alcools supérieurs, phénols volatils etc.), suggérant un pouvoir d'estérification important. Les esters présents lors de la fermentation du moût de pomme sont divers. Bien que l'acétate d'éthyle représente jusqu'à 90 % des esters totaux, une quinzaine de ces molécules ont été identifiées (ex : caprylate, laurate d'isoamyle etc.) (Lilly *et al.*, 2000 ; Xu *et al.*, 2006). La forte production de ces esters a été notamment retrouvée chez une flore secondaire de la fermentation, *Hanseniaspora valbiensis* (Wei *et al.*, 2019, 2020). Avec l'acétate d'éthyle, le lactate et le succinate d'éthyle sont les principaux esters dont la présence n'est pas souhaitée dans les cidres de distillation et dans le calvados. En effet, si une production trop élevée est constatée et dépasse le seuil de perception aromatique, ces molécules peuvent avoir un effet masquant d'autres arômes. Avec un seuil de perception à 150 mg/l et l'apparition possible de notes lactées voire de lait aigre, l'excès de lactate d'éthyle est parfois responsable de défauts olfactifs dans les vins. Pourtant, les travaux de Mosciano *et al.* (1993) portant sur la description de cet arôme définissent le lactate d'éthyle comme étant doux, fruité, apportant des notes d'ananas et de caramel. Cet arôme est même considéré comme un marqueur de l'activité de la TML et la présence de la flore lactique dans le vin (Kaunzinger *et al.*, 1996). La filière cidricole préconise la limitation de cette molécule et caractérise cet arôme comme indésirable dans les cidres de distillation.

Tableau 3. Liste de quelques esters, alcools supérieurs et phénols volatiles avec leurs descripteurs associés, le seuil de perception analysé dans les vins et la bière, et les concentrations maximales retrouvées lors de la fermentation des pommes adaptée d'une fiche technique de l'IFPC.

Arômes	Noms	Descripteurs sensoriels associés	Seuil de perception (mg/L)	Quantité maximale (mg/L)	Références
Alcools supérieurs	2-Phényléthanol	Rose	125	112,9	Meilgaard <i>et al.</i> , (1975) Tan <i>et al.</i> , (2004)
	3-méthylbutan-1-ol	Whisky	70	190,5	
	2-méthylbutan-1-ol	Vineux	65	38,7	
	Isobutanol	Vineux	200	49,3	
	Pentanol	Alcool de fusel	80	0,07	
	Hexanol	Vert, herbacé	4	36	
Esters	Acétate de 2-phényléthyle	Rose	3,8	3,5	Meilgaard <i>et al.</i> , (1975) Tan <i>et al.</i> , (2004) Boelens <i>et al.</i> (1993)
	Acétate d'isoamyle	Banane	1,2	2,7	
	Ethyl 3-méthylbutanoate	Pomme	1,3	0,3	
	Ethyl 2-méthylbutanoate	Pomme	0,3	0,4	
	Ethyl 2-méthylpropanoate	Fruité, doux	0,1	0,1	
	Acétate de pentyle	Banane, poire	?	0,1	
	Acétate d'hexyle	Poire	3,5	3,9	
Phénols volatils	4-éthylphénol	Gouache, cuir	>2	5,6	Buron <i>et al.</i> , (2012) ; Simon <i>et al.</i> , (2006)
	4-vinylphénol	Sparadrap	?	3,6	
	4-éthylcatéchol	Fumé, camphre	>20	104,3	
	4-éthylgâïacol	Clou de girofle	0,8	1,1	
	4-vinylgâïacol	Sparadrap	?	0,1	
Composés soufrés volatils	Sulfure d'hydrogène	Œuf pourri	0,8	?	Mestres <i>et al.</i> , (2000) (2000) ; Bertrand <i>et al.</i> , (2010)
	Méthanetiol	Putréfaction	0,3	?	
	Ethanetiol	Putréfaction	0,1	?	
	Sulfure de diméthyle	Truffe, framboise	5	?	
	Sulfure de diéthyle	Choux cuits,	6	?	
	Disulfure de carbone	Caoutchouc	110	?	
	Disulfure de diéthyle	Caoutchouc	20	?	
	Disulfure de diméthyle	Choux cuits	2,5	?	

I.4.2. Les alcools supérieurs

Les alcools supérieurs sont des alcools avec plus de deux atomes de carbone, excluant ainsi le méthanol et l'éthanol (Pires *et al.*, 2014 ; Stribny *et al.*, 2015). Les alcools supérieurs regroupent l'isobutanol 1, le propanol 1, les pentanols (méthyl-2-butanol-1, méthyl-3-butanol-1), l'hexanol, le phényl-2-éthanol et les butanols 1 et 2 (Herrero *et al.*, 2006) . D'une manière générale, les alcools supérieurs sont plutôt jugés négativement, masquant le fruité et apportant de la lourdeur bien qu'une corrélation positive ait été rapportée entre le n-butanol, le phényléthanol et la qualité aromatique (Pires *et al.*, 2014). Cependant, leur seuil de détection est bien plus important que celui des esters (4-200mg/L). Leur production est liée au métabolisme des produits azotés présents dans le moût de pomme (Pires *et al.*, 2014). Les travaux de Kanter *et al.* (2020) ont montré qu'une surproduction des alcools supérieures

pourrait impacter le profil aromatique du vin. Du fait du faible taux en azote assimilable (maximum 100-150mg/L) dans les cidres de distillation, la production d'alcool supérieur est bien moins importante que dans le vin. Le microorganisme responsable de cette production reste en majorité le genre *Saccharomyces (uvarum/cerevisiae)* (Pires *et al.*, 2014 ; Stribny *et al.*, 2015). Du fait de leur faible taux dans le cidre et du seuil de perception relativement élevé, ces arômes bien que produits ne permettent pas de jouer un rôle prédominant sur la qualité sensorielle du cidre. Seul le phényléthanol présente des taux similaires et reste une molécule intéressante dans la qualité aromatique du cidre puisqu'elle apporterait des notes de rose (Xu *et al.*, 2006).

I.4.3. Les phénols volatils

Les phénols volatils regroupent un ensemble de molécules qui proviennent de la transformation des acides cinnamiques de la matière première. Ces composés peuvent être divisés en 2 sous-groupes : les vinyls-phénols et les éthyls-phénols. Les phénols volatils regroupent principalement le vinyl et l'éthylphénol, le vinyl et l'éthylgâïacol, et l'éthylcatéchol. Ces molécules ne sont pas souhaitées dans les cidres de distillation puisqu'elles sont associées à des descripteurs défavorables, comme des notes "animales", de "cuir", de "gouache" ou encore de "sparadrap". Les phénols volatils sont d'autant plus indésirables du fait d'une suspicion d'un potentiel effet masquant de certains esters, voire de leur potentiel à engendrer un défaut aromatique (Le Quéré *et al.*, 2006). Différents acteurs microbiens sont impliqués dans leur production. La production de ces composés est principalement effectuée via le métabolisme de l'azote et du soufre par les levures (Landaud *et al.*, 2008; Ugliano *et al.*, 2009). Le principal acteur impliqué dans la production de phénols volatils est la levure *Brettanomyces/Dekkera*, naturellement présente dans les moûts de cidre. Son impact sur la qualité organoleptique du cidre est double : cette levure est capable de synthétiser les phénols volatils et, d'un autre côté, a une activité estérase capable d'augmenter la teneur en lactate d'éthyle et en acétate d'éthyle et de dégrader l'acétate d'isoamyle (Buron *et al.*, 2011a ; Guichard *et al.*, 2019). Des travaux sur les conditions de développement de *Dekkera/Brettanomyces* ont été réalisés. Le premier paramètre est la qualité de la matière première puisqu'une pomme de mauvaise qualité est une source plus importante de *Dekkera/Brettanomyces*. Améliorer l'hygiène du matériel de pressage et des cuves limiterait son développement. Lors de la fermentation du cidre, une température inférieure à 6°C entraîne une réduction significative du taux de croissance de *Brettanomyces* (Šućur *et al.*, 2016). D'autres paramètres comme la présence d'oxygène ou encore la matière azotée pourraient influencer le développement de *Brettanomyces*.

Les bactéries lactiques, en moindre mesure, sont, elles aussi, capables de produire des phénols volatils. Le travail de Buron *et al.* (2012) a montré la capacité de *L. collinoides* à produire du 4-éthyl-catéchol, du 4-éthylphénol, et du 4-éthylparagiacol à partir d'acides caféique, p-coumarique et férulique respectivement. De même, le travail de Couto *et al.* (2006) a montré que des souches de *L. brevis*, *L. collinoides* et *L. plantarum* sont capables de produire le 4-éthylphénol alors que certaines souches de pédiocoques ont pu produire du 4-vinylphénol. Les souches d'*Oenococcus oeni* et *Leuconostoc mesenteroides* étudiées n'ont produit aucun des phénols volatils à partir des différents acides (p-coumarique et acide férulique).

I.4.4. Les composés soufrés volatils

Largement étudiés dans les modèles viticoles et autres produits fermentés, les composés soufrés volatils (CSV) se répartissent en 2 catégories selon leur volatilité : les composés soufrés “légers” et “lourds”. Dans le cidre, les CSV “légers” sont représentés par le sulfure de dihydrogène (H₂S), le disulfure de carbone, le diméthylesulfure, le méthanéthiol et l'éthanthiol. Ces composés sont associés à des défauts sensoriels (notes d’“œuf pourri”) lorsqu'ils atteignent leur seuil de perception, de l'ordre du µg/L. Les principaux CSV “lourds” identifiés dans le cidre sont le méthionol, l'acide 3-méthylthiopropanoïque et le 3-méthylthiopropanoate d'éthyle et sont aussi associés à des odeurs défavorables. Leur production est principalement réalisée par les levures, via leur métabolisme de l'azote et du soufre (Arfi *et al.*, 2006 ; Sreekumar *et al.*, 2009). L'étude de Vallet *et al.* (2008) a également montré qu'*Oenococcus oeni* était capable de produire des CSV à partir de méthionine dans le vin.

I.4.5. Les aldéhydes

Parmi l'ensemble des aldéhydes présents lors de la fermentation du moût de pomme, l'éthanal et les acétals sont les plus importants. On les associe à des notes étherées, herbacées avec un descripteur aromatique de type “alcool à brûler” qui participent à l'agressivité des produits. Une forte production en aldéhyde engendrera une tendance à masquer le fruité. Encore une fois, les pratiques des producteurs peuvent influencer la production de ces composés. Dans le cas du cidre de consommation, l'ajout de sulfites (SO₂) provoque une augmentation significative de la formation d'acétaldéhyde (Li *et al.*, 2017). Le cidre de distillation ne subissant aucune intervention de la part des producteurs, la formation de ces composés indésirables reste totalement dépendante du développement et du métabolisme des microorganismes. Par exemple, l'oxydation de l'éthanol par des levures *non-Saccharomyces* (*Candida*, *Hanseniaspora*) et par *Saccharomyces* entraîne la production d'acétaldéhyde,

causant des défauts de vinification (Li *et al.*, 2017). Dans le cas particulier du cidre de distillation, l'éthanal peut être également produit par la bactérie *Zymomonas mobilis* à partir des sucres résiduels mais aussi de l'éthanol déjà présent (Coton *et al.*, 2006b).

Dans le cadre du projet MoNArC, les travaux ont porté sur l'identification de 67 composés aromatiques (Tableau 4).

Tableau 4. Liste des composés aromatiques (désirables, incertains, indésirables) analysés dans les cidres de distillation.

Esters			Alcools		
Nom de la molécule	N° CAS	Méthode d'identification	Nom de la molécule	N° CAS	Méthode d'identification
Ethyl propionate	105-37-3	GC-MS	6-methyl-5-hepten-2-ol	1569-60-4	GC-MS
Methyl butyrate	623-42-7	GC-MS	4-vinyl anisol	637-69-4	GC-MS
Ethyl isobutyrate	97-62-1	GC-MS	1-Octanol	111-87-5	GC-MS
Ethyl 2-methylbutyrate	7452-79-1	GC-MS	3-Pentanol	584-02-1	GC-FID
Ethyl isovalerate	108-64-5	GC-MS	1-Pentanol	71-41-0	GC-FID
Pentyl acetate	628-63-7	GC-MS	1-Octen-3-ol	3391-86-4	GC-FID
Ethyl caproate	123-66-0	GC-MS	Cis-3-hexen-1-ol	928-96-1	GC-FID
Cis-hexenyl acetate	3681-71-8	GC-MS	Butanol-2	78-92-2	GC-FID
Isoamyl caprylate	2035-99-6	GC-MS	Propanol-1	71-23-8	GC-FID
Isoamyl laurate	6309-51-9	GC-MS	Isobutanol	78-83-1	GC-FID
Phenylethyl caprylate	5457-70-5	GC-MS	Allylic alcohol	107-18-6	GC-FID
Ethyl palmitate	628-97-7	GC-MS	Butanol-1	71-36-3	GC-FID
Ethyl stearate	111-61-5	GC-MS	Methyl-2-butanol-1	137-32-6	GC-FID
Phenylethyl caproate	6290-37-5	GC-MS	Methyl-3-butanol-1	123-51-3	GC-FID
Isobutyl acetate	110-19-0	GC-MS	Hexanol-1	203-852-3	GC-FID
Ethyl valerate	539-82-2	GC-MS	Phenyl-2-éthanol	60-12-8	GC-FID
Ethyl heptanoate	106-30-9	GC-MS	Aldéhydes		
Ethyl benzoate	93-89-0	GC-MS	Nom de la molécule	N° CAS	Méthode d'identification
Ethyl 3-(methylthio)propionate	13327-56-5	GC-MS	Nonanal	124-19-6	GC-MS
Butyl acetate	123-86-4	GC-FID	Decanal	112-31-2	GC-MS
Ethyl-3-hydroxybutyrate	5405-41-4	GC-FID	Isobutanol	78-84-2	GC-FID
Ethyl-2-hydroxycaproate	52089-55-1	GC-FID	Ethanol	75-07-0	GC-FID
2-Phenylethyl acetate	103-45-7	GC-FID	Acrolein	107-02-8	GC-FID
Isoamyl caprate	2306-91-4	GC-FID	Acetal		GC-FID
Isobutyl caprate	30673-38-2	GC-FID	Methanol	67-56-1	GC-FID
Ethyl acetate	141-78-6	GC-FID	Furfural	98-01-1	GC-FID
Ethyl butyrate	105-54-4	GC-FID	Phénols volatiles		
Hexyl acetate	142-92-7	GC-FID	Nom de la molécule	N° CAS	Méthode d'identification
Ethyl lactate	687-47-8	GC-FID	Ethylguaicol	2785-89-9	LC-UV
Isoamyl acetate	123-92-2	GC-FID	4-Ethylphenol	123-07-9	LC-UV
Diethyl succinate	123-25-1	GC-FID	4-Ethylcatechol	1124-39-6	LC-UV
Ethyl furoate	614-99-3	GC-FID	Vinylguaicol	7786-61-0	LC-UV
Ethyl caprylate	106-32-1	GC-FID	4-Vinylphenol	2628-17-3	LC-UV
Ethyl caprate	110-38-3	GC-FID			
Ethyl laurate	106-33-2	GC-FID			
Ethyl myristate	124-06-1	GC-FID			
Ethyl formate	109-94-4	GC-FID			
Phenylethyl acetate	103-45-7	GC-FID			

II. Diversité microbienne et maîtrise de la fermentation

1. Maîtrise de la qualité sanitaire et organoleptique par la fermentation

II.1.1. Amélioration de la qualité sensorielle et nutritionnelle

Le processus de fermentation modifie les propriétés organoleptiques de la matière première. Il peut améliorer le goût, la couleur, l'astringence, la saveur et même la texture (Cocolin *et al.*, 2009). De nos jours, les boissons fermentées sont connues pour favoriser la digestion (décomposition des protéines en acides aminés), préserver la flore intestinale et améliorer le système immunitaire (Marco *et al.*, 2017). L'intolérance au gluten ou au lactose peut être

contournée par de nouvelles stratégies d'élaboration de boissons fermentées (Shah *et al.*, 2013). D'autres études ont rapporté les activités anti-oxydantes au sein des produits fermentés (Park *et al.*, 2011 ; Thokchom *et al.*, 2012). Lors de la fermentation, l'activité microbienne peut entraîner une dégradation de matières dites non-nutritives et un enrichissement en substrats comme des vitamines et des acides aminés (Tamang *et al.*, 2015; Tamang *et al.*, 2016). Les études récentes montrent l'intérêt de caractériser la communauté microbienne et les composés aromatiques associés (Antalick *et al.*, 2012 ; Comitini *et al.*, 2017 ; De Roos *et al.*, 2019 ; Guichard *et al.*, 2019 ; Lonvaud-Funel *et al.*, 1999 ; Morrison-Whittle *et al.*, 2018 ; de Revel *et al.*, 1999). La plupart mettent en évidence la capacité des levures à produire des arômes, notamment des esters, mais aussi à dégrader certains composés aromatiques.

II.1.2. Maîtrise et qualité sanitaire

Dans un écosystème complexe, la flore microbienne responsable de la fermentation peut entraîner des changements majeurs et favoriser la conservation des aliments par son potentiel antimicrobien (Adams *et al.*, 1997 ; Adams *et al.*, 2002). Certains micro-organismes pathogènes et d'altération naturellement présents peuvent être inhibés par la production de métabolites acides(ex : acide lactique, acide acétique, etc.), la transformation de produits chimiques ou composés toxiques (ex : acide malique/lactique, glycérol) (Hammes *et al.*, 1994).

Les activités antagonistes des levures envers les bactéries indésirables et les autres champignons sont largement connues (Hatoum *et al.*, 2012 ; Mendoza *et al.*, 2010 ; Mufandaedza *et al.*, 2006). Ces activités sont principalement associées à leur compétition pour les nutriments, à l'acidification du milieu de croissance, à leur tolérance à des concentrations élevées d'éthanol et à la libération de composés antimicrobiens comme les toxines antifongiques et antibactériennes (Golubev *et al.*, 2006 ; Young *et al.*, 1978). L'effet antimicrobien d'un grand nombre de bactéries lactiques est également connu. Depuis les années 1980, plusieurs espèces de *Lactobacillus* isolées de produits fermentés ont montré une capacité de production d'agents anti-microbiens comme la réutéline, et sont étudiées pour de multiples utilisations industrielles (Asare *et al.*, 2020 ; Axelsson *et al.*, 2009 ; Gonzáles *et al.*, 2019 ; Saranraj *et al.*, 2010 ; Schaefer *et al.*, 2010 ; Talarico *et al.*, 1988). D'autres bactériocines provenant d'isolats de bactéries lactiques ont suscité beaucoup d'attention pour le contrôle des agents pathogènes dans les aliments. Parmi elles, la nisine ou encore la pediocine produites respectivement par *Lactococcus lactis* et *Pediococcus sp.* sont actives contre un large spectre de bactéries (Elyas *et al.*, 2015 ; Oliveira *et al.*, 2020). Outre la production d'agents anti-

microbiens, la principale activité antimicrobienne des lactobacilles est liée à la production d'acide lactique et à la baisse du pH qui en résulte. Cette modification physico-chimique, en plus de limiter la prolifération bactérienne néfaste au produit, permet une amélioration de la qualité organoleptique du produit (Lombardi *et al.*, 2020).

II.1.3. Autres fonctionnalités

Les fruits et les légumes contiennent des acides aminés, des acides gras, des vitamines (C, B et E), des flavonoïdes, des stérols, de l'acide phénolique pouvant avoir un effet protecteur contre certaines maladies comme le cancer, le diabète, l'obésité etc... (Schrezenmeir *et al.*, 2001). Les produits fermentés naturellement riches en probiotiques contribuent à l'amélioration du bien-être général et de la santé. Les probiotiques sont désignés comme des microorganismes qui, consommés en quantités suffisantes, ont une influence positive sur la physiologie et la santé de l'hôte, notamment en équilibrant la microflore dans le tube digestif (Schrezenmeir *et al.*, 2001). Une revue a recensé les études montrant l'efficacité des mélanges probiotiques (principalement des LAB) plutôt que l'administration d'une seule souche (Timmerman *et al.*, 2004). Les recherches actuelles visent à comprendre les dynamiques impliquées lors de la progression de la fermentation pour assurer des propriétés sensorielles constantes ou nouvelles et améliorer la qualité du produit en limitant les altérations (Belda *et al.*, 2015 ; Egli *et al.*, 1998).

2. Outils d'étude de la biodiversité microbienne

L'étude de l'écologie microbienne au sein des aliments a radicalement changé depuis quelques années. Des applications récentes portant sur la transcriptomique, la protéomique, la métabolomique ainsi que sur la génomique fonctionnelle ont été utilisées de façon à mieux comprendre le comportement des micro-organismes lors du processus de fermentation des aliments. Ces techniques permettent d'aller plus loin dans l'étude de la physiologie bactérienne mais aussi de mettre au point des méthodes d'identification et de détection des microorganismes associés aux aliments. Pendant des décennies, les approches classiques de microbiologie basées sur la culture sont restées le meilleur moyen d'identifier, de quantifier et de sélectionner les levures et les bactéries dominant les produits fermentés. Ces techniques révèlent des limites en termes de seuil de détection ou d'appréciation de la diversité "réelle" (ex : 0,1 à 10 % de bactéries cultivables d'une communauté microbienne totale selon le biotope étudié). C'est pourquoi de nouvelles stratégies ont été élaborées pour mettre en évidence les groupes taxonomiques non observables par les méthodes traditionnelles (Juste *et al.*, 2008). Les

principales sont basées sur le ciblage de l'ADN (PCR, DGGE, T-RFLP, métagénomique) et sont présentées dans le Tableau 5.

II.2.1. PCR-DGGE

La PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis / électrophorèse sur gel en gradient dénaturant) consiste en une séparation électrophorétique des produits PCR dans un gel de polyacrylamide contenant un gradient d'agents dénaturant chimiques permettant ainsi de distinguer des produits PCR qui diffèrent dans leur composition en bases. La DGGE est une technique d'analyse de profils de communautés microbiennes et a été menée dans de nombreuses recherches sur la fermentation. La DGGE a été appliquée sur des produits laitiers (Quigley *et al.*, 2012), sur les grappes de raisin (Barata *et al.*, 2012), dans la fermentation du vin et de la bière (Bokulich *et al.*, 2012 ; Cocolin *et al.*, 2011) et dans l'étude de l'altération des produits fermentés comme la bière (Spitaels *et al.*, 2014 ; Stratford *et al.*, 2006). Même si cette méthode se révèle appropriée pour l'étude de l'écologie microbienne au sein des produits fermentés, il convient de préciser que cette méthode n'est pas quantitative (Ercolini *et al.*, 2004). Selon Cocolin *et al.*, (2001), le seuil de détection serait à 10^3 UFC/mL ou g. A cela s'ajoutent les difficultés techniques (expérimentation longue), la nécessité d'utiliser d'autres techniques comme le séquençage pour identifier les bandes mais aussi le coût non négligeable. Cocolin *et al.* (2013b) ont démontré le potentiel de cette technique pour suivre les dynamiques bactériennes pendant la fermentation, mettant en évidence les populations microbiennes dominantes et proposent de nombreuses optimisations. Malgré la faible sensibilité de la PCR-DGGE et son incapacité à analyser les environnements à forte diversité au niveau de l'espèce, cette technique, peu adaptée aux analyses à haut débit, reste néanmoins un outil complémentaire dans l'analyse des communautés microbiennes (Andorrà *et al.*, 2010).

II.2.2. T-RFLP

Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction terminaux (T-RFLP) est une méthode d'analyse des communautés basée sur la digestion de fragments PCR d'un gène (amorces universelles ciblant l'ARNr 16S pour les bactéries ou espaceur transcrit interne (ITS) pour les champignons et les levures) en utilisant des enzymes de restriction et en détectant les fragments terminaux de chaque organisme à l'aide d'un séquenceur d'ADN (Liu *et al.*, 1997 ; Marsh *et al.*, 1999). Comme cette approche nécessite d'extraire et d'amplifier par PCR l'ADN, les biais inhérents à ces techniques auront une incidence sur les résultats de l'analyse. Deux séquences distinctes pouvant partager un site de restriction de terminal similaire mènent à un

même pic. Même en appliquant plusieurs enzymes de restriction, donner une estimation de l'abondance relative des phylotypes dans une communauté conduit à une appréciation inappropriée de la diversité totale dans le biotope étudié et revient à simplifier la structure de la communauté. Ainsi, la résolution est compromise dans des échantillons très divers. Cette méthode a été principalement utilisée sur les dynamiques microbiennes de la fermentation de vins altérés (Bokulich *et al.*, 2012), du thé kombucha (Chakravorty *et al.*, 2016) ou pour la caractérisation de la flore lactique dans le suan-tsai (Chen *et al.*, 2006).

II.2.3. PCR quantitative (qPCR)

La PCR quantitative en temps réel (qPCR) est considérée comme l'une des meilleures méthodes de détection et de quantification des microorganismes et plus particulièrement en mettant l'accent sur les principaux pathogènes responsables de défauts alimentaires (*Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*) (Postollec *et al.*, 2011). De plus, la plupart des études basées sur la composition microbienne des aliments fermentés ont utilisé la qPCR. Cette application a été principalement utilisée dans le fromage, le vin et le kimchi (Grattepanche *et al.*, 2005 ; Hierro *et al.*, 2006 ; Park *et al.*, 2010). La diversité de la flore lactique lors de la fermentation du fromage a été identifiée et quantifiée par cette méthode (Grattepanche *et al.*, 2005). Le travail de Zago *et al.* (2009) a permis d'identifier et de quantifier la présence bénéfique d'*Enterococcus gilvus* dans le fromage en ciblant le gène codant pour la phénylalanine-tRNA synthase (*pheS*). Selon Hierro *et al.*, (2006), cette méthode est très sensible pour suivre quantitativement la population levurienne lors du processus de vinification. Plus récemment, cette méthode a été utilisée pour la quantification de probiotiques et a été appliquée à l'étude de la dynamique de croissance microbienne au sein des produits fermentés (Le Dréan *et al.*, 2010 ; Masco *et al.*, 2007). Cependant, l'utilisation d'amorces spécifiques ne permet pas d'obtenir une image globale de la diversité des aliments fermentés. Pour minimiser ces inconvénients, Bokulich et Mills (2018) ont proposé une sélection d'amorces ITS spécifiques afin d'explorer le biais d'amplification lié à l'analyse des profils des communautés fongiques en comparant les amorces à une communauté fictive, la "mock community" (une composition théorique connue d'ADNg de plusieurs genres levuriens). La qPCR peut alors proposer plusieurs quantifications des différents membres individuels de la communauté mais la RT-qPCR est maintenant la technique la plus utilisée pour étudier la croissance microbienne et les dynamiques microbiennes.

Tableau 5. Résumé des avantages et des inconvénients des méthodes d'identification des communautés microbiennes dans les produits fermentés.

Méthode	Principe	Avantages	Inconvénients	Références dans les produits fermentés
DGGE	Séparation des séquences hétérologues par dénaturation chimique ou par la chaleur	Séparation d'amplicons "single base-pair"; ciblage de l'ADN et de l'ARN	Techniquement difficile; nécessité de refaire du séquençage pour identifier les bandes; cher et long à expérimenter; la co-migration de séquences similaires peut induire des erreurs d'identification	Bester <i>et al.</i> (2016) Milanovic <i>et al.</i> (2018)
qPCR	Quantification de la séquence cible basé sur le seuil exponentiel amplification du double brin ADN lié par un colorant reporter	Quantitative et précise	Demande des amorces spécifique pour une population; La quantification de l'abondance influencée par les différences d'expression à différents états physiologiques	Hierro <i>et al.</i> (2006) Postollec <i>et al.</i> (2011)
T-RFLP	digestion de fragments PCR d'un gène et détection des fragments terminaux	Sensible; rapide; peu coûteuse; facile d'utilisation	Résolution compromise par des échantillons avec une forte diversité	Morgan <i>et al.</i> (2017) Martin <i>et al.</i> (2005)
Illumina Sequencing	Séquençage par synthèse reposant sur la détection de fluorescence	Grande résolution; moins chère que le pyroséquençage; meilleure couvertures de séquences que le pyroséquençage	Coûteuse; Moins bonne résolution que le pyroséquençage	Morgan <i>et al.</i> (2019) Bokulich <i>et al.</i> (2015)
454 Life Sciences Pyrosequencing	Séquençage par incorporation de base et détection par libération de pyrophosphate et l'activité de luciférase	Hautement résolutive	Plus coûteuse que le séquençage par Illumina et moins bonne couverture que le séquençage Illumina	Koyanagi <i>et al.</i> (2011) Nam <i>et al.</i> (2012)

II.2.4. Apport de l'approche par métagénomique comme outil de surveillance du processus de fermentation

La description des communautés microbiennes lors de la fermentation soulève plusieurs questionnements scientifiques. La caractérisation approfondie des communautés microbiennes ainsi que leurs dynamiques vont alors permettre d'évaluer les biomarqueurs du produit de qualité ou de détérioration et permettre de mieux contrôler les conditions de fermentation pour améliorer le contrôle du processus. De nombreuses études ont montré l'impact des interactions microbiennes sur la qualité et la stabilité des produits fermentés. Pourtant, ces produits révèlent des écosystèmes microbiens complexes dont la diversité et le niveau d'organisation demeurent largement sous-estimés (Botta *et al.*, 2012). Tous les inconvénients des méthodes précédentes ont mené à de nouvelles stratégies comme le séquençage NGS (Next Generation Sequencing), qui est devenu une véritable révolution dans l'analyse des écosystèmes biologiques. Jusqu'à présent, les plateformes de pyroséquençage (454) et de séquençage Illumina sont les plus couramment utilisées pour les études écologiques dans les produits fermentés (Tableau 6). Bien

que ces deux plateformes opèrent sur un séquençage par synthèse, la chimie utilisée diffère. Ces approches impliquent principalement l'utilisation du gène d'ARN ribosomal de la petite sous-unité bactérienne (ARNr 16S) et des Internal Transcribed Spacer chez les levures (ITS), en raison de leur validation respective comme marqueur universel de l'évolution des eubactéries et des champignons (Cocolin *et al.*, 2013a ; Juste *et al.*, 2008 ; Sun *et al.*, 2014 ; Woese *et al.*, 1998). L'approche par NGS permet de déterminer le nombre d'unités taxonomiques opérationnelles (OTUs : Operational Taxonomic Units) présentes dans un écosystème et d'en estimer la composition microbienne. La littérature portant sur les communautés microbiennes alimentaires évaluées par l'approche par métagénomique montre que son application est à la fois quantitative (via le nombre de séquences, d'OTUs) et descriptive.

Tableau 6. Études de l'écologie microbienne de divers produits alimentaires fermentés par approche métagénomique.

Produits fermentés	Méthode	Régions hypervariables utilisées	Références
Liquueur moutai	Séquençage Illumina	V6	Wang <i>et al.</i> , 2015
Bière	Séquençage Illumina	V4 / ITS1	Bokulich <i>et al.</i> , 2015
Cheonggukjang	Pyroséquençage 454 Roche	V1-V2	Nam <i>et al.</i> , 2012b
Fève de cacao fermentée	Pyroséquençage 454 Roche	16S	Illeghems <i>et al.</i> , 2012
Fromage	Illumina MiSeq	V4	Bokulich <i>et al.</i> , 2013
Fromage	Pyroséquençage 454 Roche	V4	Quigley <i>et al.</i> , 2012
Kefir	Pyroséquençage 454 Roche	V4	Dobson <i>et al.</i> , 2011
Kefir	Pyroséquençage 454 Roche	V1-V2	Jung <i>et al.</i> , 2011
Kimchi	Pyroséquençage 454 Roche	16S	Jung <i>et al.</i> , 2011
Kimchi	Pyroséquençage 454 Roche	V1-V3	Park <i>et al.</i> , 2012
Kombucha	Séquençage Illumina	V4-V5/ ITS1	Marsh <i>et al.</i> , 2014
Lait fermenté	Pyroséquençage 454 Roche	V1-V3	Liu <i>et al.</i> , 2015
Narezushi	Pyroséquençage 454 Roche	V1-V2	Kiyohara <i>et al.</i> , 2012
Pomme	Pyroséquençage 454 Roche	V2	Ottesen <i>et al.</i> , 2009
Pomme	Pyroséquençage 454 Roche	V1-V3	Glenn <i>et al.</i> , 2015
Vin	Séquençage Illumina	V5 -V6	Marzano <i>et al.</i> , 2016
Vin	Pyroséquençage 454 Roche	16S and 18S	Portillo <i>et al.</i> , 2016
Vin	Séquençage Illumina	V4-V5	Bokulich <i>et al.</i> , 2012
Vin	Illumina MiSeq	V4	Bokulich <i>et al.</i> , 2013
Vin	Illumina MiSeq	V4	Zarraonaindia <i>et al.</i> , 2015
Vin	Pyroséquençage 454 Roche	V1-V3	Piao <i>et al.</i> , 2015
Vin	Pyroséquençage 454 Roche	V6 / ITS2	Pinto, 2015
Vin	Illumina MiSeq	V3-V4	Milanović <i>et al.</i> , 2018
Vin	Pyroséquençage 454 Roche	V3/ V4 / V5 et V6	Campanaro <i>et al.</i> , 2014
Vin / Vinaigre	Illumina MiSeq	V3-V4	Trček <i>et al.</i> , 2016
Vin de riz	Illumina MiSeq	V3-V4	Cai <i>et al.</i> , 2018
Vinaigre Liangzhou	Pyroséquençage 454 Roche	V4	Yun <i>et al.</i> , 2019
Vinaigre Tianjin duliu	Séquençage Illumina	V3	Nie <i>et al.</i> , 2013

Les connaissances sur la dynamique des communautés microbiennes lors des processus de fermentation ont été largement décrites (Kergourlay *et al.*, 2015; Smid and Hugenholtz, 2010). Le secteur laitier est de loin l'environnement le plus exploré par l'approche

métagénomique. Cette approche a notamment été utilisée pour suivre la distribution spatiale des communautés microbiennes dans les différentes parties du fromage, mais aussi des dynamiques microbiennes lors de la fermentation du lait (De Pasquale *et al.*, 2016 ; O'Sullivan *et al.*, 2015). Elle demeure l'une des dernières approches utilisées pour définir la dynamique de fermentation microbienne des boissons alcoolisées (Dobson *et al.*, 2011 ; Nalbantoglu *et al.*, 2014 ; Nam *et al.*, 2012a ; Park *et al.*, 2012). Les principaux objectifs étaient une meilleure caractérisation de la flore microbienne et de prévoir son implication fonctionnelle dans le processus de fermentation. Cette compréhension des interactions entre les communautés de microorganismes permet de mieux contrôler la contamination microbienne dans les boissons fermentées (Bokulich *et al.*, 2015). Dans de nombreux cas, l'étude de la structure/dynamique de la communauté microbienne par la métagénomique a pu être mise en lien avec les paramètres physicochimiques, comme les sources carbonées, le pH, l'acidité, l'oxygène ou encore la température (Bessmeltseva *et al.*, 2014 ; Chakravorty *et al.*, 2016 ; De Filippis *et al.*, 2016 ; Ercolini *et al.*, 2018a ; Laureys *et al.*, 2018 ; Minervini *et al.*, 2015). Une analyse du processus de fermentation du kéfir par Laureys *et al.* (2014) s'est basée sur la diversité, la dynamique des communautés microbiennes mais aussi la consommation et la production des métabolites. Grâce à cette approche, d'autres études ont montré le lien entre le microbiote et la matière première ou encore la qualité du produit fini (Bokulich *et al.*, 2013 ; De Pasquale *et al.*, 2014, 2016 ; O'Sullivan *et al.*, 2015). De plus, les produits fermentés abritent des micro-organismes bénéfiques ou responsables de défauts pouvant se développer et être identifiés par cette approche lors du processus de fermentation (Ercolini *et al.*, 2018b ; Gorni *et al.*, 2015). Un autre avantage de la métagénomique est son utilisation comme outil de surveillance des populations microbiennes. En effet, les gènes spécifiques d'une espèce bactérienne ou d'une voie métabolique particulière peuvent être sélectionnés pour discriminer et suivre des populations particulières au sein de l'écosystème alimentaire (De Filippis *et al.*, 2014 ; Ercolini *et al.*, 2013 ; Parente *et al.*, 2016, 2019). Bien que cette approche puisse rendre compte de la diversité microbienne globale au sein des produits fermentés, la métagénomique présente certaines limites. Les premières se basent sur la qualité d'extraction d'ADN, la conservation des échantillons et la matrice analysée (Desneux *et al.*, 2014 ; Kergourlay *et al.*, 2015 ; Knauth *et al.*, 2013 ; Lazarevic *et al.*, 2013 ; Psifidi *et al.*, 2015 ; Rubin *et al.*, 2013 ; Starke *et al.*, 2014). De plus, le ciblage des différentes régions de l'ADN ribosomique 16S peut donner des résultats différents en terme de proportion et de diversité bactérienne (Cocolin *et al.*, 2013b). Enfin, en raison du nombre de copies et de la grande conservation des séquences de *rrs*, leur classification ne peut pas être robuste à une échelle plus fine que celle du genre (Pei *et al.*, 2010). Diverses

régions du gène codant l'ARNr 16S ont été utilisées chez les bactéries. Au total, neuf régions hypervariables ont été décrites parmi les bactéries V1 à V9, complètement amplifiées par les amorces 27F et 1492R. L'approche de métagénomique implique l'utilisation de banque de données et de logiciels/analyses bio-informatiques qui donneront des résultats de diversité et d'abondance différentes (Lazarevic *et al.*, 2013; Morgan *et al.*, 2017; Petrosino *et al.*, 2009). De nos jours, la base de données de séquences 16S contient presque toutes les espèces connues de bactéries et d'archées, mais des efforts restent à faire pour celles des séquences fongiques. Ainsi, le nombre d'études relatives à la description des communautés fongiques par l'approche métagénomique est beaucoup moins important que celui relatif aux communautés bactériennes.

Enfin, en raison du biais lié au séquençage et de la faible capacité à identifier au-delà du niveau du genre, cette technique ne permet pas de spécifier des sous-populations potentiellement responsables de la production d'arômes ou d'autres modifications organoleptiques du produit.

Ces différentes techniques ont permis d'étudier plus finement l'écologie microbienne associée au processus de fermentation et le rôle de la diversité dans la maîtrise du produit.

3. Le rôle de la diversité dans la maîtrise du produit

II.3.1. Les dynamiques microbiennes

Les écosystèmes microbiens fermentaires sont complexes en diversité et interactions : il existe des interactions levures-levures, des interactions bactéries-levures, des interactions bactéries-bactéries et des interactions champignons filamenteux-levures (Nissen *et al.*, 2003). Ces différentes interactions peuvent être positives (mutualisme, commensalisme), neutres (neutralisme) ou négatives (amensalisme et compétition). Une grande partie des produits fermentés ont suscité l'intérêt des scientifiques sur l'impact des communautés microbiennes sur la qualité du kimchi, du fromage, du salami, du kefir, du cheonggukjang, du vin ou des olives fermentées (Cocolin *et al.*, 2013b ; Dobson *et al.*, 2011 ; Ercolini *et al.*, 2012 ; He *et al.*, 2017 ; Jung *et al.*, 2011 ; Nam *et al.*, 2012b ; Park *et al.*, 2012 ; Portillo *et al.*, 2016 ; Rebecchi *et al.*, 2015 ; Yun *et al.*, 2019). Dans le vin, la bière ou encore le cidre, les interactions levures-champignons filamenteux inhibent le développement des champignons lors du processus de fermentation par les levures produisant de nombreux composés inhibiteurs (Bleve *et al.*, 2006 ; Cubaiu *et al.*, 2012 ; Fleet *et al.*, 2003 ; Kapetanakou *et al.*, 2012 ; Ponsone *et al.*, 2016). Ces mêmes produits fermentés impliquent des consortia de levures complexes naturels ou ajoutés

se développant simultanément lors de la fermentation et présentant de nombreuses interactions (Bagheri *et al.*, 2020). Dans les boissons alcoolisées, l'éthanol produit lors de la fermentation est le principal composé diminuant et sélectionnant la diversité bactérienne et levurienne (Beltran *et al.*, 2002 ; Combina *et al.*, 2005 ; G-Alegria *et al.*, 2004 ; Jolly *et al.*, 2014). La production d'éthanol dans le cidre et le vin permet de limiter le développement bactérien au profit d'autres espèces bactériennes plus tolérantes comme *Oenococcus* et *Lactobacillus*. L'interaction entre les levures et les bactéries lactiques module fortement le progrès de la conversion malolactique et donc la stabilité et la qualité du vin (Alexandre *et al.*, 2004). D'autres composés formés pendant la fermentation peuvent également affecter le développement microbien. Les travaux de Fleet *et al.* (2003) et de Giannattasio *et al.* (2005) ont montré le rôle antagoniste de la production d'acide acétique ou encore d'acétaldéhyde par *Saccharomyces cerevisiae*. Une revue de Jespersen *et al.* (1996) a fait l'état de l'art des aspects positifs et négatifs des levures dans les produits laitiers. Teoh *et al.* (2004) ont également détaillé la communauté levurienne et son implication physico-chimique et aromatique dans le kombucha, avec des espèces comme *Brettanomyces bruxellensis*, *Candida stellata*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Torulaspora delbrueckii* et *Zygosaccharomyces bailii*.

Les communautés bactériennes interagissent elles aussi entre elles via la compétition nutritionnelle ou par inhibition. Dans les produits fermentés, les bactéries lactiques représentent une communauté microbienne importante (Lindgren *et al.*, 1990). Les genres et espèces bactériens ainsi que leurs propriétés diffèrent selon les produits fermentés. Le rôle des LAB dans le processus de fermentation est double : d'une part elles participent grandement à la consommation des sucres présents dans la matrice et d'autre part elles entraînent une acidification par la conversion des sucres en acide acétique, lactique et éthanol. Ces deux facteurs entraînent des changements physico-chimiques importants sur la matrice alimentaire, sélectionnant ainsi les bactéries les plus adaptées à des environnements stressants et participant à la stabilité et à la qualité du produit. Ces espèces sont capables de survivre à un pH faible (pH 3,2) et une teneur élevée en alcool dans le vin (13% v/v). Dans le kimchi, produit lacto-fermenté coréen, des souches de *Lactobacillus sakei* et *Lactobacillus plantarum* ayant une activité anti-microbienne ont été isolées (Lee *et al.*, 2011).

Ainsi, les principaux agents participant à la qualité du produit sont connus mais les différentes interactions microbiennes restent complexes et difficiles à appréhender pour proposer de nouvelles stratégies d'amélioration organoleptiques. De plus, ces activités

dépendent fortement de la qualité du produit et des paramètres physico-chimiques associés susceptibles de limiter le développement des microorganismes.

II.3.2. Les particularités de l'écosystème cidricole

A ce jour, les études scientifiques ont majoritairement porté sur l'impact des paramètres physico-chimiques sur la qualité et la maîtrise de la fermentation du cidre. Les nombreux travaux portant sur le vin, les similitudes de processus de fermentation, de diversité microbienne et les caractéristiques "nutritionnelles" entre le raisin et la pomme nous amènent naturellement à comparer le vin au cidre. Ainsi, les moûts, leurs traitements, le mécanisme de fermentation et les conditions influant sur le processus sont à étudier. Les modes de conduite de fermentation sont relativement différents. En effet, certains vins subissent une fermentation totale et rapide (une semaine), alors que dans le cidre il y a une réglementation visant à laisser des sucres résiduels pour le cidre de consommation (mais pas pour le cidre de distillation) et la fermentation est plus longue (3 semaines). De plus, les températures de fermentation sont plus élevées pour les vins (15°C pour le vin blanc, 25°C pour le vin rouge) que pour les cidres (10°C - 15°C). Certains composés naturellement produits en début de fermentation (acétaldéhyde, diacétyl, acétoïne) sont moins produits en températures basses et avec une fermentation lente.

Les grandes différences entre le vin et le cidre résident dans la composition du moût. En terme quantitatif, la teneur initiale en azote dans les moûts de raisin varie entre 100 à 1100 mg/L contre 40 à 150 mg/L d'azote dans le moût de pomme. Un pourcentage plus important en NH_3 par rapport à l'azote total est retrouvé dans le raisin (3 à 10 % raisin contre 2 % pour la pomme). De plus, les moûts de raisin possèdent un plus haut taux (jusqu'à 1000 mg/L) et une plus large gamme d'acides aminés que les moûts de pomme. Le taux de sucre d'un moût de pomme est de l'ordre de 120 g/L, tandis qu'un moût de raisin en possède 200 à 240 g/L. Cela a pour conséquence une production plus importante d'alcool et de gaz carbonique dans le vin. En terme d'arômes, des composés volatils dans les moûts ont été répertoriés dans le vin alors que peu sont connus dans le cidre.

Parmi les études portant sur les paramètres physico-chimiques qui influent la fermentation du cidre, peu se sont focalisées sur les indicateurs microbiologiques, leurs dynamiques et leur physiologie, la plupart se limitant à une étude des flores d'altération et technologique. Contrairement au cidre, beaucoup d'études ont apporté des connaissances sur la composition microbienne du vin tant en microbiologie classique que moléculaire lors du processus de fermentation, en allant même jusqu'à proposer de nouvelles approches

biotechnologiques et des solutions techniques en vue d'une amélioration de la qualité du vin (Perez-Gonzalez *et al.*, 1993). D'autres approches se basent sur l'influence de l'environnement (matières premières, cuves, géographie, climat, cultivar, pratiques des producteurs) sur la diversité microbienne et les différences de processus de fermentation (Bokulich *et al.*, 2015 ; David *et al.*, 2014 ; De Filippis *et al.*, 2017 ; Gilbert *et al.*, 2013 ; Pinto *et al.*, 2015 ; Setati *et al.*, 2015 ; Zarraonaindia *et al.*, 2015). Ces connaissances en écologie microbienne sur la fermentation du vin ont permis d'apporter des solutions techniques applicables en vue d'une amélioration de la qualité organoleptique.

Pour le cidre, des études ont été menées pour déterminer la diversité microbienne tout au long de la fabrication du cidre, de la surface de la pomme au système de pressage (Valles *et al.*, 2007 ; Yashiro *et al.*, 2011). Les principales études portent sur les micro-organismes responsables de l'altération du cidre, comme *Zymomonas mobilis*, *Lactobacillus collinoides* ou encore *Brettanomyces anomala* (Coton *et al.*, 2005, 2006b ; Guichard *et al.*, 2019 ; Sauvageot *et al.*, 2000). Ainsi, analyser les dynamiques microbiennes au sein du processus de fermentation et les corrélérer aux paramètres physico-chimiques et aromatiques permettrait de donner une image globale des interactions microbiennes positives et négatives sur la qualité du cidre.

II.3.3. Les leviers technologiques dans la maîtrise de la fermentation

Les sucres sont utilisés par les levures et les bactéries, entraînant la production d'une large gamme de composés (éthanol, acides etc.) et modifiant la composition physico-chimique et microbienne du produit. Les glucides initialement présents dans la matière première des produits fermentés sont divers : parmi eux nous pouvons noter les hexoses, l'amidon ou encore l'inuline. Lors de la fermentation, une concentration trop élevée en sucres peut exercer une inhibition du processus de fermentation. A l'inverse, un milieu pauvre en sucres entraîne une sélection microbienne des micro-organismes capables de dégrader d'autres sources carbonées. Dans le cidre et le vin, les bactéries lactiques vont convertir, même en présence de sucres résiduels, l'acide malique en acide lactique via la TML. La problématique soulevée dans le cidre est en lien avec le développement de bactéries capables de dégrader le glycérol comme unique source de carbone, puisqu'un cidre à une masse volumique de 1000 g/cm³ ne contient plus de sucre. Ainsi, la consommation de glucose et de fructose (sucre principal restant en fin de fermentation) est à analyser de près pour évaluer les risques de consommation d'autres sources carbonées défavorables à la qualité du cidre.

L'oxygène joue un rôle important sur la modulation des processus fermentaires et sur le maintien de la viabilité des levures en fin de fermentation (Sablayrolles *et al.*, 1996). Dans le vin comme dans le cidre, un minimum de 10 mg/L d'oxygène est nécessaire au bon déroulement de la fermentation (Sablayrolles *et al.*, 1996). Cet apport exogène permet à la fois de jouer sur la viabilité des levures mais aussi sur leur métabolisme aromatique. Une étude de Blateyron et Sablayrolles (2001) a montré que l'apport d'oxygène joue sur le métabolisme levurien et sur les concentrations finales d'alcools supérieurs et d'esters. A l'inverse, un apport trop important en oxygène (> 50 mg/L) entraînera une oxydation du vin et du cidre et aura un impact négatif sur la qualité aromatique du produit. Une étude de Morales *et al.* (2015) a montré l'influence de différents taux d'oxygénation sur la physiologie des levures et la teneur finale en éthanol. Plus le taux d'oxygène est élevé moins les taux d'éthanol sont importants. L'oxygène influence la diversité et/ou le métabolisme des espèces microbiennes pendant la fermentation (Laureys *et al.*, 2018 ; Morales *et al.*, 2015). Dans le vin ou encore le cidre, les levures naturellement présentes en début de fermentation (dites non-*Saccharomyces*) comme *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia* et *Issatchenkia* ont un métabolisme oxydatif important et l'appauvrissement graduel du milieu en oxygène entraîne un remplacement progressif de ces levures par le genre *Saccharomyces* entraînant un déclin de la biodiversité levurienne. A des niveaux bas d'oxygène, le remplacement des souches de *Metschnikowia pulcherrima* par *Saccharomyces cerevisiae* dans le vin est plus rapide. Lors de la fermentation du kefir, une concentration d'oxygène relativement élevée entraîne une prolifération de bactéries acétiques, amenant à des concentrations élevées d'acide acétique et à une diminution de l'abondance relative de bactéries comme *Bifidobacterium aquikefiri* (Laureys *et al.*, 2018).

La température influence grandement la vitesse de fermentation, ce qui aura pour conséquence de modifier les caractéristiques physico-chimiques et aromatiques du produit (Mouret *et al.*, 2014 ; Peng *et al.*, 2015). Dans l'exemple du vin, une température élevée entraînera une perte en composés volatils (Morakul *et al.*, 2011 ; Mouret *et al.*, 2014). Les travaux de Masneuf-Pomarède *et al.* (2006) ont également montré l'influence de la température de fermentation sur la quantité de thiols volatils, les teneurs étant plus élevées à 20 °C qu'à 13 °C. Les températures de fermentation des cidres de distillation ne sont actuellement pas contrôlées et les fermentations se déroulent dans des cuves souvent en extérieur. Contrairement au vin où la température de fermentation est relativement élevée (environ 25°C), la fermentation du cidre se fait donc à basse température (10 à 15°C), ralentissant considérablement le processus. Ces basses températures permettent la formation d'arômes d'intérêt tels que les

esters via des levures cryotolérantes comme *Saccharomyces uvarum* et certaines espèces de *S. cerevisiae* (Gamero *et al.*, 2013 ; Guerzoni *et al.*, 1999 ; Saerens *et al.*, 2010 ; Su *et al.*, 2019 ; Torija *et al.*, 2003). La fermentation lente permet également de contrôler le développement des flores bactériennes d'intérêt et des flores d'altération. Pour la population levurienne, les basses températures lors de la fermentation du cidre assurent une meilleure viabilité des levures et permet de moduler leurs besoins en azote et donc les caractéristiques aromatiques (Beltran *et al.*, 2007).

Dans la plupart des produits fermentés, le pH joue un rôle central dans la conservation du produit. Lors de la fermentation, le métabolisme des composés azotés (acides aminés ou azote ammoniacal) entraîne une augmentation de pH, directement liée à la production d'alcool. Le principal effet du pH dans les produits fermentés est la biopréservation du produit et le contrôle de la flore d'altération. Le pH affecte le taux de croissance ainsi que le métabolisme des micro-organismes et entraîne des variations du nombre d'espèces dans une population microbienne hétérogène (Temudo *et al.*, 2008). Dans le vin ou encore le cidre, la conversion de l'acide L-malique en acide D-L-lactique lors de la transformation malo-lactique entraîne aussi une augmentation de pH, variant d'une valeur de pH de 3,3 à 4,3. Cependant, des études sur le vin ont montré que la TML influençait peu l'évolution du pH en comparaison de l'assimilation des substrats azotés (Salmon *et al.*, 2008). Le pH module grandement la communauté bactérienne et les métabolismes associés lors du processus de fermentation (Ye *et al.*, 2007). Laureys *et al.* (2014) ont montré que la majeure partie des métabolites (glycérol, acide acétique et le mannitol) produits lors de la fermentation du kefir est concomitante avec la dynamique du pH.

III. *Lactobacillus collinoides* et la piquêre acroléique

1. La piquêre acroléique

Au cours de la transformation du moût de pomme en cidre, de nombreux composés libérés peuvent servir de substrats pour différentes activités microbiennes. Le glycérol est un des produits du métabolisme des levures lors de la fermentation alcoolique et sa teneur dans les cidres de distillation atteint environ 5 g/L. Ce composé peut être dégradé en fin de fermentation alcoolique par certaines LAB (Butzke *et al.*, 1990 ; Drilleau *et al.*, 1991). Cette dégradation du glycérol entraîne des désordres organoleptiques en développant un goût d'amertume connu sous le nom de piquêre acroléique.

La production d'acroléine a été initialement associée à la présence de *Clostridium perfringens* aussi bien dans le vin que dans le cidre (Voisinet *et al.*, 1910 ; Warcollier *et al.*, 1932 ; Warcollier *et al.*, 1934). Cette production se retrouve également dans les eaux-de-vie produites à partir de céréales (Serjak *et al.*, 1953 ; Butzke *et al.*, 1990). Outre *C. perfringens*, d'autres espèces bactériennes responsables de la production d'acroléine ont pu être mises en évidence. Parmi elles nous pouvons citer *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. terrigena* et *Citrobacter freundii*, toutefois, le genre *Lactobacillus* reste le genre majoritairement impliqué dans la production d'acroléine (Forage *et al.*, 1982 ; Serjak *et al.*, 1953 ; Seyfried *et al.*, 1996).

Dans le cidre, la production d'acroléine résulte de la transformation chimique du 3-hydroxypropionaldéhyde (3-HPA), précurseur de l'acroléine, est directement issu du métabolisme du glycérol. En conditions de pH acide et/ou de température élevée (ex : lors de la distillation des cidres pour les eaux-de-vie), le 3-HPA est transformé en acroléine par déshydratation (Figure 2).

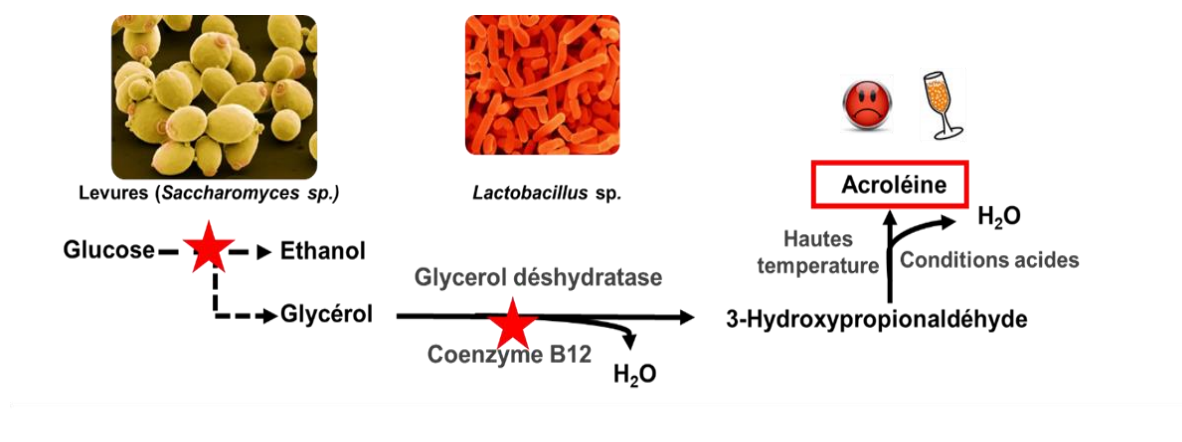


Figure 2. Voie métabolique schématique de production de l'acroléine à partir du glycérol chez *Lactobacillus sp.*.

2. *Lactobacillus collinoides*

III.2.1. Caractéristiques générales

L. collinoides, une bactérie initialement isolée d'un cidre anglais et décrite pour la première fois par Carr *et al.* (1972), a été retrouvée dans de nombreux écosystèmes comme la nourriture, l'alimentation, le sol, plantes, animaux vertébrés et invertébrés. Sa taille varie entre 0,6 et 0,8 µm de largeur et 3 à 5 µm de longueur. Sur milieu gélosé, elle se présente sous la forme d'une petite colline, de couleur crème, à bords étoilés (Carr *et al.*, 1972). Elle possède un pourcentage moyen en guanine-cytosine G+C % de 45 %. Certaines souches de cette espèce ont été décrites comme responsables de la maladie de la graisse, du fait de leur capacité à produire des exopolysaccharides dans le cidre (Carr *et al.*, 1957). Bien que *L. collinoides* ait été isolé pour la première fois d'un cidre altéré, ce n'est qu'à partir des années 2000 que plusieurs études ont démontré le lien entre la piqûre acroléique et la présence de *L. collinoides* via la dégradation du glycérol et la production de 3-HPA (Claisse *et al.*, 2000, 2001 ; Sauvageot *et al.*, 2000).

III.2.2. Physiologie

L. collinoides peut se multiplier à des températures allant de 15 à 40°C mais sa température optimale de croissance est de 30°C. Cette bactérie possède une paroi peptidoglycanique contenant les acides aminés lysine et D-aspartate. Ce sont des bactéries hétérofermentaires stricts qui fermentent les hexoses en acide lactique, acide acétique et/ou éthanol accompagné d'une production de CO₂. Son métabolisme hétérolactique conduit à la synthèse des isomères D et L de l'acide lactique. Comme tout organisme vivant, *L. collinoides* est particulièrement adaptée à son environnement comme l'a montré l'étude de Laplace *et al.* (1999) en évaluant la réponse de *L. collinoides* aux différents stress physico-chimiques imposés par l'environnement cidricole (concentration en éthanol et tolérance à l'acidité). D'autres travaux effectués sur cette bactérie ont révélé sa participation à la transformation des principaux acides présents dans le cidre. D'une part, *L. collinoides* est capable de dégrader l'acide malique en acide lactique (transformation malo-lactique) mais aussi de transformer l'acide quinique en acide dihydroshikimique. Des études ont montré toute l'étendue de sa capacité à utiliser d'autres acides organiques, comme les acides chlorogénique, caféique (Whiting *et al.*, 1957), shikimique (Whiting *et al.*, 1969), cinnamique et p-coumarique (Whiting *et al.*, 1959). Les premiers travaux portant sur les caractéristiques biochimiques de cette bactérie ont été effectués par Carr *et al.* (1972) (Tableau 7).

Tableau 7. Caractères biochimiques de *L. collinoides* (Carr *et al.*, 1972).

Substrats	Fermentation
Acide citrique	+
Acide Malique	+
Acide Quinique	+
Amygdaline	-
Arabinose	+
Cellobiose	-
Esculine	+
Fructose	+
Galactose	+
Gluconate	+
Glucose	+
Glycérol	-
Lactose	V
Maltose	+
Mannitol	-
Mannose	-
Mélézitose	-
Mélibiose	+
Raffinose	-
Rhamnose	-
Ribose	+
Salicine	V
Sorbitol	-
Sucrose	-
Tréhalose	-
Xylose	+
a-Méthyl glucoside	-

+ : plus de 90 % de réactions positives

- : moins de 10 % de réactions positives

V : plus de 10 % et moins de 90 % de réactions positives

III.2.3. Génomique

Le groupe des bactéries lactiques réunit à ce jour 16 genres : *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella*. Leur classification taxonomique est en constante évolution. Traditionnellement, elle se basait sur leurs propriétés phénotypiques, physiologiques et biochimiques mais se fait désormais via l'analyse comparative des séquences d'ARN 16S

ribosomiques. Les récentes analyses phylogénétiques sur 29 protéines ribosomiques et 12 gènes domestiques ont permis d'affiner et de reclassifier les différents phylogroupes au sein du genre *Lactobacillus*. Actuellement, il comprend à lui seul 232 espèces et le nombre d'espèces décrites est en continuelle augmentation (Puertas *et al.*, 2014 ; Salvetti *et al.*, 2018). Depuis 2020, la taxonomie du genre *Lactobacillus* a été remaniée et *Lactobacillus collinoides* est désormais nommé *Secundilactobacillus collinoides*. A ce jour, peu de génomes de *L. collinoides* ont été séquencés afin d'analyser plus finement les différences intra-spécifiques (Puertas *et al.*, 2016 ; Sun *et al.*, 2015). Deux séquençages préliminaires de deux souches sont à disposition : *L. collinoides* DSM20515^T et *L. collinoides* CUPV237. L'exploration génomique et phénotypique du potentiel de ces bactéries s'est strictement limitée à la capacité à produire des exopolysaccharides, la riboflavine et sur leur capacité à dégrader le glycérol (Puertas *et al.*, 2016).

3. Le métabolisme du glycérol et la piqûre acroléique

III.3.1. Les différentes voies métaboliques

Plusieurs genres bactériens ont la capacité d'utiliser le glycérol comme source de carbone via la glycolyse. De nombreuses voies permettent l'entrée et l'utilisation du glycérol (Figure 3). La première est le système *glp*, où le glycérol est phosphorylé par l'enzyme glycérol kinase en glycérol 3-phosphate (G3P). Le G3P est ensuite transformé en dihydroxyacétone phosphate DHAP, le produit final de la dégradation du glycérol. La deuxième voie est le système *dha*, où le glycérol est directement converti en dihydroxyacétone DHA via l'enzyme glycérol déshydrogénase puis est phosphorylé en DHAP par la DHA kinase. Enfin, une troisième voie de dégradation du glycérol a été mise en évidence chez de nombreux micro-organismes. Cette voie consiste en la conversion du glycérol en 3-hydroxypropionaldéhyde (3-HPA) sous l'action d'une glycérol déshydratase coenzyme B12-dépendante dans des conditions particulières (de Fouchécour *et al.*, 2018 ; Garai-Ibabe *et al.*, 2008 ; Sauvageot *et al.*, 2000). Le 3-HPA ainsi produit s'accumule et est excrété dans le milieu extérieur (Axelsson *et al.*, 1989). L'aldéhyde est ensuite réduit en 1,3-propanediol par la 1,3-propanediol déshydrogénase. En condition de températures élevées ou d'acidité, le 3-HPA est spontanément déshydraté en acroléine. Ce système de conversion du glycérol a été retrouvé chez *K. pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium butyricum*, *Enterobacter agglomerans* et *L. reuteri* (Abbad-Andaloussi *et al.*, 1996 ; Barbirato *et al.*, 1996 ; Biebl; Forage *et al.*, 1982 ; Luers *et al.*, 2006 ; Talarico *et al.*, 1990 ; Toraya *et al.*, 1980). La

dégradation du glycérol chez le genre *Lactobacillus* a été mise en évidence pour la première fois par Sobolov *et al.* en 1960. La souche utilisée, *Lactobacillus* sp 208-A est capable de dégrader le glycérol en 1,3-propanediol et en acide 3-hydroxypropionique en absence de glucose. En présence de glucose, seul le 1,3-propanediol est produit à partir du glycérol. Le métabolisme du glycérol chez les lactobacilles diffère selon les espèces en fonction des hexoses présents (glucose, fructose etc...) et son taux de conversion en 3-HPA est influencé par un ratio sucre/glycérol dans le milieu (Sauvageot *et al.*, 2000). Cette troisième voie implique majoritairement l'enzyme glycérol déshydratase (nommée parfois diol deshydratase), dont l'environnement génétique opéron *pdu* a été étudié.

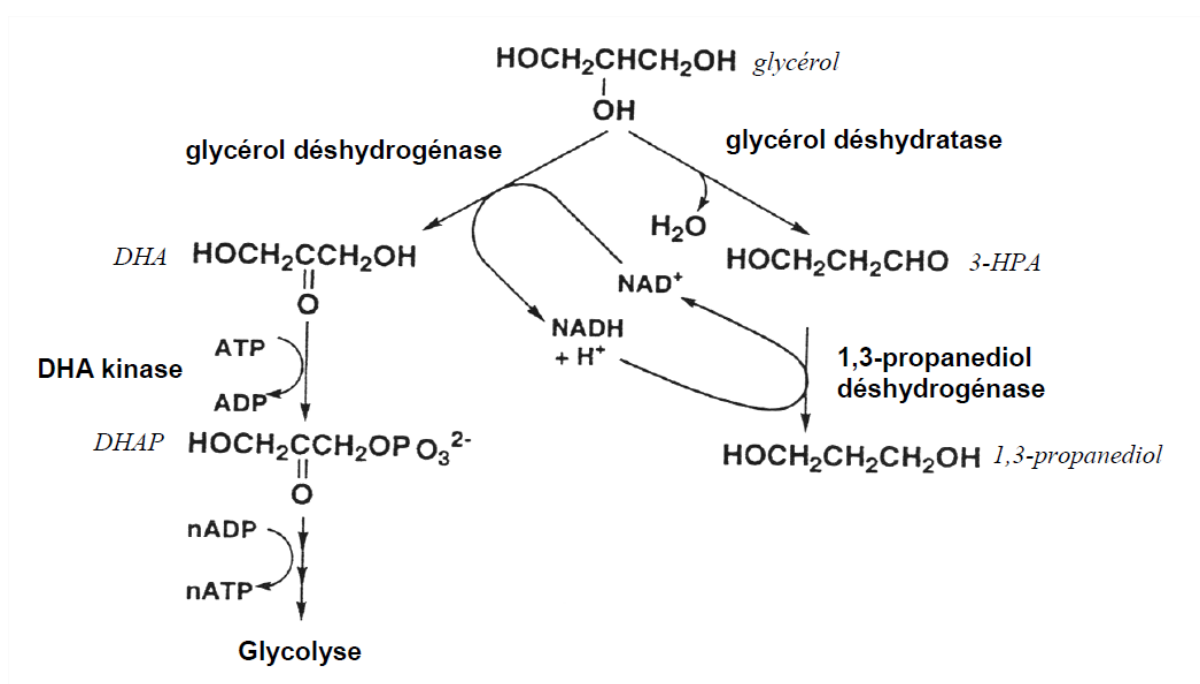


Figure 3. Voies métaboliques de dégradation du glycérol selon Toraya *et al.* (1999) et Sauvageot *et al.* (2000).

III.3.2. Structure génétique de l'opéron *pdu*

La présence de l'enzyme glycérol déshydratase dépendante du coenzyme B12 chez le genre *Lactobacillus* a été grandement rapportée (Smiley *et al.*, 1962 ; Schütz *et al.*, 1984 ; Talarico *et al.*, 1988). Cette enzyme d'une masse moléculaire d'environ 200 kDa, est constituée de quatre sous-unités (Talarico *et al.*, 1990). Génétiquement, les premières séquences codant pour la diol déshydratase ont été caractérisées chez *K. oxytoca* (Tobimatsu *et al.*, 1995), *S. enterica* LT2 (Bobik *et al.*, 1997) et *K. pneumoniae* (Tobimatsu *et al.*, 1998). Dans les années

2000, les travaux de Sauvageot *et al.* (2000) et Claisse *et al.* (2001) ont porté sur l'identification et la caractérisation de l'intégralité de l'opéron codant la diol déshydratase chez *L. collinoides*. Le nombre de gènes et leur organisation dans cet opéron, présentés sur la Figure 4 varient selon le genre bactérien (21 gènes chez *S. enterica*, 8 chez *Lactobacilles*). Chez *L. collinoides*, le premier gène en amont est le gène *pocR*, un régulateur transcriptionnel de l'opéron *pdu*. Les gènes *pduA* et *pduB* codent pour des protéines impliquées dans la formation de carboxysomes micropartiment bactérien. Les gènes *pduCDE* codent respectivement pour la large, moyenne et petite sous-unité de la diol déshydratase, responsables de l'activité enzymatique de la dégradation du glycérol. Le gène *pduG* code pour la sous-unité alpha réactivase de la diol déshydratase. Le dernier gène est le gène *pduH*, pour lequel aucune homologie n'a été retrouvée et dont la fonction demeure inconnue. Cet opéron a été retrouvé avec une forte similarité chez *L. diolivorans*, *L. brevis* et *L. reuteri* (Lindlbauer *et al.*, 2017).

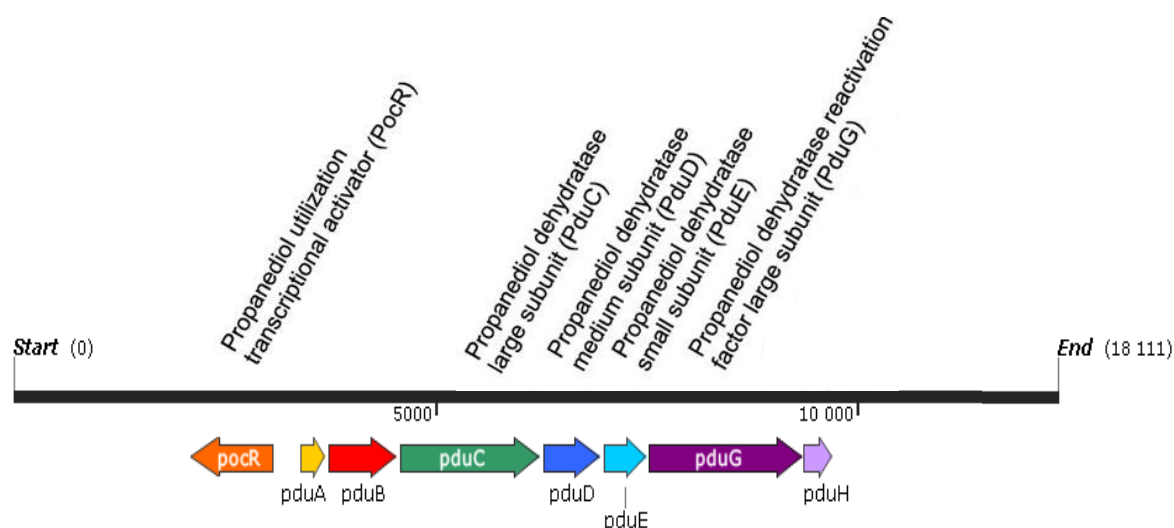


Figure 4. Organisation génétique de l'opéron *pdu* chez *Lactobacillus collinoides*.

III.3.3. Molécules issues du métabolisme du glycérol

III.3.3.1. Le 3-hydroxypropionaldéhyde : précurseur de l'acroléine

Le 3-hydroxypropionaldéhyde (3-HPA), ou réutérine, est une molécule produite par quelques bactéries lactiques appartenant au genre *Lactobacillus* (Schütz *et al.*, 1984 ; Claisse *et al.*, 2000 ; Gómez-Torres *et al.*, 2014). La purification et la caractérisation biochimique ont été révélées par les travaux de Talarico *et al.* (1988). Le 3-HPA est une molécule à faible poids

moléculaire (74,08 g/mol), soluble dans l'eau, thermostable, active dans une large gamme de pH 2-8 qui possède des propriétés antimicrobiennes (El-Ziney *et al.*, 1998). Elle a un large spectre d'action agissant sur des bactéries à Gram positif appartenant aux genres *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Clostridium* et Gram négatif comme *Escherichia*, *Salmonella*, *Proteus* et *Pseudomonas* (Arqués *et al.*, 2004 ; Axelsson *et al.*, 2009 ; Bian *et al.*, 2011 ; Cleusix *et al.*, 2007 ; El-Ziney *et al.* 1998 ; Rasch *et al.*, 2002 ; Spinler *et al.*, 2008). Les propriétés antimicrobiennes de la réutérine s'étendent aux organismes fongiques dont *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Pichia sp.*, *Kluyveromyces sp.*, *Aspergillus flavus* et *Penicillium sp.*. Le 3-HPA présente en outre des propriétés antivirales et elle inhibe même le développement de certains protozoaires comme *Trypanosoma cruzi* (Axelsson *et al.*, 1989 ; Tanaka *et al.*, 2009). Sa capacité d'inhibition réside en la diminution de l'activité de la sous-unité de la ribonucléotide réductase, enzyme impliquée dans la synthèse des nucléotides (Schaefer *et al.*, 2010 ; Talarico *et al.*, 1989). Les propriétés antimicrobiennes du 3-HPA ont été exploitées dans l'industrie agro-alimentaire. Des études préliminaires de l'utilisation de la réutérine sur le contrôle du développement des bactéries *Listeria monocytogenes* et *Escherichia coli* O157:H7 ont été effectuées sur de la viande et des produits laitiers (El-Ziney *et al.*, 1998). Asare *et al.* (2020) ont montré l'effet bactéricide de la réutérine contre des *Campylobacter* isolées d'échantillons de viande de poulet et de selles humaines. Des tests de production *in situ* de réutérine à partir de glycérol ont montré un intérêt particulier de *Lactobacillus reuteri* dans le contrôle du développement de germes pathogènes pour la conservation des produits laitiers. De la même façon, l'utilisation de *Lactobacillus coryniformis* et de glycérol dans l'ensilage de la paille du riz a montré une inhibition de la fermentation butyrique et un retard de la croissance de certains champignons phytopathogènes (Tanaka *et al.*, 2009). D'autres lactobacilles comme *L. delbrueckii*, *L. acidophilus* et *L. plantarum* peuvent utiliser efficacement le glycérol dérivé du biodiesel comme source de carbone pour la production de biomasse et d'énergie, mais la voie réductrice impliquée dans la synthèse de réutérine n'est pas exprimée chez ces bactéries (Rivaldi *et al.*, 2013). L'inhibition du développement d'un large panel de micro-organismes fait de la réutérine une molécule prometteuse dans la bioconservation, la décontamination, ou la stabilisation d'un produit ou de sa matière première.

III.3.3.2. L'acroléine

L'acroléine est une substance chimique connue sous divers noms : 2-propénal, aldéhyde acrylique ou encore acrylaldéhyde. Cet aldéhyde, de formule brute C_3H_4O , se présente sous la

forme d'un liquide légèrement jaunâtre et d'une odeur désagréable. Dans les cidres, l'acroléine a pour origine la dégradation du glycérol par la flore lactique. Le glycérol est premièrement converti en 3-hydroxypropionaldéhyde 3-HPA puis ce composé peut subir, sous des conditions particulières (acidité élevée, forte température), une déshydratation spontanée ou facilitée par la distillation pour donner de l'acroléine (Drilleau *et al.*, 1997). La fraction obtenue après la distillation peut se transformer en alcool allylique et être utilisée comme traceur de la "piqûre acroléique" (Tourlière *et al.*, 1977). Pour Tourlière *et al.*, (1977), l'apparition d'acroléine dans les cidres est favorisée par les faibles teneurs en alcool, les pH et les températures élevées. Des travaux menés par l'Adria Normandie (1998) ont permis de conclure que la bactérie *Lactobacillus collinoïdes* étaient majoritairement responsable de la production d'acroléine dans le cidre. Très bien adaptées à l'environnement cidricole, la limitation du développement de ces bactéries au sein de la matrice cidricole est très difficile en conditions normales. Au pH du cidre, seule une température inférieure à 6/7 °C est capable d'assurer ce résultat pour quelques mois. La présence d'acroléine dans les eaux-de-vie nouvelles de calvados est assez limitée puisque 70 % d'entre elles n'atteignent pas le seuil de quantification, tandis que 95 % présentent des concentrations très faibles, inférieures à 1 g/hl d'alcool pur (IDAC, 2007). Au contraire, 90 % des échantillons contiennent de l'alcool allylique et/ou de l'acroléine, ce qui indique une piquûre acroléique plus ou moins prononcée (IDAC, 2007).

IV. Objectifs de la thèse

La thèse s'est inscrite dans le cadre du projet MoNArC qui a pour but de dégager des leviers technologiques pour une élaboration spécifique des cidres de distillation et du calvados. Au cours de ces travaux de recherche, nous nous sommes intéressés aux dynamiques microbiennes régissant la fermentation et à leur impact sur la qualité organoleptique et sanitaires de cidres de distillation. L'objectif premier est d'apporter des solutions technologiques applicables aux producteurs grâce à un meilleur suivi des cidres de distillation par le contrôle de la fermentation.

En conséquence, la mise en évidence de la diversité et des dynamiques microbiennes lors du processus de fermentation va nous amener à répondre à plusieurs questions : quelles diversités et dynamiques microbiennes interviennent lors du processus de fermentation des cidres à distiller ? Y a-t-il des différences de diversité microbienne entre différents cidres de distillation ? Si oui, quels sont les paramètres influant sur les dynamiques ?

L'analyse de cette diversité par approche métagénomique est couplée aux caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques du cidre de distillation. Ainsi, l'analyse des interactions microbiennes avec les composés volatils associées aux cidres de distillation et des calvados produits va nous permettre de répondre aux questions suivantes : Y a-t-il des différences de composition aromatique entre les différents calvados produits ? Si oui, est-ce qu'il y a un lien entre les dynamiques microbiennes et la complexité aromatiques des calvados ? De plus, est-ce que la maturation des cidres de distillation a un impact sur le bouquet aromatique final du calvados ?

Ces informations nous donnerons dans un premier temps des informations sur les interactions la communauté levurienne et bactérienne avec les particularités physico-chimiques des cidres, ce qui permettra ensuite d'aborder la problématique des défauts organoleptiques occasionnés par *Lactobacillus collinoides*. Pour cela, une exploration génomique de *L. collinoides* et des différents traits métaboliques associés à la fermentation sont présentés. La diversité de l'opéron *pdu* entre des souches de *L. collinoides* isolées des cidres de distillation a été également analysée dans le but de comprendre s'il y a un lien génétique avec la dégradation du glycérol. Enfin, nous proposerons une étude portant sur l'influence des conditions environnementales sur la dégradation du glycérol via l'utilisation d'un plan expérimental.

Chapitre I

Diversité et dynamique des communautés bactériennes et fongiques lors de la fermentation du cidre de distillation

L'évaluation de la dynamique des populations microbiennes des produits fermentés est essentielle pour appréhender et maîtriser le processus de fermentation. L'émergence récente de nouvelles stratégies basées sur le séquençage a supplanté les approches dites cultivables traditionnellement utilisées pour évaluer la diversité microbienne d'un écosystème.

Les cidres voués à la distillation résultent d'une fermentation spontanée sans aucune intervention humaine, laissant place à toutes les interactions possibles entre les différentes communautés microbiennes. Une connaissance fine de ces écosystèmes est alors déterminante pour mieux cerner les étapes critiques de la fermentation et par la suite améliorer la qualité du calvados. Dans le cas du cidre de distillation, peu d'études portent sur l'étude des écosystèmes microbiens, se limitant à l'analyse d'une communauté microbienne comme la flore technologique ou d'altération (Coton *et al.*, 2006a, 2006b ; Valles *et al.*, 2007 ; Yashiro *et al.*, 2011). Contrairement au vin, aucune étude ne porte sur l'étude des dynamiques et des interactions microbiennes lors de la fermentation du cidre de distillation (Beregal *et al.*, 2019 ; Bora *et al.*, 2016 ; Hong *et al.*, 2016). Ces travaux basés sur une approche par métagénomique apportent une réelle nouveauté dans l'étude de la diversité du vin et pourraient se révéler comme une méthodologie puissante pour la détection et l'identification des écosystèmes microbiens impliqués dans le cidre de distillation.

Dans ce contexte, ce premier chapitre présente l'étude par séquençage à haut débit de la diversité microbienne de cidres destinés à la distillation issus de quatre producteurs normands à différentes étapes du processus d'élaboration : début de fermentation (I), fin de fermentation alcoolique (F) et fin de période de maturation (M). En parallèle chaque échantillon de cidre a fait l'objet d'une caractérisation physico-chimique (teneurs en alcool, en glycérol, en azote, en acides malique et lactique, en sucre, pH, acidités totale et volatile). L'analyse par séquençage haut débit a été couplée aux techniques de microbiologie culturale pour sélectionner et isoler les principaux genres de bactéries et levures représentatifs des écosystèmes étudiés.

L'approche par métagénomique a permis de mettre en évidence plus de 40 genres bactériens et fongiques dans le cidre à distiller. En début de fermentation (I), la communauté fongique est représentée par des levures dites non *Saccharomyces*, notamment les genres *Hanseniaspora*, *Candida* et des levures phytopathogènes tandis que le genre *Saccharomyces* domine lors de la fermentation alcoolique (F). La période de maturation (M) entraîne une augmentation de la population de *Dekkera/Brettanomyces*, levure responsable de la production d'arômes indésirables dans le cidre. Les genres bactériens associés à la transformation

malolactique (*Oenococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp.,) étaient les plus abondants en F et M. Des bactéries acétiques (*Acetobacter* sp., *Komagataeibacter* sp. et *Gluconobacter* sp.) ont également été détectées en faible quantité tout au long du processus d'élaboration du cidre.

Des différences significatives ont été constatées au sein des populations fongiques et bactériennes entre les quatre producteurs au cours du processus de fermentation. Les cidres de distillation des producteurs A et C sont dominés par les levures *Saccharomyces uvarum* et *Dekkera anomala*, tandis que les cuves des producteurs B et D sont enrichies en *Saccharomyces cerevisiae* et *Dekkera bruxellensis*. Ces résultats ont été confirmés par l'identification des levures isolées des différentes cuves. Au sein de la communauté bactérienne, les différences entre les producteurs résident dans la présence de *Zymomonas mobilis* et la faible proportion en bactéries lactiques dans les 2 cuves du producteur C. Une valeur de pH plus élevée (>4) a également été constatée dans ces 2 cuves. Cela pourrait favoriser le développement de *Zymomonas mobilis* et entraîner des désordres organoleptiques, notamment en produisant de grandes quantités d'acétaldéhyde. Enfin, la présence de micro-organismes associés à l'altération du cidre tels que *Zymomonas mobilis*, *Lactobacillus collinoides* ou *Brettanomyces/Dekkera* sp. a été détectée par l'analyse métagénomique.

Ce travail constitue la toute première étude de diversité d'un écosystème cidricole par une approche de métagénomique. L'analyse du microbiome des cidres de distillation des quatre producteurs suggère que les pratiques d'élaboration mènent à une typicité du cidre, et donc à une typicité du calvados. L'analyse par métagénomique montre également qu'il est possible d'anticiper la détection de la flore d'altération, notamment de *Zymomonas mobilis*. La complémentarité du séquençage et des méthodes traditionnelles nous a permis d'obtenir une image globale de la diversité microbienne au sein de cidres de distillation ouvrant des perspectives d'amélioration de la qualité de l'eau-de-vie calvados.

Diversity and dynamics of bacterial and fungal communities in cider for distillation

B. MISERY^a, P. LEGENDRE^b, O. RUE^c, V. BOUCHART^b, H. GUICHARD^d, JM. LAPLACE^a and M. CRETENET^a

^a Normandie Univ, UNICAEN, UNIROUEN, ABTE, 14000 Caen, France

^b LABÉO Frank Duncombe, 1 Route de Rosel, 14053 Caen Cedex 4, France

^c Université Paris-Saclay, INRAE, BioinfOmics, MIGALE bioinformatics facility, 78350, Jouy-en-Josas, France

^d Institut Français des Produits Cidricoles (IFPC), Domaine de la Motte 35653 Le Rheu, France

Abstract

Bacterial and fungal population dynamics in cider for distillation have so far been explored by culture-dependant methods. Cider for distillation can be produced by the spontaneous fermentation of apples that do not undergo any intervention during the process. In this study, cider microbiomes extracted from six tanks containing ciders for distillation from four producers in Normandy were characterized at three main stages of the fermentation process: fermentation Initiation (I), end of the alcoholic Fermentation (F) and end of the Maturation period (M). Cider samples were subjected to Illumina MiSeq sequencing (rRNA 16S V1-V3 and ITS1 region targeting) to determine bacterial and fungal communities. Yeasts (YGC), *Zymomonas* (mZPP) and lactic acid bacteria selective media (mMRS, mMLO, mPSM) were also used to collect 807 isolates. Alcoholic levels, glycerol, sugar content (glucose, fructose and sucrose), pH, total and volatile acidity, nitrogen, malic and lactic acid contents were determined at all sampling points. Alpha diversity indexes show significant differences ($p < 0.05$) in microbial populations between I, F and M. Fungal communities were characterized by microorganisms from the environment and phytopathogens at I followed by the association of yeasts with alcoholic fermentation like *Saccharomyces* and *non-Saccharomyces* yeasts (*Hanseniaspora*, *Candida*). A maturation period for cider leads to an increase of the *Dekkera/Brettanomyces* population, which is responsible for off-flavors in cider for all producers. Among bacterial communities, the genera community associated to malolactic fermentation (*Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp., *Oenococcus* sp.) was the most abundant at F and M. Acetic acid bacteria such as *Acetobacter* sp., *Komagataeibacter* sp. and *Gluconobacter* sp. were also detected during the process. Significant differences ($p < 0.05$) were found in fungal and bacterial populations between the four producers and during the fermentation process. The development of microorganisms associated with cider spoilage such as *Zymomonas mobilis*,

Lactobacillus collinoides or *Brettanomyces/Dekkera* sp. was anticipated by a metagenomic approach. The monitoring of microbial diversity via high throughput sequencing combined with physical-chemical analysis is an interesting approach to improve the fermentation performance of cider for distillation and therefore, the quality of Calvados.

Keywords: Cider for distillation, 16S and ITS metagenomics, Microbial diversity, Lactic acid bacteria, *Dekkera/Brettanomyces*, Apple fermentation

1. Introduction

The assessment of microbial population dynamics in fermented food and beverages is essential to increase the characteristics of the fermentation performance. For decades, cultivable approaches - although limited in the case of bacterial diversity assessment – were used until new strategies emerged based on Next Generation Sequencing (NGS) (Juste *et al.*, 2008). This approach is one of the most efficient technique to monitor temporal microbial succession and has been applied to samples from various environments (Bigot *et al.*, 2015; Vasileiadis *et al.*, 2012). As for food, many metagenomic approaches were applied to summarise the state-of-the-art of microbial succession in the fermentation process of products such as kimchi, cheese, salami, kefir, cheonggukjang, wine or in table olive fermentation (Cocolin *et al.*, 2013; Dobson *et al.*, 2011; Ercolini *et al.*, 2012; He *et al.*, 2017; Jung *et al.*, 2011; Nam *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2012; Połka *et al.*, 2015; Portillo *et al.*, 2016; Yun *et al.*, 2019). In recent years, metagenomic approaches have been mainly used to correlate indigenous microbiota, food quality and product signatures. Hong *et al.* (2016) conducted investigations focusing on the implication of *Lactobacillus brevis* in wine spoilage by means of a metagenomic approach. Another study from Pinto (2015) revealed specific microbiota dynamics in spontaneous wine fermentations and unveiled a biogeographical correlation between the various regional wines. To date, the composition of microbial communities in ciders intends to be distilled and its microbial signature have scarcely been investigated (Coton *et al.*, 2006a; Cousin, *et al.*, 2017). Metagenomic studies can also be used to predict a contamination of microbial dynamics in food (Jung *et al.*, 2018; Langille *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2016), to search for microbial contamination sources and to define critical control points (Doyle *et al.*, 2017). Zhao *et al.* (2015) highlighted the need for control key points to ensure product quality when microbial diversity drastically changes.

Calvados is an apple brandy from Normandy made by distilling cider. Calvados has three protected designations of origin: the PDO “Calvados” (74% of the total Calvados production), “Calvados du Pays-d'Auge” (25%), “Calvados-Domfrontais” (1%), each having its own sensory properties. The cider used in Calvados elaboration is produced from the spontaneous fermentation of apple must by indigenous microbial population. Ciders for distillation do not undergo any intervention during the fermentation process. The distillation of ciders can be performed between one month and one year after the end of the alcoholic fermentation process. Studies have been conducted to determine microbial diversity throughout cider-making, from the apple surface to the pressing system (Cousin *et al.*, 2017; Lorenzini *et al.*, 2018; Lorenzini

et al., 2019; Valles *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2019; Yashiro *et al.*, 2011). Alcoholic fermentation is initially driven by non-*Saccharomyces* yeasts such as *Hanseniaspora uvarum* followed by *Saccharomyces* yeasts with a production of alcohol, lactic acid, metabolites, esters, higher alcohols and phenolic compounds which provide floral or fruity notes in cider (Coton *et al.*, 2006). Wine mycobiome is thought to be closely related to cider mycobiome as they share the same fermentation practices. The richness of yeast species of wine has been evaluated by NGS (Setati *et al.*, 2015) with a special focus on the differences of yeast diversity between vineyards. Although bacteria seem to have a smaller role in cider-making, their dynamics can favour flavouring and cider safety. For instance, some lactic acid bacteria (LAB) can convert L-malic acid to L-lactic acid through another fermentation process called the malolactic fermentation that leads to a deacidification. Four genus of LAB responsible for malolactic fermentation were described: *Oenococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Leuconostoc* (Lonvaud-Funel *et al.*, 1999; Salih *et al.*, 1990; Sánchez *et al.*, 2010). This conversion step can occur during or after the alcoholic fermentation process and impacts flavour complexity and global microbial dynamics. The monitoring of microbial communities during cider fermentation is crucial to predict and control cider quality. In this study, we conducted the first metagenomics analysis on ciders for distillation in order to evaluate microbial diversity, the dynamics and proportions in relation with the physical-chemical characteristics of the fermentation process and to determine control points for a better quality of cider.

2. Material and methods

2.1. Sample collection and workflow analysis

A total of six tanks from four producers (A, B, C and D) located in Normandy (France) were sampled weekly from October 2017 to June 2018. The apple harvest period lied between October/November 2017. Two tanks from producers C and D (C2 and D2) were monitored 3 weeks after the other tanks A, B, C1, D1. The workflow of cider analysis is resumed in Figure 1. Table 1 indicates the duration of the fermentation process, the duration of the maturation period, the volumes of the tanks and the producer location. Three temperatures were calculated as monthly average of outside temperatures at the beginning of the fermentation (I), the end of alcoholic fermentation (F) and the end of the maturation (M). A blending of different apple varieties were used for the elaboration of these ciders. The fermentation processes were performed by spontaneous fermentation, without using SO₂ or antimicrobial agents. Samples were taken from apples pressing and tank filling (I for fermentation Initiation) until a maximum of three months after the end of the alcoholic fermentation process (F); the sampling time was

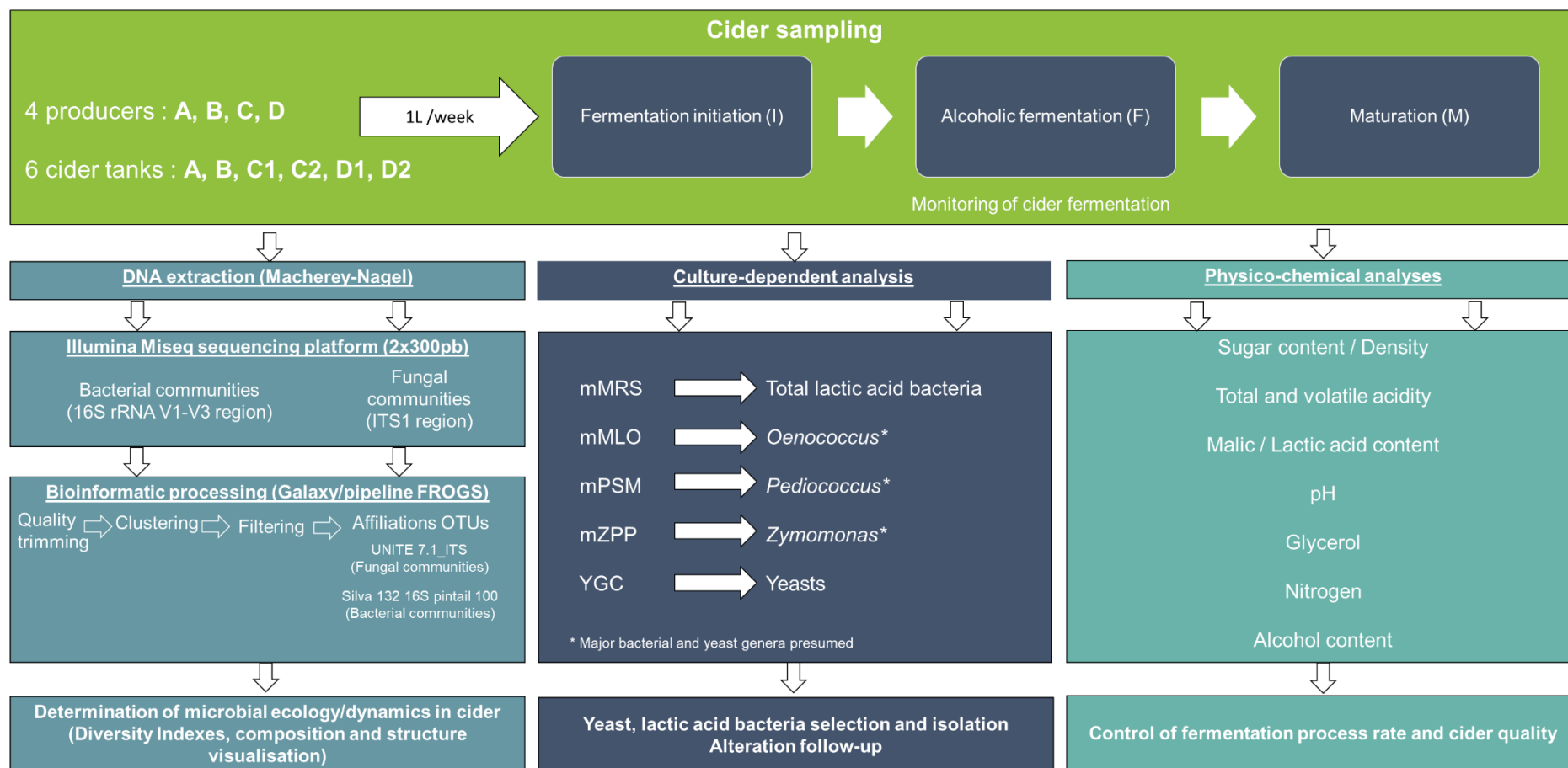


Figure 1. Diagram of cider analysis workflow. Modified (m) MRS, MLO, PSM and ZPP media were supplemented with 100 mg.L⁻¹ pimarin and 7 mg.L⁻¹ cycloheximide.

determined according to the decrease of the yeast population. A final sample was collected at the end of the maturation period (M). For each sample, physical-chemical, metagenomics and culture-dependent approaches were performed.

Table 1. Duration, average outside temperature, volume data and location of cider tanks A, B, C1, C2, D1 and D2.

Tanks	Fermentation initiation (I)	Alcoholic fermentation (F)	Maturation period (M)	Temperature I (°C)	Temperature F (°C)	Temperature M (°C)	Tanks volume (hL)	Location
A	25/10/2017	8 weeks	11 weeks	13.7	6.3	16.8	7500	Calvados
B	26/10/2017	6 weeks	14 weeks	13.7	6.3	16.8	1300	Orne
C1	23/10/2017	9 weeks	6 weeks	13.4	7.2	15.3	60	Manche
C2	08/11/2017	6 weeks	7 weeks	13.4	7.2	15.3	60	Manche
D1	19/10/2017	6 weeks	11 weeks	13.8	7.1	18.2	1200	Manche
D2	09/11/2017	7 weeks	22 weeks	13.8	7.1	18.2	1200	Manche

2.2. Physical-chemical analyses

The alcoholic levels were obtained by density measurement of distillates after steam distillation (reference OIV-MA-AS312-01A). Glycerol and sugar contents (Glucose, fructose and sucrose) were quantified by means of high performance liquid chromatography (HPLC Agilent 1100) using quaternary pump equipped with a Phenomenex Luna NH2 column. The column temperature was set to 28 °C and the mobile phase was a mix of acetonitrile/ultra-pure water (85/15, v/v) at a flow rate of 3 mL.min⁻¹. The detection and quantification stages were performed by refractive index detector. Organics acids (D- and L-Lactic acid and L-malic acid) were quantified using enzymatic kits (Megazyme). Total and volatile acidity were determined by acid/base titration with a standard solution of NaOH, after steam distillation for the volatile acidity (references OIV-MA-AS313-01 and OIV-MA-AS313-02). Nitrogen was quantified using the Kjeldahl method (reference OIV-MA-AS323-02A).

2.3. Microbial enumeration and isolation

For each sample, LAB and microorganisms affiliated to *Oenococcus* sp., *Pediococcus* sp. and *Zymomonas* were enumerated respectively on MRS (Fisher Scientific, France), MLO, PSM and ZPP media (Claus *et al.*, 1983; Coton *et al.*, 2006; Leuschner *et al.*, 2003) supplemented with 100 mg.L⁻¹ pimaricin and 7 mg.L⁻¹ cycloheximide after 72 h incubation at 30 °C in anaerobic conditions. Yeasts were enumerated on YGC (Biokar Diagnostics, France), after a period of incubation of 48 h at 25 °C. A collection of lactic acid bacteria (LAB) and yeasts was

carried out (807 isolates). Eight LAB and five yeasts isolates per tank and date were picked on the basis of their morphologies and identified by multiplex PCR according to Cousin *et al.* (2019).

2.4. DNA extraction

For each tank, the DNA was extracted from the cider samples at the beginning of the fermentation process (I), at the end of the alcoholic fermentation (F, yeast population decrease) and at the end of the maturation (M), depending on the producer practices. Depending on the fermentation rate, two samples were also extracted, before F and after F. 5 to 7 samples were extracted per tank, depending on the duration of the alcoholic fermentation process and the maturation period. For each sample, 50 mL of cider were centrifuged at 4700 rpm, 20 °C and stored at -80 °C before DNA extraction. Total DNA was extracted from the cider samples and purified using the NucleoSpin soil kit (Macherey Nagel, France), according to the manufacturer's instructions. DNA concentration and quality were determined with 0.8% agarose gel electrophoresis and quantified using the Picogreen assay (Fisher Scientific, France).

2.5. DNA Sequencing of bacterial rRNA 16S fragments / fungal ITS1 fragments

The high-throughput sequencing of the V1-V3 hypervariable region of the bacterial 16S rRNA gene was performed using Eurofins Genomics on an Illumina MiSeq platform according to the manufactures' instructions. Amplicons were generated using a two-step PCR protocol. Briefly, the V1-V3 regions were PCR-amplified using template specific primers (V1V3 -F, AGAGTTTGATCATGGCTCAG, (Weisburg *et al.*, 1991); V1V3-R, GTATTACCGCGGCTGCTG, (Leser *et al.*, 2002), containing a universal overhang. The sequencing primers used for fungal were ITS1-F, GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG ; ITS1-R, GCTGCGTTCTTCATCGATGC, (White *et al.*, 1990). The amplicons were cleaned up and set up for the PCR index, with specific primers directed to universal overhangs. Final amplicon libraries were cleaned up, quantified and pooled equimolar. The resulting final library pool was quantified and sequenced using the v3 chemistry (2 × 300 bp paired-end reads).

2.6. Bioinformatic analyses

Paired-end reads obtained from MiSeq sequencing were analysed using the Galaxy supported pipeline named Find Rapidly Operational Taxonomic Units (OTUs) with Galaxy Solution (FROGS) (Escudié *et al.*, 2018), using the dedicated guidelines for 16S and ITS data. A taxonomic assignment was performed using Silva132 16S pintail 100 (bacteria,

<https://www.arb-silva.de>) and Unite7.1 ITS (yeasts/molds) (Nilsson *et al.*, 2019). The distribution of the sampling points (calculated from the OTU contingency table) was displayed in MDS/PCoA ordination by R software (3.5.4) to compare global microbial community structures during the fermentation process and between the producers.

2.7. Statistical analyses

Shannon, Inverse Simpson, and Chao1 estimators, statistical analysis of alpha and beta diversity indexes used to evaluate sample differences in species complexity were performed using the Phyloseq R package implemented in FROGS (FROGSSTAT) (McMurdie *et al.*, 2013). The statistical analyses carried out on physical-chemical parameters were calculated using the R software (3.5.4). The physical-chemical differences between tanks were tested using the Kruskal Wallis test. Differences within physical-chemical parameters at I, F and M were analysed using the Friedmann test. The physical-chemical data collected at I, F and M for each tank were subjected to principal component analyses (PCA) using the R software (3.5.4). All parameters are listed in Table 1.

3. Results

3.1. Characteristics of cider for distillation

The characteristics of ciders for distillation (pH, alcohol, total and volatile acidity, glycerol, sugars, malic and lactic acid contents) are shown in Table 2. Cider samples were collected from 4 producers each week, A/B/C and D (Table 1) and a total of 6 tanks (2 tanks for each producer C and D). At the beginning of fermentation (I), the density values ranged from 1039.54 kg/m³ to 1052.38 kg/m³ with the two higher values for tanks of producer C and sugar content shifting from 88.55 g.L⁻¹ to 118.88 g.L⁻¹. An alcohol rate of 0.6% was observed for tank D2 at I while the other tanks displayed a rate of 0. No glycerol was measured for A, C1 and D2 whereas it was of 1.3 g.L⁻¹ for B, C2, D1. The pH ranged from 3.8 to 4.1. Nitrogen amounts at I varied from 20 mg.L⁻¹ for D2 tank to 77 mg.L⁻¹ for tank B. The total acidity rate ranged between 1.35 g.L⁻¹ and 1.69 g.L⁻¹ H₂SO₄ while the volatile acidity rate ranged between 0.04 and 0.23 g.L⁻¹ H₂SO₄. The initial L-malic acid content varied between 2.31 g.L⁻¹ and 3.46 g.L⁻¹ and L-lactic and D-lactic acid amounts were <0.10 g.L⁻¹, except for tank C2 with 0.18 g.L⁻¹ of initial L-lactic acid.

At the end of alcoholic fermentation (F), the density values reached 1000 kg/m³ for tanks B, C1, C2 and respectively by 1003.30 kg/m³, 1002.37 kg/m³ and 1011.50 kg/m³ for tanks A, D1

Table 2. Ciders characteristics of producers A, B, C, and D. Different letters signify differences within physical-chemical amounts between tanks and during fermentation according to Kruskal–Wallis test and Friedman test respectively.

All physical-chemical parameters were tested with Kruskal–Wallis and Friedman test.

^a corresponds to Kruskal–Wallis test between tanks. No difference was significant except for pH and D-lactic acid content.

^b corresponds to Friedman test between I, F, M. Only pH was not significantly different.

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

and D2. The sugar content of each tank dropped below 21 g.L⁻¹ except for tank C1 (85.74 g.L⁻¹). No more glucose and sucrose were quantified for these ciders, except for tank C2. The alcohol level reached respectively to 5.3, 5.4, 6.2% v/v for tanks D1, A and B and 6.8% v/v for the producer of tank C. pH values remained stable for tanks A, B, C1, D1 and D2 (3.94 - 3.99) but increased to 4.29 for C2. No nitrogen was quantified at F for all tanks. The total acidity rate ranged from 2.01 (A) to 3.15 g.L⁻¹ H₂SO₄ (C1) whereas the volatile acidity rate ranged from 0.64-1.14 g.L⁻¹ H₂SO₄. During fermentation (F), no more L-malic acid was quantified for all ciders, and L-lactic content varied from 1.05 g.L⁻¹ to 1.71 g.L⁻¹, with the exception of C2 cider (0.15 g.L⁻¹). D-lactic acid amounts ranged from 0.11 g.L⁻¹ for C1/C2 to 2.07 g.L⁻¹ for tank D2. At the end of the maturation (M), glucose and sucrose were totally consumed for all tanks. Fructose was almost totally consumed except for A, B and D2. The alcoholic level of tanks A, B, D1 and D2 ranged between 5.2% and 6.4% (v/v) while C1 and C2 tanks reached 6.8% (v/v). Glycerol content remained stable for tank A, increases for B (5 g.L⁻¹), C2 (2.4 g/L), D1 (4.6 g.L⁻¹) and D2 (3.34 g.L⁻¹) but decreases to 4.02 g.L⁻¹ for C1. The total acidity reached values between 2.53 g.L⁻¹ and 3.14 g.L⁻¹ H₂SO₄ at M. Volatile acidity increased above 1 g.L⁻¹ H₂SO₄ for all tanks, except for tank C2 that has a lower production of L-lactic and D-lactic acid (0.14 g.L⁻¹ and <0.10 g.L⁻¹). For the other tanks, the acid amount varied between 1.02 g.L⁻¹ to 1.81 g.L⁻¹ and 0.56 g.L⁻¹ to 1.76 g.L⁻¹ respectively.

The fourteen physical-chemical parameters of ciders were reduced in two dimensions (Dim1 and Dim2). Dim1 accounted for 78.54% and Dim2 accounted for 12.99% of the total variations (Supplemental data, Figure A.1). Sugars (glucose, fructose, sucrose), density, total sugar, nitrogen, L-malic acid content, glycerol, ethanol, total acidity, volatile acidity L-lactic, D-lactic acid were displayed on Dim1, indicating a strong correlation between these parameters. Lactic acid and pH were displayed on Dim2. The plot showed that cider samples at I are differently distributed than those at F and M. F and M data are grouped. Only parameters of tanks C1 and C2 were differently distributed than those of the other tanks.

3.2. Microbial kinetics in cider for distillation

Yeast and LAB populations showed similar dynamics for all tanks (Figure 2). A high prevalence of the initial yeast population was observed at I, followed by a decrease after 6 to 9 weeks, which is where we observed a gradual increase in the LAB population. For A, B, C1, D1 and D2, the LAB population increased by approximatively 1.5x10⁶ UFC.mL⁻¹ (I) to 4.7x10⁷ UFC.mL⁻¹ (M) whereas LAB population in tank C2 increased from 4.0x10⁴ UFC.mL⁻¹ to

$2.55 \times 10^5 \text{ UFC.mL}^{-1}$. A slight decrease of the LAB population was observed between F and M in all tanks. The presumed *Oenococcus* numerations in mMLO at I was higher than in mMRS. The dynamics of *Oenococcus* followed the same dynamics as LAB from F to M in mMRS except for tank C2. Apart from tanks of producer C, the yeast population tends to decrease from $1.0 \times 10^7 \text{ UFC.mL}^{-1}$ to $1.0 \times 10^4 - 1.0 \times 10^5 \text{ UFC.mL}^{-1}$, starting from 2 to 3 weeks of fermentation.

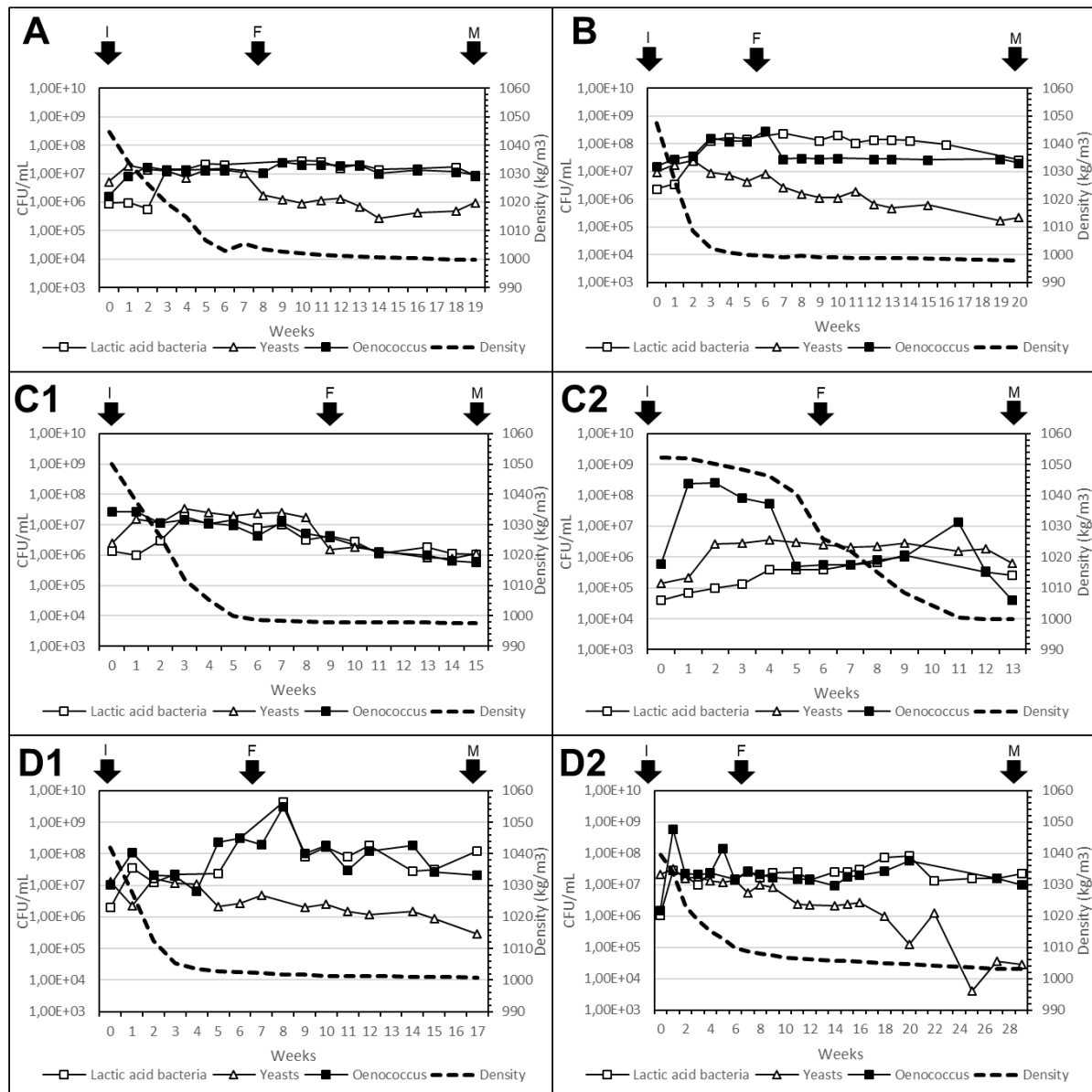


Figure 2. Density, lactic acid bacteria (□), *Oenococcus* (■), yeasts (△) countings during cider fermentation of producer tanks A, B, C1 and C2, D1 and D2.

For tanks C1 and C2, the yeasts population decreased later on 9 weeks of fermentation or remained stable during the fermentation process. *Zymomonas* isolates were only suspected on ZPP plates in tanks C1 and C2 after four weeks of fermentation (1.2×10^7 UFC.mL⁻¹ for C1 tank, 9.6×10^5 UFC.mL⁻¹ for C1 tank). *Zymomonas* could still be found at M for tank C2 (3.2×10^4 UFC.mL⁻¹) but no longer for tank C1 (data not shown).

LAB isolates from ciders at I and M were identified by multiplex PCR (Cousin *et al.* 2019) and the results obtained are shown in Figure 3. At the beginning of fermentation (I), the majority of the bacteria isolated from MRS and MLO media were not identified as LAB for all tanks. At the end of maturation (M), bacteria isolated from MLO medium were identified as *Oenococcus sp.* Some *Lactobacillus sp.* and *Oenococcus sp.* were isolated from MRS medium. In mPSM media, no *Pediococcus sp.* were isolated but the isolated bacteria were mainly affiliated to *Lactobacillus* and *Oenococcus sp.* In tanks B, C1 and C2, some bacteria isolated from all media were not identified as LAB at M.

3.3. Cider microbial communities using high throughput sequencing

To describe bacterial diversity, high-throughput sequencing of the V1-V3 hypervariable region of the bacterial 16S rRNA gene came to a total of 1,478,552 sequences with an average length of 300 nts (length filter with minimum 100 nts and maximum 580 nts). The sequence abundance and presence were filtered in multiple samples. Sequence proportion in samples was kept at a minimum of 0.0005% and Operational Taxonomic Units (OTUs), present in at least three samples, were preserved. The final OTU table contained 196 bacterial OTUs. In order to verify the representativeness of the obtained sequences, rarefaction curves were generated. Rarefaction curves were saturated, showing a good depth of sequencing (Figure A.2). Inverse Simpson, Chao and Shannon diversity indices calculated from these datasets confirmed this trend (Figure A.3, A.4). A standardization of the number of sequences per DNA extracted was performed on the basis of a sample with the lowest number of sequences (19,973 sequences). Community richness was lower at F and P than at the early stage of fermentation according to the analysis of the OTU profiles (Figure A.2, A.3).

The most abundant bacterial taxonomic groups were *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*, representing respectively to 32.78%, 25.83% and 16.03% of the sequences, and 22% of sequences affiliated to a multi-affiliation. *Lactobacillaceae* combine *Lactobacillus mali*, *Lactobacillus collinoides* and *Lactobacillus suebicus*. *Oenococcus oeni* and *Leuconostoc*

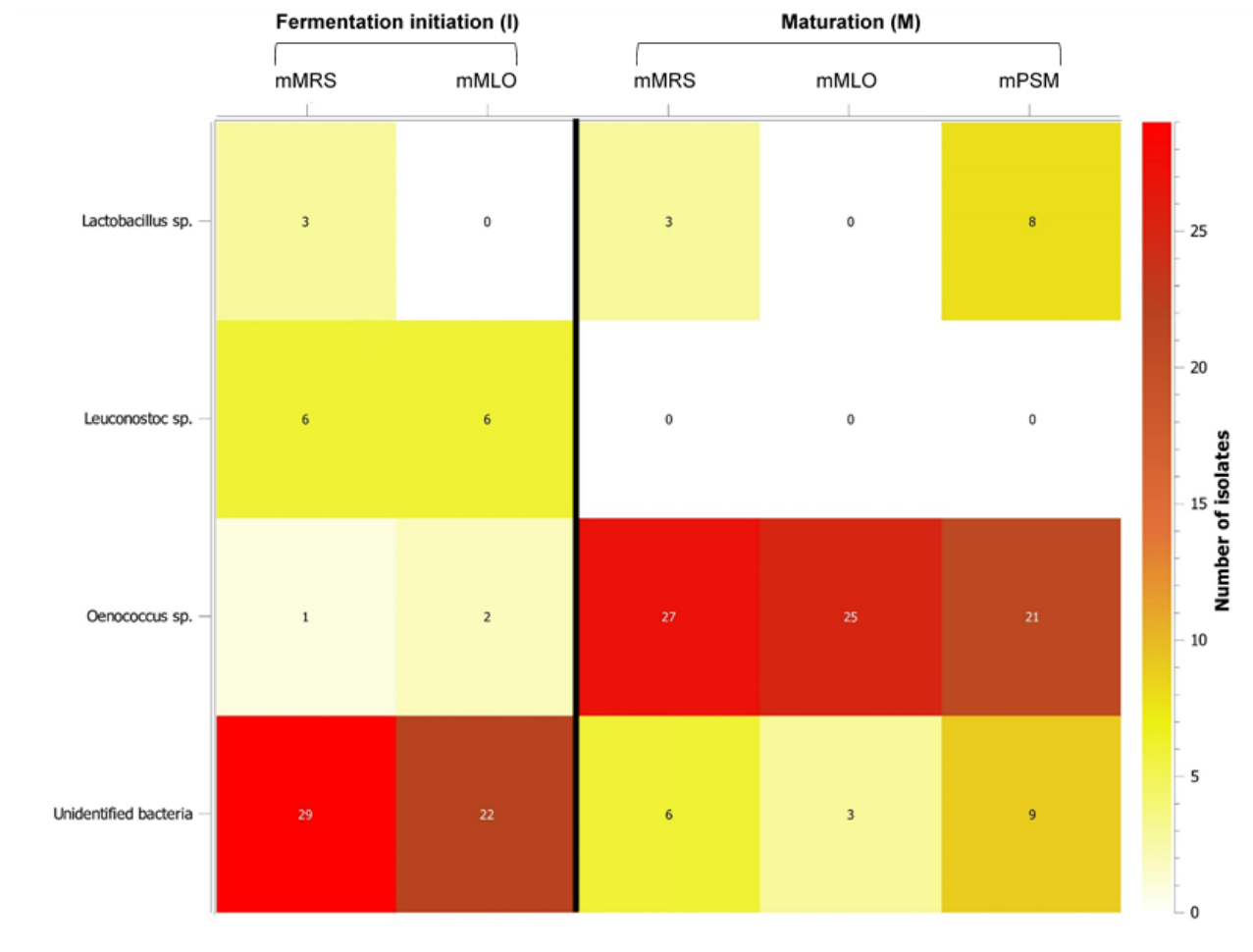


Figure 3. Identification of lactic acid bacteria from mMRS, mMLO, mPSM media at different steps of cider elaboration (I and M).

pseudomesenteroidetes were the only species of *Leuconostocaceae*. Multi-affiliated sequences were related up to 99% to *Enterobacteriaceae* and up to 0.33% to *Acetobacteriaceae* (other sequences were affiliated to microorganisms related to plant and soil). *Enterobacteriaceae* included *Rahnella*, *Buttiauxella*, *Erwinia*, *Raoultella*, *Serratia*, *Gibbsiella*, *Kluyvera*, *Lelliottia*, *Lonsdalia*, *Pantoea*, *Tatumella* and several other unidentified genera.

The fermentation initiation (I) was characterized by the abundance of *Pseudomonas*, *Serratia*, *Erwinia*, *Rahnella* and acetic acid bacteria (AAB). *Gluconobacter* (1 to 19%) and *Acetobacter* (1 to 7%) were present at I, with a higher proportion in tank D1. Step F was dominated by a higher abundance of *Lactobacillus* and *Oenococcus*. The AAB proportion was lower at F than at I. The maturation (M) presented a similar bacterial composition to that at F, but with a higher abundance of *Oenococcus* than *Lactobacillus*. *Acetobacter* and *Gluconobacter* sp. were in lower abundance than in F but still present during the ripening period. The lowest bacterial diversity was observed at M.

A total of 4,094,918 sequences with an average length of 300 nts were obtained by sequencing the ITS1 region to describe fungal diversity. After cleaning, 3,495,759 sequences were analysed and the final OTU table contained 161 eukaryotic clusters. According to the Inverse Simpson, Chao and Shannon diversity indices, the fungal richness was relatively stable during the fermentation process. In this study, 38 families, 48 genera, 82 species were detected, including: *Saccharomyces uvarum* (38.13%), *Saccharomyces cerevisiae* (21.44%), *Dekkera anomala* (7.98%). Less than 2% of all sequences could be attributed to filamentous fungi, such as *Sarocladium strictum*. Moreover, some phytopathogenic fungi were described, belonging to *Mucor* sp., *Didymella* sp., *Acremonium alternatum*, *Monographella cucumerina*, *Diplodia intermedia* and *Botrytis caroliniana*, which are the causal agents of the gray mold disease or apple tree disease (Li *et al.*, 2012). In a general way, the most abundant eukaryotic genera were *Metschnikowia*, *Hanseniaspora*, *Saccharomyces* and *Pichia* at I. Their abundance decreased thereafter and *Saccharomyces cerevisiae/uvarum* and *Dekkera anomala/bruxellensis* represented the most abundant species at F and M. The dominant genera during the maturation (M) were *Saccharomyces* and *Dekkera/Brettanomyces*.

3.4. Comparison of microbial diversity

A microbial profile comparison was performed by MDS/PCoA, according to the fermentation steps (Figure 4). For each tank, the fungal and bacterial composition was significantly different

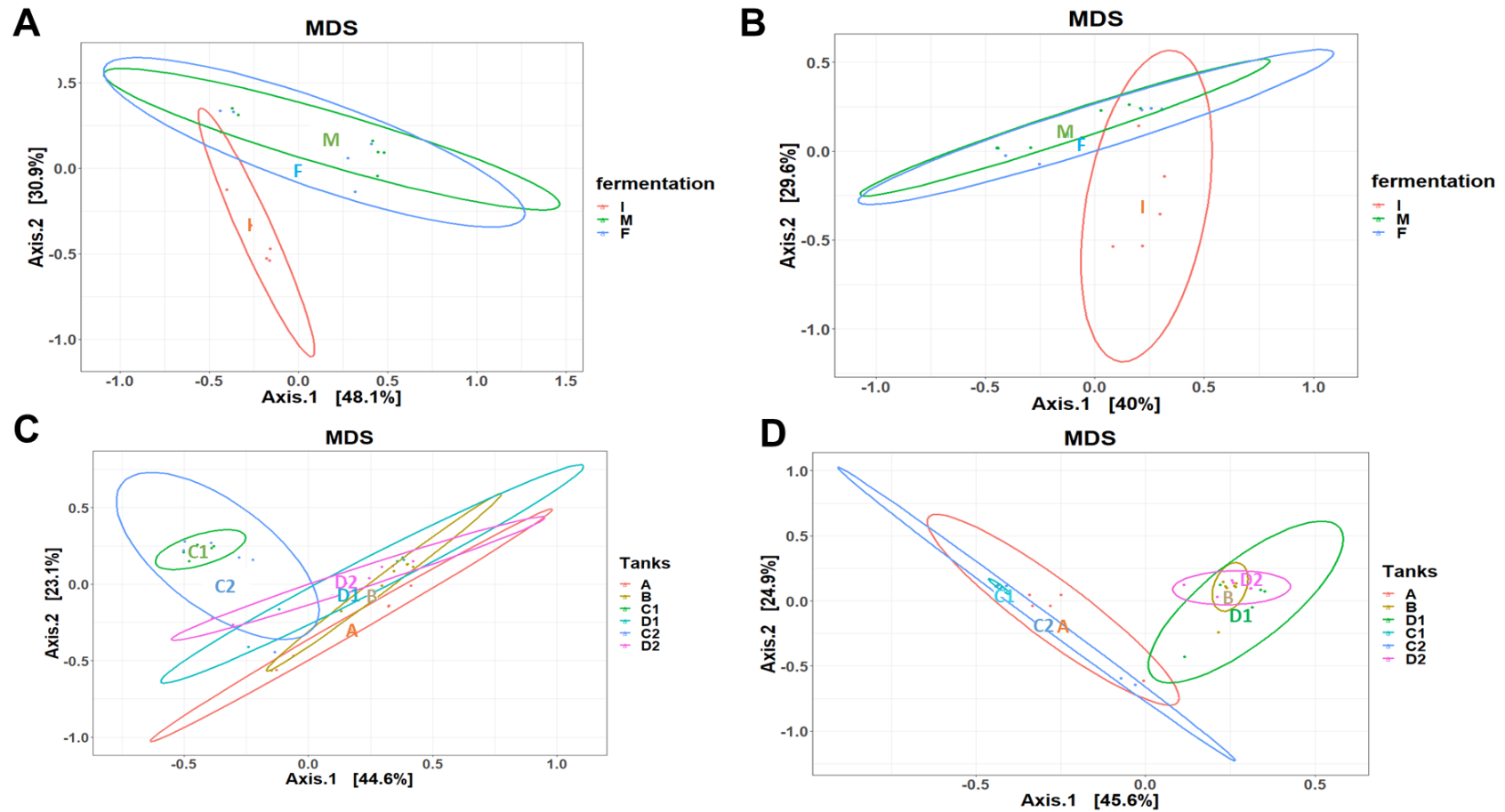


Figure 4. MDS/PCoA representing A) bacterial and B) fungal OTUS distribution according to fermentation steps and C) bacterial and D) fungal OTUS distribution according to cider tanks.

at I, F and M. In the MDS, ellipses representing fermentation key points F and M merged. Chao's alpha, Shannon's diversity, and Inverse Simpson's diversity indices were higher at I in comparison to F and P (p-value<0.005), suggesting a more diverse microbial ecology at the start of the fermentation process (Figure A.3, A.4). For bacterial diversity, the Shannon's diversity index value was of 3.73 at I and dropped to 1.58 at M. Shannon's diversity index was higher in A (2.81) and lower in C2 (1.04). The other tanks were approximatively similar judging from this index (1.60 to 1.79). Performed ANOVA on Simpson and Chao's indexes showed differences in the bacterial composition between tanks (p-value=0.008 and p-value=0.021 respectively). For fungal diversity, the alpha-diversity distribution shows differences between the relative abundance during the fermentation process (p-value<0.005). The performance of the ANOVA test on Shannon and Chao's indexes highlighted a similar fungal composition between tanks C1 and C2, D1 and D2. We also used a MDS/PCoA to assess the differences in bacterial composition between producers (Figure 4). Tanks C1 and C2 presented bacterial composition differences while A, B, D1 and D2 showed similar profiles (Figure 4.C). The MDS in Figure 4.D represents the sample distribution according to the abundance of the observed *OTUS* and shows yeast composition of the producers. A variation of the fungal composition between C/A producers and B/D was found. No difference in bacterial and fungal composition was found between tanks C1/C2 and D1/D2. Microbial diversity for tanks A, B, C1, C2, D1 and D2 are shown in Figure 5. In tanks A, B and D1, a decrease in the bacterial diversity was observed during F, especially for microorganisms that represent the indigenous microbial community related to soil and fruit surface. An increase of LAB proportion was observed at the same time. Sequences belonging to the genus *Lactobacillus* and *Oenococcus* were rare at I (<0.02%) but were, respectively, of 25-61% and 15-40% at F. Bacterial diversity tended to be stable during the maturation period although we observed a decrease in *Lactobacillus* related sequences (32-49%) and an increase in *Oenococcus* related sequences (42-52%). For producer C, the bacterial communities were different from those observed in all other producers. C1 and C2 tanks were dominated by *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas*, with a lower observed bacterial diversity than for the other producers. In these tanks, and during the fermentation process, a low proportion of the genera *Lactobacillus* and *Oenococcus* was observed at F and P, unlike in ciders coming from other producers. The proportion of the sequences belonging to *Zymomonas sp.* was of 17% at F for tank C1 and of more than 90% for tank C2 after F. *Zymomonas sp.* proportion at M was of 23% whereas *Lactobacillus sp.* proportion was of 19% in tank C2. A low proportion of *Oenococcus* was found in C1 and C2 tanks at M (1%).

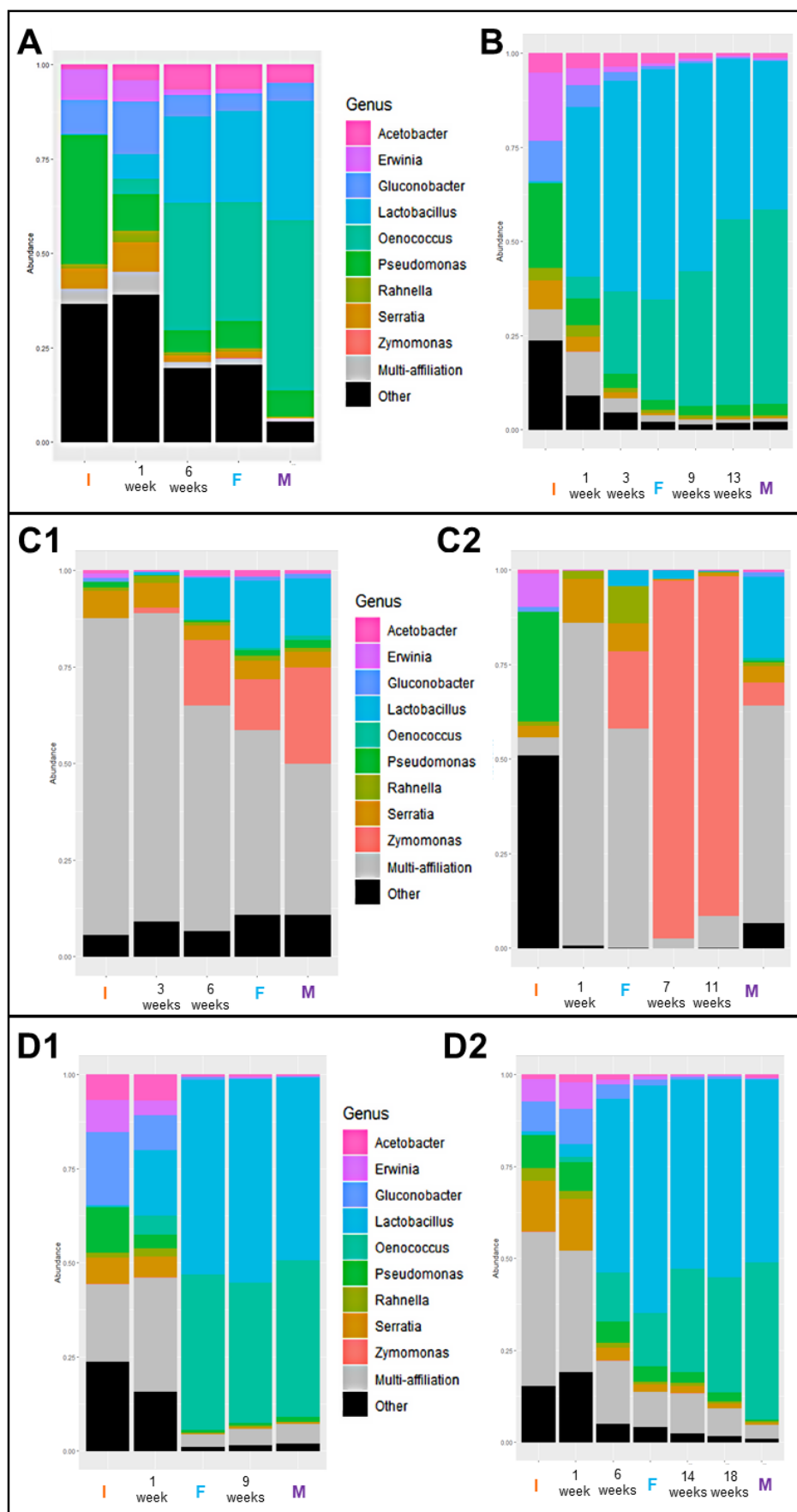


Figure 5. Phylogenetic taxonomy for bacterial communities showing dynamic changes at the genus level during cider fermentation of producer tanks A, B, C1, C2, D1 and D2.

As for the AAB population dynamics at I, *Gluconobacter* and *Acetobacter* proportions represented less than 20% and reached 1% for tanks B, C1, C2, D1 and D2. The AAB proportion in A at M remained high, unlike in other tanks. *Komagataeibacter*, previously described as *Gluconoacetobacter* genus, remained present in tank D1. In tanks A, B and C1, we observed a decrease in the *Saccharomyces* proportion from 75% to about 50% during the fermentation process whereas *Dekkera/Brettanomyces* increased in proportion from 0% to 40% (Figure 6). Fungal dynamics was slower in tanks C1 and C2. The fungal biodiversity in musts of producer C was significantly different from that of other producers' musts. While the *Saccharomyces* proportion decreased to 50% during the fermentation process for all tanks, this proportion decreased from 96% at I to 77% at M in tanks C1 and C2. As for the species, a high presence of *Dekkera anomala* and *Saccharomyces uvarum* was described in producers A and C whereas *Dekkera bruxellensis* and *Saccharomyces cerevisiae* were found in tanks B and D1. *Hanseniaspora* sequences proportion decreased drastically from 50% at I to less than 2% at F in all tanks.

4. Discussion

Microbial diversity is a key parameter for the fermentation performance and quality of ciders. Yeast and bacterial species are also a signature of the expertise of cider producers. In our study, 40 and 48 bacterial and fungal genera, as well as 30 bacterial species and 82 fungal species were identified during the fermentation process of cider for distillation. Fungal and bacterial richness at I was higher than during the fermentation process. This study confirmed the presence of non-*Saccharomyces* yeasts like *Hanseniaspora* and *Metschnikowia* in musts. A study from Valles *et al.* (2007) reported that pneumatic pressing were dominated by *Hanseniaspora*, highlighting the farm environment origin of this population. In wine, a prevalence of *Candida* at the beginning of the fermentation process, of *Hanseniaspora* during the fermentation process and an increase of *Saccharomyces* after 10 days has been described (David *et al.*, 2014; Portillo and Mas, 2016). Our study confirmed the same succession of yeasts in cider with a slower dynamic in cider (around 7 weeks) than described in wine (12 days). This behaviour is directly associated to the fermentation temperature, which is lower in cider (6.3-18.3°C) than in wine (25°C). A larger yeast diversity at the beginning of the fermentation process was found in our study with the presence of *Pichia* and *Sarocladium*. On the contrary, few microbial species specific to cider for distillation were identified in this study. *Proteobacteria* was the only phylum present at I for producers A, B and D whereas more diversity was observed for producer

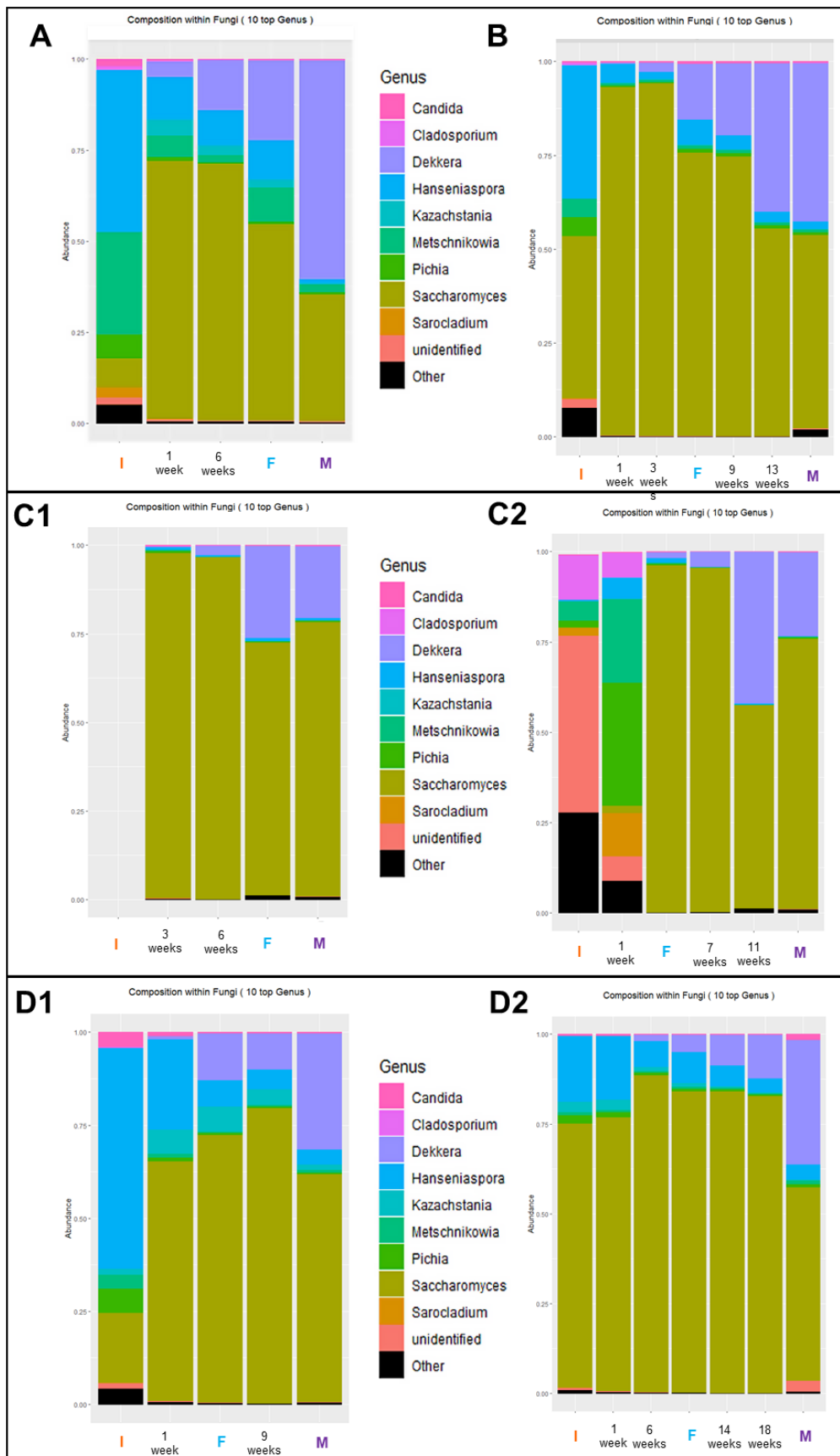


Figure 6. Phylogenetic taxonomy for fungal communities showing dynamic changes at the genus level during cider fermentation of producer tanks A, B, C1, C2, D1 and D2.

C with phyla such as *Actinobacteria*, *Tenericutes* and *Proteobacteria*. *Proteobacteria* includes *Enterobacteriaceae* (among genera *Serratia*, *Tolumonas*, *Erwinia*), some *Acetobacteraceae* and *Pseudomonas*. They mainly come from soil or human practices (fruits collection, pressing system, tank material) and remain the natural dominant microbial family on apple surface (Glenn *et al.*, 2011; Yashiro *et al.*, 2011). *Firmicutes* replaced *Proteobacteria* during the fermentation process due to higher alcoholic level and acidification. This replacement was similar to the one present in wine fermentation but happened to a lesser extent (Portillo *et al.*, 2016). G-Alegria *et al.* (2004) showed that *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus* strains cope with stressful environment such as low pH and high alcohol content in wine. Interestingly, pH dynamics were significantly different depending on the tanks: A is stable, B decreases at M and D tanks decreases throughout the process. The pH values of the tanks from producer C at F and M were higher than for the other tanks. These differences in pH may explain the differences in diversity between producer C and the three others. High proportions of the spoiling bacteria *Zymomonas mobilis* were found at F and M. This bacterium is responsible for “cider sickness” by producing high amounts of acetaldehyde from residual sugars or ethanol present in cider (Coton *et al.*, 2006b). The high sugar content, a low initial yeast population and a higher pH than in others tanks may have promoted its growth (Coton *et al.*, 2006; Wecker and Zall, 1987). Culture dependent and culture independent methods lead to a better detection of *Zymomonas* development in cider for distillation. Surrounding microflora remarkably affects microbial composition in cider. This study shows a difference between producer tanks according to the microbial composition.

In the past few years, many researches were conducted in order to underline the factors leading to the existence of “microbial terroir” and product quality. An article from Gilbert *et al.* (2013) spotlighted the terroir concept by summarizing the state of art of all parameters which can influence microbial ecology for wine grapes. Kemp *et al.* (2019) highlighted the influence of the different viticulture practices leading to fermentation characteristics variations as well as a variation in microbial composition. Climatic conditions, cultivar or the choice of grapes varieties drive the grape microbial diversity and the fermentation process. In another way, Setati *et al.* (2015) demonstrated that microclimate and farming practices influenced grape-surface microbiota. pH, Brix, titratable acidity, sugars and aromas content are different depending on the apple variety, influencing microbial composition during the fermentation process or in the contamination of the initial musts (Keller *et al.*, 2004). “Microbial terroir” is a notion related to microbial species found in a particular product and geographical area. Here, our metagenomics

approach gave a global appreciation of microbial diversity, even if only at the genus level because of the high conservation of DNA targeted regions. At this level of identification, only the pH emerged as one of the factors determining the role of microbial diversity and cider signature. In our work, the microbial ecosystems of producer C stand out from those of others producers. The volumes of the tanks from this producer were smaller (60hL) than that of the other tanks (up to 7500hL) and the maturation period is shortened in his practices. These highlighted differences are worth to be investigated in a complementary study, that also includes apple varieties, focused on this particular matter.

Saccharomyces population levels in cider for distillation is a key characteristic for the monitoring of the fermentation process. At the end of fermentation (F), the proportion of *Saccharomyces* represents 51% to 96% of the total yeasts composition depending on the tank and is closely related to nitrogen amounts, while this proportion decreases during M (34% to 74%). As for LAB in Figure2, yeast isolates were sequenced to evaluate the yeast diversity obtained by culture dependant method (data not shown). The identification of yeasts isolates by NL1-NL4 region sequencing revealed two clusters of *Saccharomyces* within tanks. The first one is associated to *Saccharomyces cerevisiae* for producers B and D. The second cluster was closed to *Saccharomyces uvarum/bayanus/cerevisiae* for producers A and C. These results confirm that *Saccharomyces* species are different between producers B/D and A/C as revealed by the metagenomic approach. *S. uvarum* is a cryotolerant yeast species that dominate low temperature fermentations of ciders. Some studies have shown differences between *Saccharomyces* species concerning their contribution to aroma and chemical profiles during the fermentation process (Kanter *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2020). Coupled with climatic conditions, our study presents possible natural hybrids from *Saccharomyces* species (*S. uvarum*, *S. bayanus* and *S. cerevisiae*) or natural species such as *S. uvarum* in low temperature cider fermentations of producers A and C.

For all tanks, our final sample collected at the end of the maturation (M) exhibited a higher prevalence of *Dekkera/Brettanomyces* (23% to 60%) than at F (2% to 26%). Temporal succession of *Saccharomyces* to *Dekkera anomala/bruxellensis* during the maturation remains a strong subject of interest in cider. *Brettanomyces/Dekkera* is responsible for off-flavors such as “animal aromas” that severely decrease the product market’s value in wine, cider or beer (Colomer *et al.*, 2019; Guichard *et al.*, 2019; Vigentini *et al.*, 2008). It can synthesize unwanted volatile phenols but also its esterase activity is capable of increasing ethyl lactate and ethyl acetate contents and to degrade isoamyl acetate (Buron *et al.*, 2011; Guichard *et al.*, 2019).

Volatile phenols production is unintended in cider because of the ester perception cover-up (Le Quéré *et al.*, 2006). However, several studies showed that aroma profiles complexity was not only due to microbial biodiversity but also to other environmental factors including farming, specific product choices and initial product quality (Ercolini *et al.*, 2012). Our study validated that a non-intervention on tanks after the alcoholic fermentation process leads to a higher prevalence of *Brettanomyces/Dekkera*, confirming that the maturation must be closely monitored for cider aromatic quality.

LAB presence is double-edged in cider-making. They can be beneficial by decreasing cider acidity via malic acid transformation and aroma production but this deacidification can lead to a higher susceptibility to bacterial alteration and organoleptic defects. In our study, all malolactic fermentations were completed between the first and the fifth weeks. However, at the end of cidermaking (M), the lactic acid content differed between producer C's tank and the others. This finding is consistent with the microbial dynamics of the LAB, which is poorly represented in these ciders at M. In tank C2, the high pH value, the low lactic acid levels and the low proportion of LAB show that the imbalances in acidity and in malolactic fermentation efficiency promote a higher proliferation of bacterial alteration and organoleptic defects. In addition, the high proportion of D-lactic acid in C tanks shows the need of quality control in cider to avoid the risk of lactic spoilage. Other consequences on organoleptic defects can sometimes be caused by specific LAB species such as *Lactobacillus collinoides*. *Lactobacillus collinoides* is responsible for the conversion of glycerol into 3-hydroxypropionaldehyde, an aldehyde leading to organoleptic disorders in cider (Sauvageot *et al.*, 2000). In this study, culture dependent and culture independent methods were applied to specifically analyse LAB population diversity and dynamics. *Oenococcus* and *Lactobacillus* were the two major genera that were isolated during the fermentation process by culture-dependant method (only a few were represented in producer C's tanks). In our study, LAB isolation was hampered by the richness of microbial diversity at I while the mMLO medium was efficient for *Oenococcus sp.* enumeration since 90% bacteria were isolated in mMLO at M. *Oenococcus oeni* is known to be the dominant species in beverages such as wine and plays an important role on product quality (Bartowsky *et al.*, 2005).

The same trend was observed in the analysis of LAB sequences. *Lactobacillus* were the dominant LAB flora during the fermentation process, even if its proportion decreased in favour of *Oenococcus oeni* at M. *Lactobacillus* sequences obtained by NGS sequencing were compared to sequences from the NCBI database and other sequences data to obtain a closer affiliation to the species. The results revealed 11 different clusters, including 3 clusters of

known species (*Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus mali*, *Lactobacillus suebicus*, with respectively 100%, 99.8% and 98.81% sequence identity) and 2 clusters of *Lactobacillus sp.* Indeed, the proportion of these species varied depending on the tanks. For example, *L. collinoides* was present at M in tanks A (30%), B (29%), D1 (25%) and D2 (51%) but not in C1/C2 tanks. The sequence analysis showed that *Leuconostoc* were present at F (1%) and some isolated bacteria in mMLO and mMRS confirmed this trend. No *Pediococcus* were found either by culture method or by metagenomic analysis. This could be explained either by the minor quantities of these populations in cider or by the specificity of the 16S rDNA region targeted, leading to a underestimation of the present subpopulations (Ercolini *et al.*,2003; Quigley *et al.*,2012). The overall diversity of the LAB detected with culture dependant methods was similar to the findings obtained by metagenomic analysis even if LAB identification highlighted the lack of selectivity of our media throughout the fermentation process. LAB enumeration must be interpreted carefully as selective media for *Lactobacillus* and *Leuconostoc* are more reliable than those for *Pediococcus* and *Oenococcus*. However, the coupling of these two methods gave a consistent global image of microbial diversity within cider for distillation showing that a deeper knowledge of LAB diversity, abundance and dynamics is of interest for the improvement of the Calvados-beverage quality. The diversity and the proportion of LAB are important to understand how to control MLF in cider for distillation. The malic acid was rapidly consumed in all monitored tanks. The consumption of malic acid was not always correlated to D-L-lactic acid production (C1 and C2). Malic acid can also be consumed by yeasts as alcoholic and malolactic fermentations occurred simultaneously in all tanks of the study. The lower production of D-L-Lactic acid in tanks C1 and C2 may be explained by the low proportion of LAB in these tanks which cannot compete with yeasts for malic acid consumption. A better understanding of the dynamics of LAB during cider fermentation and maturation will lead to specific technical guidance for producers for a better control of MLF.

5. Conclusion

A metagenomic analysis was used for the first time on apple fermentation microbial communities to unveil microbial population dynamics during cider-making. Our study successfully highlighted the diversity and temporal changes of these microbial communities. The analysis of the cider for distillation microbiome structure of the four producers suggested that cider-making practices lead to cider typicity, and therefore to Calvados typicity. The coupling of culture dependant and independent methods gave a consistent global image of microbial diversity within cider for distillation showing that a deeper knowledge of LAB

diversity, abundance and dynamics is of interest for the improvement of Calvados quality. High throughput sequencing can also anticipate the development of microorganisms associated with cider spoilage microorganisms such as *Zymomonas mobilis*, several *Lactobacillus sp.* or *Brettanomyces/Dekkera sp.*. A better evaluation of the practices that lead to an improvement of quality is an achievable goal. The monitoring of microbial diversity, and especially LAB diversity, by high throughput sequencing combined with physical-chemical analysis, including aromas, will lead to new tools for monitoring the fermentation process of cider for distillation.

Acknowledgements

The research adhered to the project MoNArC (Modulation des Notes Aromatiques des Calvados) and was financially supported by the Region Normandy and the European Union Fund for Regional Development (FEDER 16P05266). Boris Misery received a thesis grant from the Normandy Region. We would like to thank Dr. Cousin Fabien and to Dr. Dalmasso Marion for their scientific assistance. We also wish to thank Jean-Paul Simon and Jean-Christophe Dechatre for the technical assistance and advices on cider for distillation follow-ups. We are grateful to the INRAE MIGALE bioinformatics facility (MIGALE, INRAE, 2020. Migale bioinformatics Facility, doi: 10.15454/1.5572390655343293E12) for providing help and/or computing and/or storage resources.

References

- Bartowsky, E.J. (2005).** *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation – moving into the molecular arena. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, 174–187.
- Bigot, C., Meile, J.-C., Remize, F., and Strub, C. (2015).** Applications of metagenomics to fermented foods. CRC Press, pp. 333–346.
- 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.* 28, 1243–1251.
- Claus, D., Lack, P. and Neu, P. (1983)** D.S.M. Catalogue of strains. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen.
- Cocolin, L., Alessandria, V., Dolci, P., Gorra, R., and Rantsiou, K. (2013).** Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. *IJFM* 167, 29–43.
- Colomer Serra, M., Funch, B., and Forster, J. (2019).** The raise of *Brettanomyces* yeast species for beer production. *COBIOT* 56, 30–35.
- Coton, E., Coton, M., Levert, D., Casaregola, S., and Sohier, D. (2006a).** Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. *IJFM* 108, 130–135.
- Coton, M., Laplace, J.M., Auffray, Y., and Coton, E. (2006b).** “Framboisé” spoilage in French ciders: *Zymomonas mobilis* implication and characterization. *LWT - Food Sci. Technol.* 39, 972–979.
- Cousin, F.J., Le Guellec, R., Chuat, V., Dalmasso, M., Laplace, J.-M., and Cretenet, M. (2019).** Multiplex PCR for rapid identification of major lactic acid bacteria genera in cider and other fermented foods. *IJFM* 291, 17–24.
- Cousin, F., Le Guellec, R., Schlusshuber, M., Dalmasso, M., Laplace, JM., and Cretenet, M. (2017).** Microorganisms in fermented apple beverages: current knowledge and future directions. *Microorganisms* 5, 39.
- Dobson, A., O’Sullivan, O., Cotter, P.D., Ross, P., and Hill, C. (2011).** High-throughput sequence-based analysis of the bacterial composition of kefir and an associated kefir grain: Microbial composition of kefir grain. *FEMS Microbiol. Lett.* 320, 56–62.
- Doyle, C.J., O’Toole, P.W., and Cotter, P.D. (2017).** Metagenome-based surveillance and diagnostic approaches to studying the microbial ecology of food production and processing environments: Metagenome-based surveillance and diagnostic approaches. *Environ. Microbiol.* 19, 4382–4391.
- Ercolini, D., Hill, P.J., and Dodd, C.E.R. (2003).** Bacterial Community Structure and Location in Stilton Cheese. *Appl. Environ. Microb.* 69, 9.
- Ercolini, D., De Filippis, F., La Storia, A., and Iacono, M. (2012).** “Remake” by High-Throughput Sequencing of the Microbiota Involved in the Production of Water Buffalo Mozzarella Cheese. *Appl. Environ. Microb.* 78, 8142–8145.

- G-Alegria, E., Lopez, I., Ruiz, J.I., Saenz, J., Fernandez, E., Zarazaga, M., Dizy, M., Torres, C., and Ruiz-Larrea, F. (2004).** High tolerance of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol. *FEMS Microbiol. Lett.* 230, 53–61.
- Gilbert, J.A., van der Lelie, D., and Zarraonaindia, I. (2013).** Microbial terroir for wine grapes. *PNAS* 111, 5–6.
- Glenn, D.M., Bassett, C.L., and Dowd, S.E. (2011).** Metagenomic approach to tracking microorganisms on apples - a case study. *Acta Hort.* 83–86.
- Guichard, H., Poupard, P., Legoahec, L., Millet, M., Bauduin, R., and Le Quéré, J.-M. (2019).** *Brettanomyces anomalus*, a double drawback for cider aroma. *LWT* 102, 214–222.
- He, G., Liu, T., Sadiq, F.A., Gu, J., and Zhang, G. (2017).** Insights into the microbial diversity and community dynamics of Chinese traditional fermented foods from using high-throughput sequencing approaches. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 18, 289–302.
- Hong, X., Chen, J., Liu, L., Wu, H., Tan, H., Xie, G., Xu, Q., Zou, H., Yu, W., Wang, L., et al. (2016).** Metagenomic sequencing reveals the relationship between microbiota composition and quality of Chinese Rice Wine. *Sci Rep* 6, 26621.
- Jung, J.Y., Lee, S.H., Kim, J.M., Park, M.S., Bae, J.-W., Hahn, Y., Madsen, E.L., and Jeon, C.O. (2011).** Metagenomic Analysis of Kimchi, a Traditional Korean Fermented Food. *Appl. Environ. Microb.* 77, 2264–2274.
- Jung, M.-J., Kim, M.-S., Yun, J.-H., Lee, J.-Y., Kim, P.S., Lee, H.-W., Ha, J.-H., Roh, S.W., and Bae, J.-W. (2018).** Viral community predicts the geographical origin of fermented vegetable foods more precisely than bacterial community. *Food Microbiol.* 76, 319–327.
- Juste, A., Thomma, B., and Lievens, B. (2008).** Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiol.* 25, 745–761.
- Kanter, J.-P., Benito, S., Brezina, S., Beisert, B., Fritsch, S., Patz, C.-D., and Rauhut, D. (2020).** The impact of hybrid yeasts on the aroma profile of cool climate Riesling wines. *Food Chem.* : X 5, 100072.
- 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, 2240–2247.
- Kemp, B., Pedneault, K., Pickering, G., Usher, K., and Willwerth, J. (2019).** Red Winemaking in cool climates. In *Red Wine Technology*, (Elsevier), pp. 341–356.
- Langille, M.G.I., Zaneveld, J., Caporaso, J.G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J.A., Clemente, J.C., Burkepile, D.E., Vega Thurber, R.L., Knight, R., et al. (2013).** Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat. Biotechnol.* 31, 814–821.

- Le Quéré, J.-M., Husson, F., Renard, C.M.G.C., and Primault, J. (2006).** French cider characterization by sensory, technological and chemical evaluations. *LWT - J. Food Sci. Technol.* 39, 1033–1044.
- Leser, T.D., Amenuvor, J.Z., Jensen, T.K., Lindecrone, R.H., Boye, M., and Moller, K. (2002).** Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Appl. Environ. Microb.* 68, 673–690.
- Leuschner, R.G.K., Bew, J., Simpson, P.J., Ross, P.R., Stanton, C., Collaborators: Adler, A., Bertin, G., Braconnier, M., Coeuret, V., et al. (2003).** Enumeration of probiotic pediococci in animal feed: interlaboratory study. *J. AOAC Int.* 86, 791–801
- Li, X., Kerrigan, J., Chai, W., and Schnabel, G. (2012).** *Botrytis caroliniana*, a new species isolated from blackberry in South Carolina. *Mycologia* 104, 650–658.
- Liu, J., Liu, M., Ye, P., Lin, F., Huang, J., Wang, H., Zhou, R., Zhang, S., Zhou, J., and Cai, L. (2020).** Characterization of major properties and aroma profile of kiwi wine co-cultured by *Saccharomyces* yeast (*S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. uvarum*) and *T. delbrueckii*. *Eur Food Res Technol* 246, 807–820.
- Lonvaud-Funel, A. et al. (1999).** Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *ANTON. LEEUW. INT. J. G.*, pp. 317–331.
- McMurdie, P.J., and Holmes, S. (2013).** phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE* 8, e61217.
- Nam, Y.-D., Yi, S.-H., and Lim, S.-I. (2012).** Bacterial diversity of cheonggukjang, a traditional Korean fermented food, analyzed by barcoded pyrosequencing. *Food Control* 8.
- Nilsson, R.H., Larsson, K.-H., Taylor, A.F.S., Bengtsson-Palme, J., Jeppesen, T.S., Schigel, D., Kennedy, P., Picard, K., Glöckner, F.O., Tedersoo, L., et al. (2019).** The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Res* 47, D259–D264.
- Park, E.-J., Chun, J., Cha, C.-J., Park, W.-S., Jeon, C.O., and Bae, J.-W. (2012).** Bacterial community analysis during fermentation of ten representative kinds of kimchi with barcoded pyrosequencing. *Food Microbiol.* 30, 197–204.
- Pinto, A.C. et al. (2015).** Wine fermentation microbiome: a landscape from different Portuguese wine appellations. *Front Microbiol* 6, 13.
- Polka, J., Rebecchi, A., Pisacane, V., Morelli, L., and Puglisi, E. (2015).** Bacterial diversity in typical Italian salami at different ripening stages as revealed by high-throughput sequencing of 16S rRNA amplicons. *Food Microbiol.* 46, 342–356.
- Portillo, M. del C., and Mas, A. (2016).** Analysis of microbial diversity and dynamics during wine fermentation of Grenache grape variety by high-throughput barcoding sequencing. *LWT - J. Food Sci. Technol.* 72, 317–321.
- Quigley, L., O’Sullivan, O., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., and Cotter, P.D. (2012).** High-Throughput Sequencing for Detection of Subpopulations of Bacteria Not Previously Associated with Artisanal Cheeses. *Appl. Environ. Microb.* 78, 5717–5723.

- Salih, A.G., Quérè, J.-M.L., Drilleau, J.-F., and Fernandez, J.M. (1990).** Lactic acid bacteria and malolactic fermentation in the manufacture of spanish cider. *J. I. Brewing* 96, 369–372.
- Sánchez, A., Rodríguez, R., Coton, M., Coton, E., Herrero, M., García, L.A., and Díaz, M. (2010).** Population dynamics of lactic acid bacteria during spontaneous malolactic fermentation in industrial cider. *Food Res Int* 43, 2101–2107.
- Sauvageot, N., Gouffi, K., Laplace, J.-M., and Auffray, Y. (2000).** Glycerol metabolism in *Lactobacillus collinoides*: production of 3-hydroxypropionaldehyde, a precursor of acrolein. *IJFM* 55, 167–170.
- Setati, M.E., Jacobson, D., and Bauer, F.F. (2015).** Sequence-based analysis of the *vitis vinifera* l. cv cabernet sauvignon grape must mycobiome in three south african vineyards employing distinct agronomic systems. *FRONT MICROBIOL* 6.
- Valles, B., Bedrinana, R., Tascon, N., Simon, A., and Madrera, R. (2007).** Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. *Food Microbiol.* 24, 25–31.
- Vasileiadis, S., Puglisi, E., Arena, M., Cappa, F., Cocconcelli, P.S., and Trevisan, M. (2012).** Soil bacterial diversity screening using single 16s rna gene v regions coupled with multi-million read generating sequencing technologies. *PLoS ONE* 7, 11.
- Vigentini, I., Romano, A., Compagno, C., Merico, A., Molinari, F., Tirelli, A., Foschino, R., and Volonterio, G. (2008).** Physiological and oenological traits of different strains under wine-model conditions. *FEMS Yeast Res.* 8, 1087–1096.
- Wecker, M.S., and Zall, R.R. (1987).** Production of acetaldehyde by *Zymomonas mobilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2815–2820.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., and Lane, D.J. (1991).** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol. Res.* 173, 697–703.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. (1990).** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. In *PCR Protocols*, (Elsevier), pp. 315–322.
- Yashiro, E., Spear, R.N., and McManus, P.S. (2011).** Culture-dependent and culture-independent assessment of bacteria in the apple phyllosphere. *J. Appl. Microbiol.* 110, 1284–1296.
- Yun, J., Zhao, F., Zhang, W., Yan, H., Zhao, F., and Ai, D. (2019).** Monitoring the microbial community succession and diversity of Liangzhou fumigated vinegar during solid-state fermentation with next-generation sequencing. *Ann. Microbiol.*
- Zhang, J., Wang, X., Huo, D., Li, W., Hu, Q., Xu, C., Liu, S., and Li, C. (2016).** Metagenomic approach reveals microbial diversity and predictive microbial metabolic pathways in Yucha, a traditional Li fermented food. *Sci. Rep.* 6, 32524.
- Zhao, F., Zhou, G., Ye, K., Wang, S., Xu, X., and Li, C. (2015).** Microbial changes in vacuum-packed chilled pork during storage. *Meat Sci.* 100, 145–149.

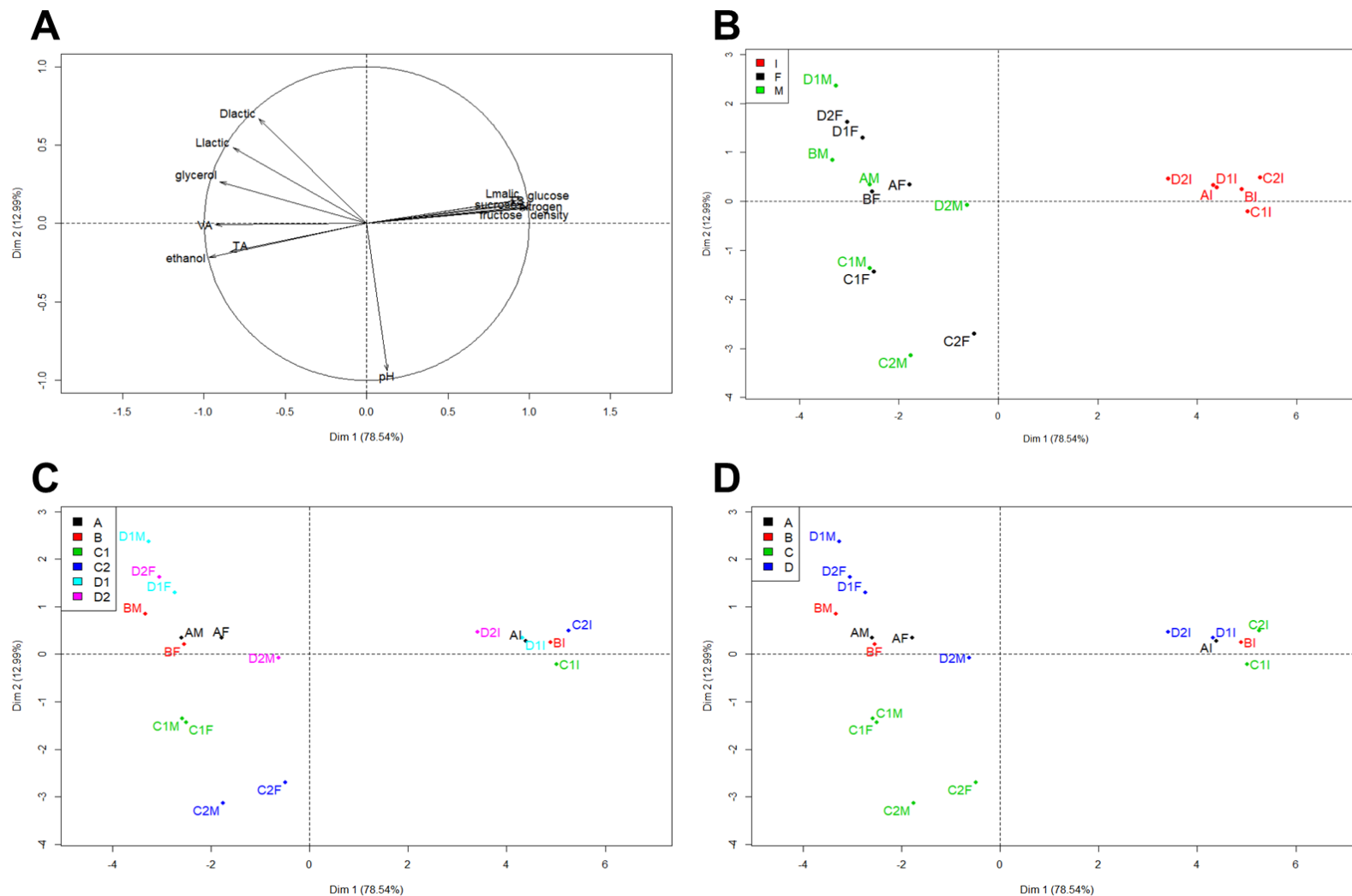


Figure A1. Principal component analysis of physicochemical parameters of ciders for distillation (A). The distribution of cider samples was displayed according to (B) fermentation, (C) tanks and (D) producers.

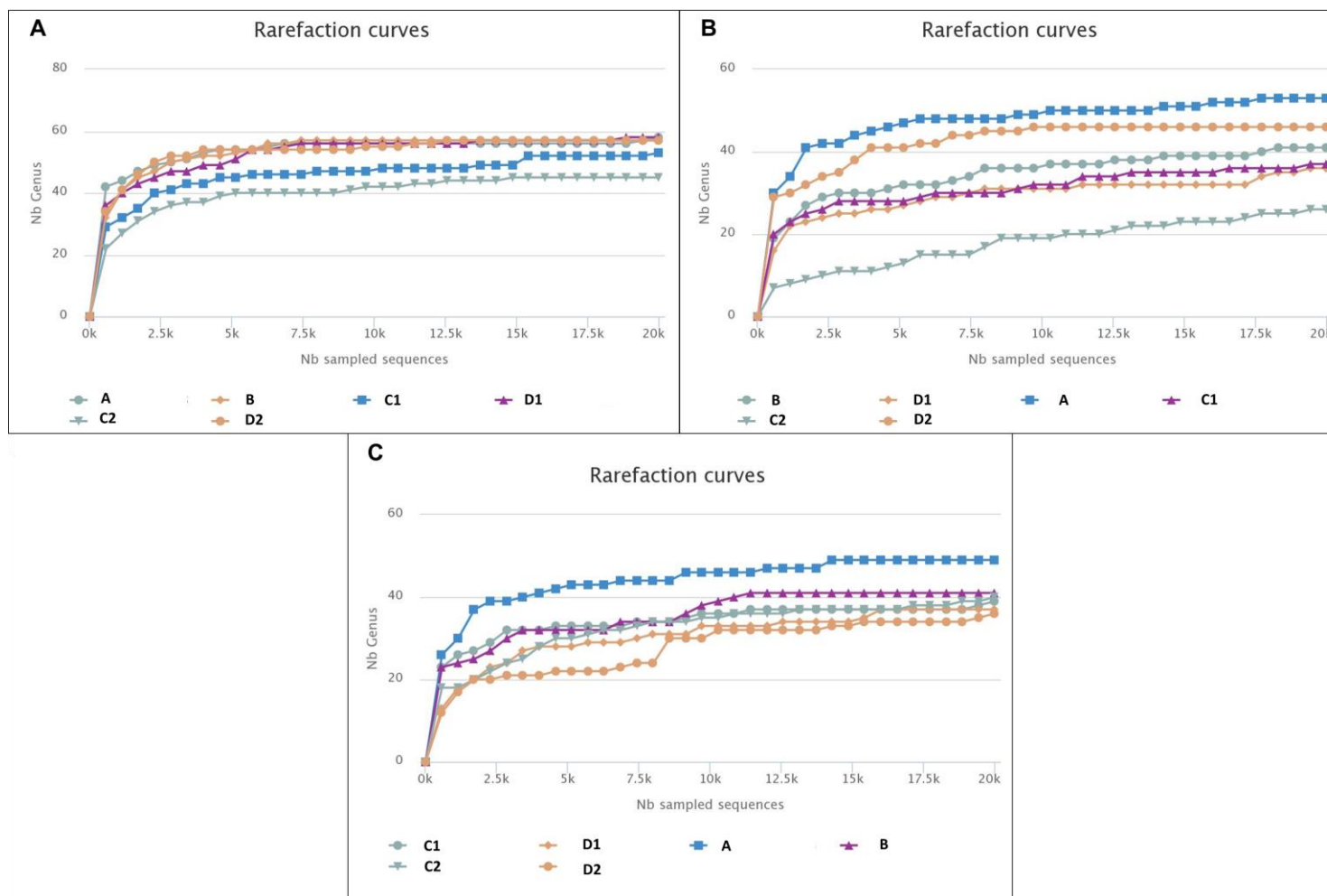


Figure A2. Rarefaction curves according to A) Fermentation initiation (I), B) end of alcoholic fermentation (F), C) maturation period (M).

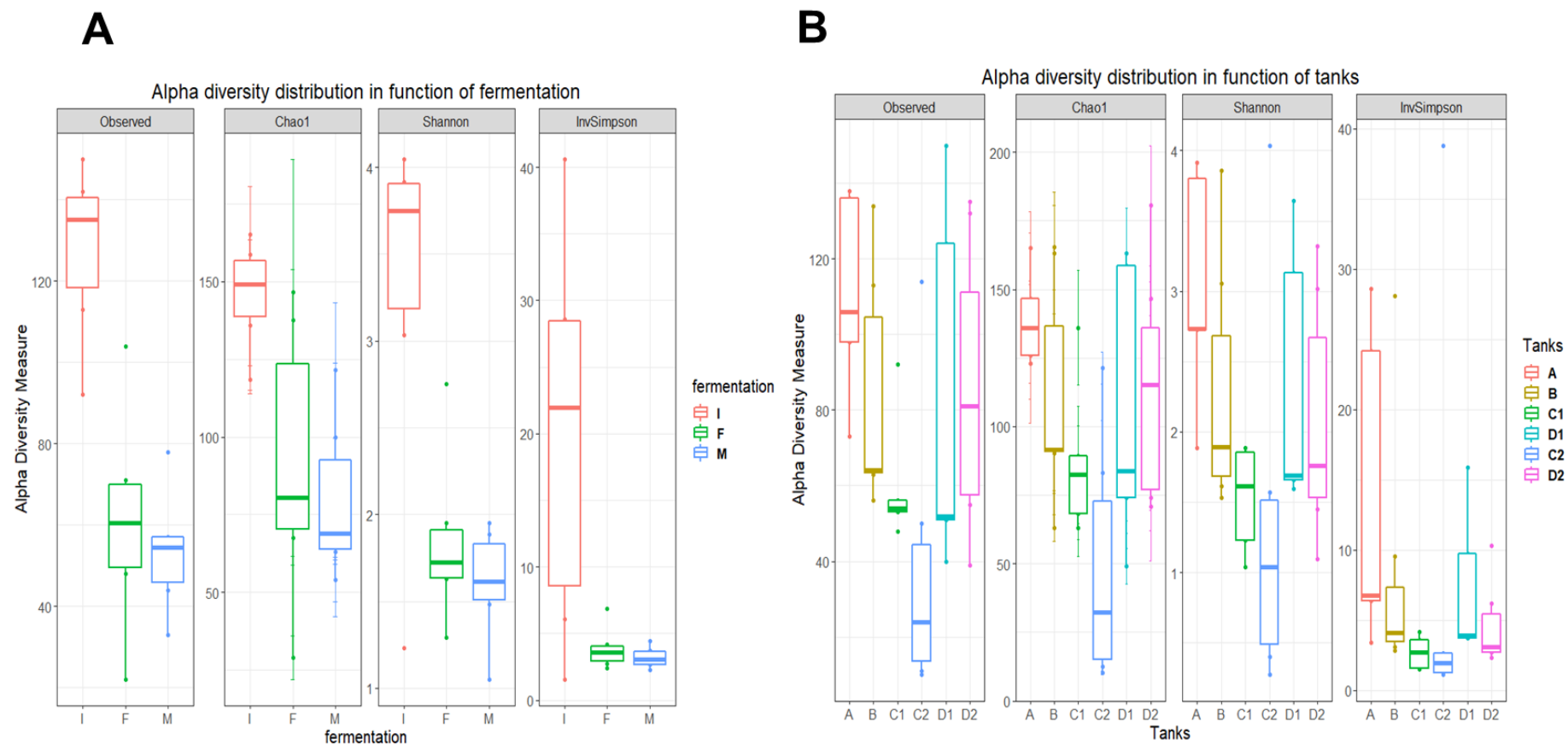


Figure A.3. Bacterial alpha diversity measurement according to A) fermentation steps (bacteria) and B) tanks (I: fermentation initiation; F: end of alcoholic fermentation; M: maturation period).

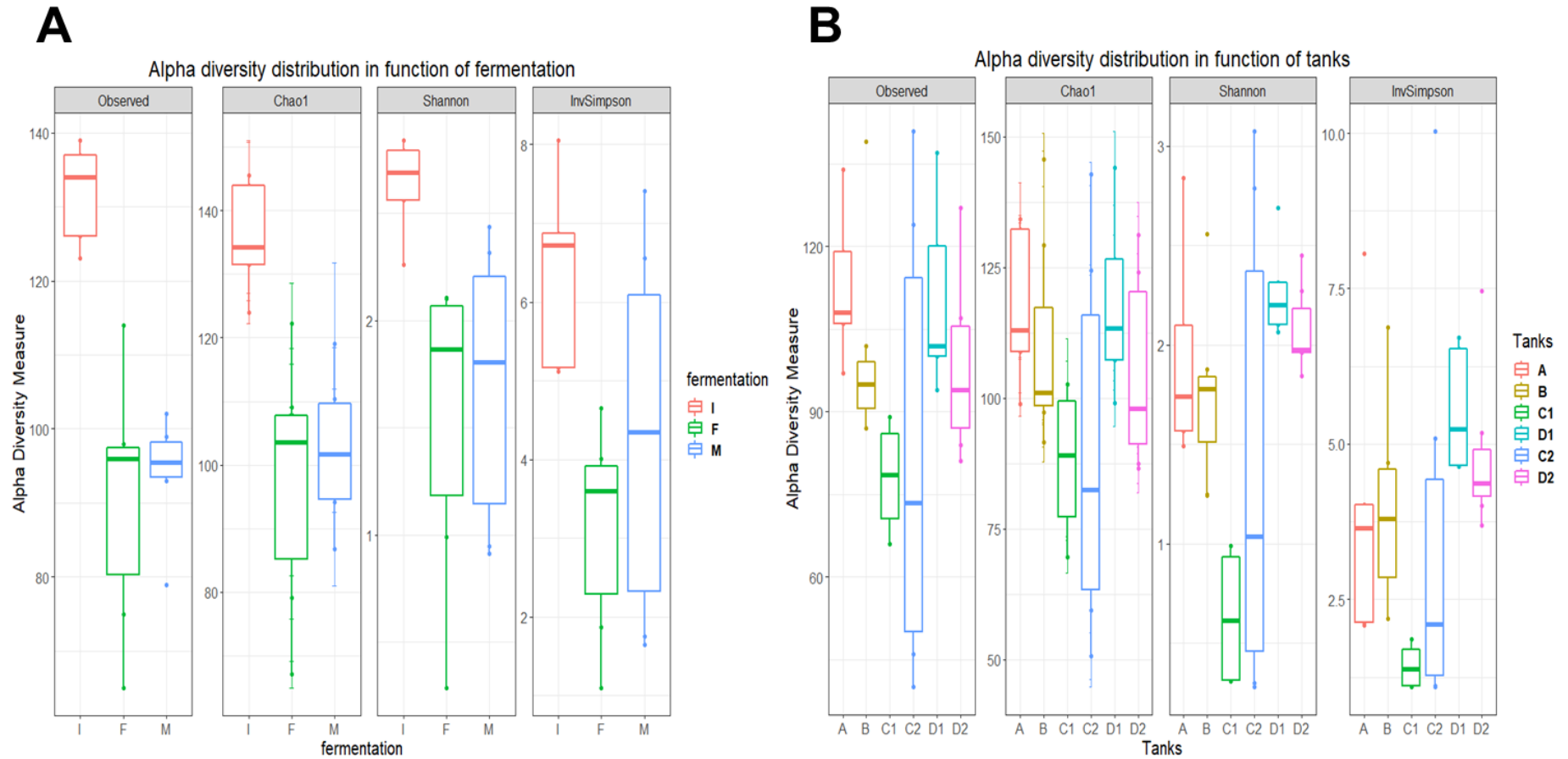


Figure A.4. Fungal alpha diversity measurement according to A) fermentation steps and B) tanks (I: fermentation initiation; F: end of alcoholic fermentation; M: maturation period).

Chapitre II

Liens entre les écosystèmes microbiens et la composition aromatique des cidres de distillation et du calvados.

L'élaboration du calvados relève d'un processus complexe impliquant différents facteurs dont la matière première, les techniques de distillation ou encore les processus de vieillissement. Bien que les pratiques des producteurs puissent influencer le bouquet aromatique des calvados, la composition aromatique est avant tout dépendante de l'activité des écosystèmes microbiens présents lors de la fermentation du cidre. Ainsi, suivre l'évolution de la composition aromatique en lien avec la composition microbienne constitue un préalable indispensable en vue de la maîtrise du bouquet aromatique du calvados.

Le chapitre II est une étude de la composition des communautés microbiennes en lien avec la composition aromatique des cidres de distillation lors du processus de fermentation. Les cidres ont subi par la suite une micro-distillation dont les composés volatiles ont été analysés. Quatre nouvelles cuves de cidres de distillation ont été intégrées à l'étude. Ces cuves ont été suivies l'année suivante par rapport aux cuves du chapitre I. Aux cuves A, B, C1, C2, D1 et D2 s'ajoutent les cuves C3 (provenant du même producteur C), E1, E2 et F (autres producteurs cidricoles). Les microbiotes bactériens et fongiques ainsi que les composés volatils ont été analysés lors de la fermentation du cidre de distillation par séquençage Illumina MiSeq combiné à la chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse (GC-MS), à la détection par ionisation de flamme (GC-FID) et à la chromatographie liquide haute performance/UV-DAD (HPLC-UV-DAD). Ces trois méthodes analytiques ont également été utilisées afin de décrire la composition aromatique des eaux-de-vie distillées à l'issue du processus de fermentation.

Parmi les dix cuves analysées, trois groupes de dynamiques et compositions microbiennes, directement liées aux producteurs, ont été observés conduisant à des compositions aromatiques différentes. Lors de la fermentation, la flore lactique, principalement *Lactobacillus* et *Oenococcus*, domine dans les cidres de distillation des cuves A/B/D1/D2 tandis que dans les cuves E2 et F le genre *Serratia* est majoritairement identifié. Les cuves E1/C1/C2/C3 présentent des proportions quasi identiques en flore lactique et en *Serratia*. De plus, les résultats montrent que la transformation malolactique se produit en même temps que la fermentation alcoolique, sauf dans les cuves qui renferment une faible proportion de bactéries lactiques où la TML n'a pas lieu comme en attestent les dosages des acides malique et lactique. Ces résultats sont en accord avec ceux présentés dans le chapitre I

En conséquence, la composition aromatique globale diffère entre les cidres des différents producteurs. Au sein de la communauté fongique les différences entre les producteurs

se limitent à une diversité d'espèces au sein du genre *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*, *S. uvarum* et *S. cariocanus*) selon les cuves.

Au niveau aromatique, les cidres à distiller des producteurs B et D ont des concentrations en hexanol-1, éthyl-2-méthylbutyrate et en lactate d'éthyle plus importantes que celles trouvées dans les autres cuves tandis que le cidre du producteur F est caractérisé par de fortes concentrations en 2-méthylbutanol-1. Les cuves E1, F, A et D2 se distinguent par une concentration plus élevée en éthylguaiacol que celle des autres cuves. De fortes concentrations en phénol-2-éthanol ont été retrouvées dans les cuves F et E2. Enfin, lors de la maturation seule la concentration en éthyl caproate tend à diminuer.

Les distillats obtenus à partir de ces cidres présentent des profils aromatiques intéressants qui se répartissent en plusieurs groupes selon leur bouquet aromatique : les cuves A/B/D1/D2, E1/C1/C2/C3, E2 et F. Les cuves A/B/D1/D2 présentent une composition aromatique complexe, comprenant des esters, des alcools, des phénols volatils mais aussi de l'acroléine. Les cuves E1/C1/C2/C3 sont caractérisées par de fortes concentrations en aldéhydes (acétaldéhyde et acétal), composés jugés indésirables dans le calvados. Le laurate d'isoamyle et le caproate d'éthyle sont les deux composés permettant de distinguer le calvados du producteur E2. Enfin, le distillat du producteur F présente lui aussi une large gamme de composés aromatiques, principalement des esters. Les résultats montrent que les groupes de cuves distingués par métagénomique sont les mêmes que ceux étudiés dans la composition volatile des micro-distillats.

Dans cette étude, plusieurs relations entre le microbiote et la composition aromatique des cidres de distillation ont pu être établies. La flore lactique (*Lactobacillus sp.* et *Oenococcus oeni*) est positivement corrélée au lactate d'éthyle et à l'éthyl-2-méthylbutyrate. En outre, la présence d'*Oenococcus oeni* est également corrélée à une douzaine de composés aromatiques. Au niveau fongique, peu de relations entre la composition aromatique et les espèces de *Saccharomyces* ont pu être mises en évidence. Seul un lien entre l'acétate d'hexyle et *Saccharomyces cerevisiae* a pu être établi. Cependant, des interactions entre les genres *Dekkera sp.* et les phénols volatils mais aussi l'acidité totale ont été observées. De plus, l'acétate d'hexyle mais aussi l'isobutyrate d'éthyle sont corrélés positivement avec la présence du genre *Hanseniaspora*.

Les concentrations ainsi que la diversité des composés aromatiques sont influencées par les interactions métaboliques microbiennes. L'interaction entre la flore lactique et les

levures favorise la production d'une plus large gamme d'arômes pouvant être potentiellement intéressants. Ainsi, la présence de LAB en grande quantité au sein de cuves qui se distinguent par leur complexité aromatique suggère que la transformation malolactique joue un rôle important dans la qualité du calvados. Bien que le lactate d'éthyle soit considéré comme indésirable dans les cidres par la filière cidricole, sa présence en forte concentration pourrait être utilisée comme marqueur de la TML et d'une complexité aromatique plus importante dans les cidres de distillation. Ces travaux ouvrent la voie à des études d'interactions entre le microbiote et la composition aromatique lors de l'élaboration du cidre de distillation.

Impact of maturation and contribution of microbial ecosystem on aromatic compounds of cider for distillation and calvados.

B. MISERY^a, P. LEGENDRE^b, V. BOUCHART^b, H. GUICHARD^c, A. SESBOUE^d JM. LAPLACE^a and M. CRETENET^a

^a Normandie Univ, UNICAEN, UNIROUEN, ABTE ,14000 Caen, France

^b LABÉO Frank Duncombe, 1 Route de Rosel, 14053 Caen Cedex 4, France

^c Institut Français des Produits Cidricoles (IFPC), Domaine de la Motte 35653 Le Rheu, France

^d Normandie Univ., UNICAEN, LMNO, UMR CNRS 6139, 14000 Caen, France

Abstract

Calvados is an apple brandy from Normandy made by distilling cider. In order to better control the calvados quality, the aim of this study was to correlate microbial and physical-chemical interactions during the fermentation process with aromatic profile of ciders intended to be distilled. Bacterial and fungal diversities and volatile organic compounds were investigated from ten ciders for distillation using Illumina MiSeq sequencing technology, gas chromatography/mass spectrometry (GC–MS), -flame-ionization detection (GC-FID) and high performance liquid chromatography/UV-DAD (HPLC-UV-DAD). The main physical chemical parameters of fermentation (sugars, glycerol, acids, pH, total and volatile acidity) were also monitored. The study resulted in the observation of three microbial dynamics and composition directly linked to the producers and leading to different aromatic compositions. *Lactobacillus* and *Oenococcus*, were found to be the main genera during cider fermentation for the tanks A/B/D1/D2 while the other tanks were dominated by *Serratia sp.*. Malolactic fermentation occurred concomitantly with the alcoholic fermentation, except for tanks with low proportions of lactic acid bacteria where it did not take place. The relationships between microbiome and flavour dynamics were constructed by the Cytoscape software, which identified interactions between bacterial and fungal clusters and aromatic compounds. *Lactobacillus sp.* was positively correlated with the ethyl lactate, while *Oenococcus sp.* was positively correlated with twelve aromatic compounds. *Dekkera sp.* was also positively correlated to high level of phenol volatiles and the volatile acidity. This study sets the path for a better understanding of the interactions between microbial ecosystem and aromatic composition in cider fermentation.

Keywords: Cider; Calvados; Interactions; Aroma; Yeasts; *Saccharomyces*; *Dekkera*; *Oenococcus*; *Lactobacillus*

1. Introduction

Calvados is an apple brandy from Normandy made from apple fermentation that does not undergo any human intervention. Brandies are mainly produced by the distillation of alcoholic beverages such as wine, cider or fermented malt. For example, the Cognac wine spirit is characterised by a high aromatic complexity, combining esters, aldehydes, norisoprenoids, and terpenes (Awad *et al.*, 2017). Whisky is one of the most popular spirit made by fermentation of malt and has been widely studied for its aromatic composition (Wiśniewska *et al.*, 2015). In calvados brandy, the aromatic compounds most frequently detected are esters, alcohols and aldehydes (Guichard *et al.*, 2003). Analysis of volatile organic compounds of four brandies produced in France (Armagnac, Cognac, Calvados, and Mirabelle) highlighted a specific aromatic pattern for each of them (Ledauphin *et al.*, 2010). The elaboration of calvados is a complex process involving different factors including quality of raw material, distillation and aging processes. Few studies have been performed on the impact of the maturation period on the chemical composition of cider distillates. The study of Madrera *et al.*, (2008) showed that the cider maturation leads to an increase of ethyl esters levels and others aromas such as 2-butanol, 2-propen-1-ol and 4-ethylguaiacol but the indigenous flora was not studied in parallel. To date, few studies were based on the link between microbial populations and the evolution of aroma during the fermentation process of cider for distillation and were limited to the study of few strains or predefined mixture (Coton *et al.*, 2006; Guichard *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2006). Recent studies based on metagenomics approaches coupled with physical-chemical and aroma analyses can help decipher the links between aroma and microorganism activities.

The two main processes involved in cider are the alcoholic and malolactic fermentation leading to the formation of alcohol, esters, acids and phenolic content (Álvarez-Pérez *et al.*, 2012). A better knowledge of the temporal evolution of microbial communities during fermentation and their impact on the evolution of aroma could improve practices of the producers to ensure a stable quality of end-products. The study of De Roos *et al.* (2020) and Guichard *et al.* (2019) showed that some functional properties were closely correlated with the presence of *Brettanomyces sp.* in beer and cider, leading to aromatic and economic repercussions. The impact of the microbial composition on flavour compounds of rice wine was studied by Ly *et al.* (2018) combining high throughput sequencing with aromatic analyses. The presence of *Weissella*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* genera was correlated with most of flavour compounds detected.

In chapter I, we showed that the monitoring of the microbial diversity via high throughput sequencing combined with physical-chemical analysis led respectively to 40 and 48 bacterial and fungal genera in cider for distillation that determine a specific microbial ecosystem composition to producers. Here, we included four new tanks of ciders for distillation to obtain a more complete study of the microbial composition and correlate them with analyses of the aromatic compounds of the ten ciders. The objective of this study was to investigate the link between the microbial composition and the evolution of aromatic compounds of ciders for distillation from different producers and the impact on the quality of the end-product distillates. The aim of this approach is to give some guidance on fermentation of cider for distillation to conduct the aromatic composition of calvados.

2. Material and methods

2.1 Monitoring of the fermentation of ciders

A total of ten tanks from six producers (A, B, C, D, E, F) located in Normandy (France) were monitored (Table 1). Six tanks (A, B, C1, C2, D1, D2) were sampled weekly from October 2017 to June 2018, and four tanks (C3, E1, E2, F) were sampled weekly from October 2018 to June 2019. A blending of different apple varieties was used for the elaboration of these ciders. All fermentations were carried out by the indigenous microflora, without using SO₂ or antimicrobial agents. Samples were taken from apples pressing and tank filling (I for fermentation Initiation) until a maximum of three months after the end of the alcoholic fermentation process (F). A final sample was collected at the end of the maturation period (M), corresponding to the time at which producers decided to distill the ciders. For each sample, physical-chemical, aroma analyses and high throughput sequencing (16S and ITS1) were performed.

Table 1. Duration, average outside temperature, volume data and location of cider tanks A, B, C1, C2, D1, D2, E1, E2 and F.

Tanks	Fermentation Initiation (I)	Alcoholic Fermentation (F)	Maturation period (M)	Temperature I	Temperature F	Temperature M	Tanks volume (hL)	Location
				(°C)	(°C)	(°C)		
A	25/10/2017	8 weeks	11 weeks	13.7	6.3	16.8	7500	Pays d'Auge. Calvados
B	26/10/2017	6 weeks	14 weeks	13.7	6.3	16.8	1300	Pays d'Auge. Orne
C1	23/10/2017	9 weeks	6 weeks	13.4	7.2	15.3	60	Cotentin. Manche
C2	08/11/2017	6 weeks	7 weeks	13.4	7.2	15.3	60	Cotentin. Manche
C3	19/11/2018	16 weeks	14 weeks	12.57	7.81	11.52	60	Cotentin. Manche
D1	19/10/2017	6 weeks	11 weeks	13.8	7.1	18.2	1200	Sud Manche
D2	09/11/2017	7 weeks	22 weeks	13.8	7.1	18.2	1200	Sud Manche
E1	05/10/2018	11 weeks	12 weeks	12.91	7.51	7.58	60	Pays d'Auge. Calvados
E2	23/11/2018	12 weeks	6 weeks	12.91	7.51	8.72	57	Pays d'Auge. Calvados
F	16/11/2018	22 weeks	2 weeks	12.89	8.94	9.76	100	Bessin. Calvados

2.2. Physical-chemical analyses

Analyses of sugars and polyalcohols (fructose, glucose, saccharose, glycerol, and sorbitol) in ciders were performed by means of high performance liquid chromatography (HPLC Agilent 1100) using quaternary pump equipped with a Phenomenex Luna NH2 column. The column temperature was set to 28°C and the mobile phase was a mix of acetonitrile/ultra-pure water (85/15, v/v) at a flow rate of 3 mL.min⁻¹. The detection and quantification stages were performed by refractive index detector. Organics acids (D- and L-Lactic acid and L-malic acid) were quantified using enzymatic kits (Megazyme). Total and volatile acidity were determined by acid/base titration with a standard solution of NaOH, after steam distillation for the volatile acidity (references OIV-MA-AS313-01 and OIV-MA-AS313-02). Nitrogen was quantified using the Kjeldahl method (reference OIV-MA-AS323-02A).

2.3. Aromatic analyses

A total of 67 volatile compounds of ciders and distillates of the ciders after the maturation (M) were analysed by three methods (Table A1). The first method was GC-MS after liquid/liquid extraction of the distilled solutions obtained after laboratory distillation. The second method was GC-FID with direct injection of ciders. The ciders were added with ethanol absolute to reach an alcoholic strength of 7% vol. The third method was direct injection on HPLC UV-DAD. The laboratory distillation was conducted according to the collection of international method for spirituous beverages (OIV-MA-BS-02) with a test sample of 100 mL. All these analyses were performed by an accredited laboratory (Labéo) with all standards for the quantification and identification of volatile compounds. Due to a large number of identified aromas in cider for distillation, only those with a production above their detection threshold and organoleptic interest were treated. The statistical analyses carried out on physical-chemical and aromatic parameters were calculated using the R software (3.5.4). The differences of these parameters between the cider producers and the variables at F and M were analysed using the Scheirer–Ray–Hare test. The metadata collected at I, F and M for each tank were subjected to principal component analyses (PCA) using the R software (3.5.4). In the same way, the aromatic data of the distillates of the ciders of all producers at M were subjected to principal component analyses (PCA) using the R software (3.5.4).

2.3.1. Gas-chromatography mass spectrometry analyses (GC-MS)

The GC-MS analysis was carried out on an HP 6890 GC System (Agilent Technologies) coupled with a split injector and a mass detector HP 5973. Separation was performed using

Rxi_XLB capillary column (30 m x 0.25 mm, film thickness 0.25 μ M, Restek) and helium as carrier gas at a constant flow of 1.0 mL/min. The injector was heated at 280°C with a split value of 20:1. The GC oven was programmed as follow: initial at 40°C for 5 min, raised at 10 °C.min⁻¹ to 300 °C maintained 5 min. Mass spectrometer operated in electron ionisation (EI) at 70 eV with ion source temperature at 280 °C and quadrupole temperature at 150 °C. For quantification mass spectra were acquired in Selected Ion Monitoring (SIM) mode. Volatile compounds identification and quantification were carried out using commercial standard. Calibration was performed after extraction of standard range synthetic solutions containing higher alcohols to simulate a sample and spiked with each commercial standard.

2.3.2. Gas chromatography-flame-ionization detection (GC-FID)

The GC-FID analysis was carried out on an 7890B GC System (Agilent Technologies) coupled with a split injector and a flame ionization detector. Separation was performed using CPWAX57 CB capillary column (50m x 0.25 mm, 0.20 μ m film thickness, Agilent Technologies) and nitrogen as carrier gas at a constant flow of 1.0 mL/min. The injector was heated at 220°C with a split value of 25 :1. The GC oven was programmed as follow: initial at 35 °C for 5 min, raised at 3 °C.min⁻¹ to 110 °C maintained 2 min then 15°C.min⁻¹ to 200 °C maintained 12 min. Detector was heated at 250 °C. Compounds identification was carried out using commercial standard retention times. Quantitative determination was performed using linear calibration curves with internal standard (2-methyl-4-pentanol) added before injection.

2.3.3. Analysis of volatile phenols

The volatiles phenols were quantified by direct injection using Agilent 1100 HPLC system equipped with UV-DAD. Prior to analysis the samples were filtered through 0,45 μ m PVDF filter (Millipore) and diluted twice. 50 μ L were injected into a RAPTOR ARC-18 column (5 μ m, 100 x 3.0mm, Restek) kept at 40°C. The separation was performed by gradient elution using a mobile phase water/acetonitrile acidified with 0,1% phosphoric acid from 20 % to 90 % of acidified acetonitrile at the flow rate of 0.4 mL.min⁻¹. The acidified acetonitrile gradient was programmed as follow: 30% at 4.25 min, 50% at 8.5 min and 90% at 12.75 min maintained 2.25 min. Identification of the compounds were based on the retention time for each peak and their UV spectra in comparison with those of 4-Ethyl catechol (Alfa Aesar), 4-Ethylphenol, 4-Ethylguaiacol, 4-Vinylphenol, 4-Vinylguaiacol (Sigma-Aldrich) standards. Quantitative determination was performed using the calibration curves ranging from 0.05 to 5.00 mg/L.

2.4. 16S and ITS1 rDNA sequencing and bioinformatics analysis

For each sample, 50 mL of cider were centrifuged at 4700 rpm, 20°C and stored at -80°C before DNA extraction. Total DNA was extracted from the cider samples and purified using the NucleoSpin soil kit (Macherey Nagel, France), according to the manufacturer's instructions. DNA concentration and quality were determined with 0.8% agarose gel electrophoresis and quantified using the Picogreen assay (Fisher Scientific, France). The high-throughput sequencing of the V1-V3 hypervariable region of the bacterial 16S rRNA gene was performed using Eurofins Genomics on an Illumina MiSeq platform according to the manufacturer's instructions. Amplicons were generated using a two-step PCR protocol. Briefly, the V1-V3 regions were PCR-amplified using template specific primers (V1V3 -F, AGAGTTTGATCATGGCTCAG, (Weisburg *et al.*, 1991); V1V3-R, GTATTACCGCGGCTGCTG, (Leser *et al.*, 2002), containing a universal overhang. The sequencing primers used for fungal were ITS1-F, GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG ; ITS1-R, GCTGCGTTCTTCATCGATGC, (White *et al.*, 1990). The amplicons were cleaned up and set up for the PCR index, with specific primers directed to universal overhangs. Final amplicon libraries were cleaned up, quantified and pooled equimolar. The resulting final library pool was quantified and sequenced using the v3 chemistry (2x300 bp paired-end reads). Paired-end reads obtained from MiSeq sequencing were analysed using the Galaxy supported pipeline named Find Rapidly Operational Taxonomic Units (OTUs) with Galaxy Solution (FROGS) (Escudié *et al.*, 2018), using the dedicated guidelines for 16S and ITS data. A taxonomic assignment was performed using Silva132 16S pintail 100 (bacteria, <https://www.arb-silva.de>) and ITS_UNITE_Fungi_8.0 (yeasts/molds) (Nilsson *et al.*, 2019). The OTUs tables were used for bioinformatical analyses. Subsequent analyses and data visualization were then performed using the R packages Phyloseq (McMurdie *et al.*, 2013), DeSeq2 (Love *et al.*, 2014) and Ggplot2 (Gómez-Rubio *et al.*, 2017). The distribution of the sampling points (calculated from the OTU contingency table) was displayed in MDS/PCoA ordination by R software (3.5.4) to compare global microbial community structures during the fermentation process and between the producers.

2.5. Microbial and aromas interaction networks

The CoNet application implemented in the Cytoscape software (3.8.1) was used to highlight correlations between microbial OTUs, physical-chemical and aromatic parameters (Faust *et al.*, 2012). Correlations were computed using Spearman correlation tests ($r > 0.6$). Strength of the correlations were tested by 1,000 bootstrap and the Benjamini Hochberg multi-test correction

(set at $p < 0.05$). Only 25 bacterial and 32 yeast species were analysed due to limited value observed in the OTUs table (>10000 total of the sequences observed).

3. Results

3.1. General features of the High Throughput Sequencing (ITS/V1-V3)

The high-throughput sequencing of the V1-V3 hypervariable region of the bacterial 16S rRNA gene led to a total of 733,8141 sequences (average length) after filtering. The analysis of the ten ciders presents a final OTU table containing 141 bacterial OTUs, compared to 196 bacterial OTUs observed with six tanks. By adding four new tanks, the number of bacterial and yeast genera analysed was similar to the previous work. The core bacteriome analysis showed a prevalence of Proteobacteria (58% of the total bacteriome), followed by Firmicutes (41%). The Proteobacteria were mainly found at the beginning of the fermentation (I), represented by the Enterobacteriales (42%), the Pseudomonadales (3%), the Sphingomonadales (6%) and the Actebacteriales (3%). Enterobacteriales combine mainly *Serratia sp.* and Pseudomonadales unite mostly *Pseudomonas sp.*. The Sphingomonadales are represented by *Zymomonas sp.* and Acetobacteriales by *Acetobacter sp.*, *Gluconobacter sp.* and *Komataegaeibacter sp.*. The Firmicutes were divided into two genera: *Lactobacillus sp.* (25%) with two species (*L. collinoides* and *L. mali*) and *Oenococcus sp.* (16%) and their presence was higher at F and M. Among LAB, *Leuconostoc* species represented 0.2% of the total bacteriome in these ciders. The high-throughput sequencing of the ITS1 hypervariable region came to a total of 1,804,771 sequences (average length) after filtering. The final OTU table contained 98 fungal OTUs. The global yeasts composition in ciders revealed three main classes, including Saccharomycetes (99%), Lecanoromycetes (1%). Saccharomycetes was the dominant class comprising *Saccharomyces sp.* (69%), *Dekkera/Brettanomyces sp.* (24%), *Hanseniaspora sp.* (4%), and *Kregervanrija sp.* (0.5%).

3.2. Microbial dynamics in ciders for distillation

A microbial profile comparison was performed by MDS/PCoA according to the fermentation steps (Figure 1). The fungal and bacterial composition was significantly different at I, F and M for all tanks. In the MDS, ellipses representing fermentation key points F and M merged. Microbial compositions of all ten tanks at I, F and M were displayed in Figure 2 and Figure 3. The fermentation initiation (I) was characterized by the abundance of *Pseudomonas*, *Serratia*, *Tatumella* and acetic acid bacteria (AAB) such as *Gluconobacter* and *Acetobacter* (Figure 2).

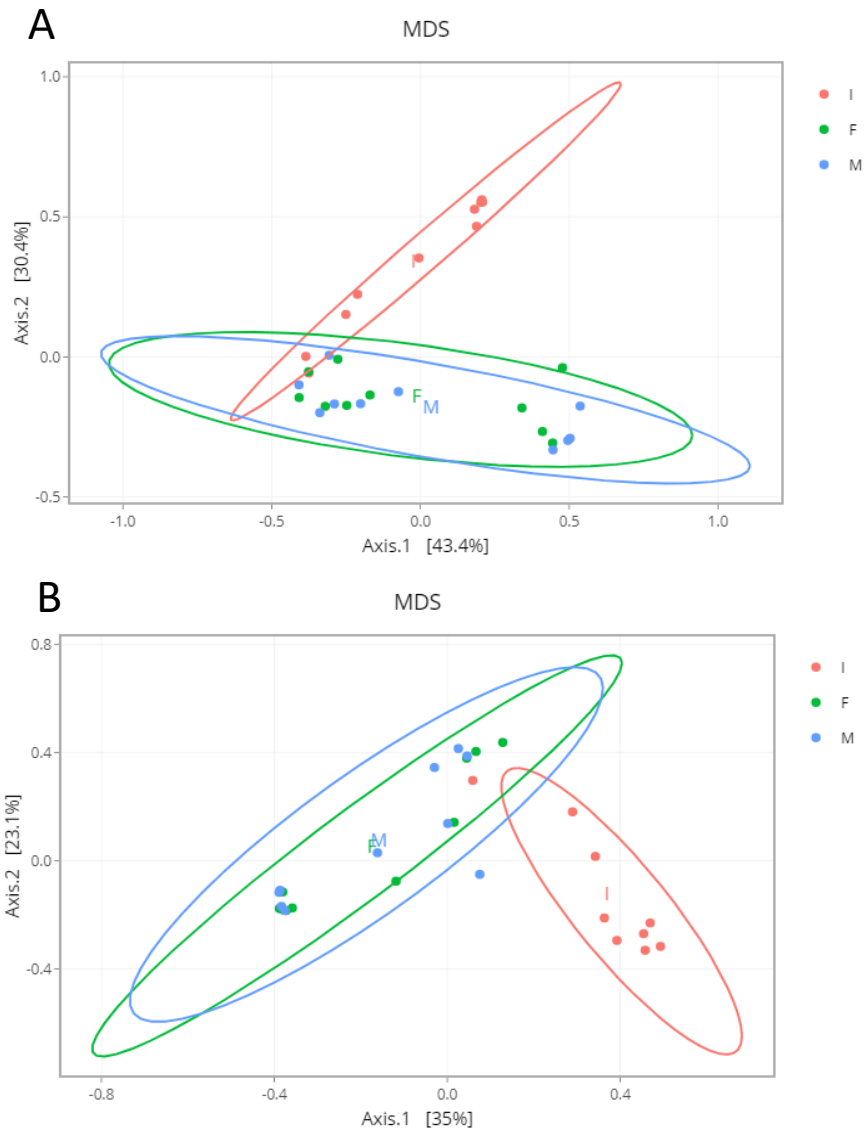


Figure 1. MDS/PCoA representing A) bacterial and B) fungal OTUS distribution according to fermentation steps.

The R packages DeSeq2 was used to underline significant fold change of fungal or bacterial taxa between tanks at I, F and M. All differences of microbial proportions between tanks quoted in this paragraph correspond to fold change > 2 with a pvalue < 0.001 . At I, the tanks C1, C3 and F were enriched with *Serratia sp.*, while the other tanks were enriched with *Pseudomonas sp.*. The yeast composition of the tanks at I was highly diverse. The tanks A, B, D1 and F were enriched with *Hanseniaspora sp.*, while *Saccharomyces sp.* dominated the yeast composition of tanks C1 and D2 (Figure 3). The tanks E1 and E2 were enriched with *Metschnikowia sp.* and C2/ C3 tanks were characterized by a higher diversity of unknown yeast genus.

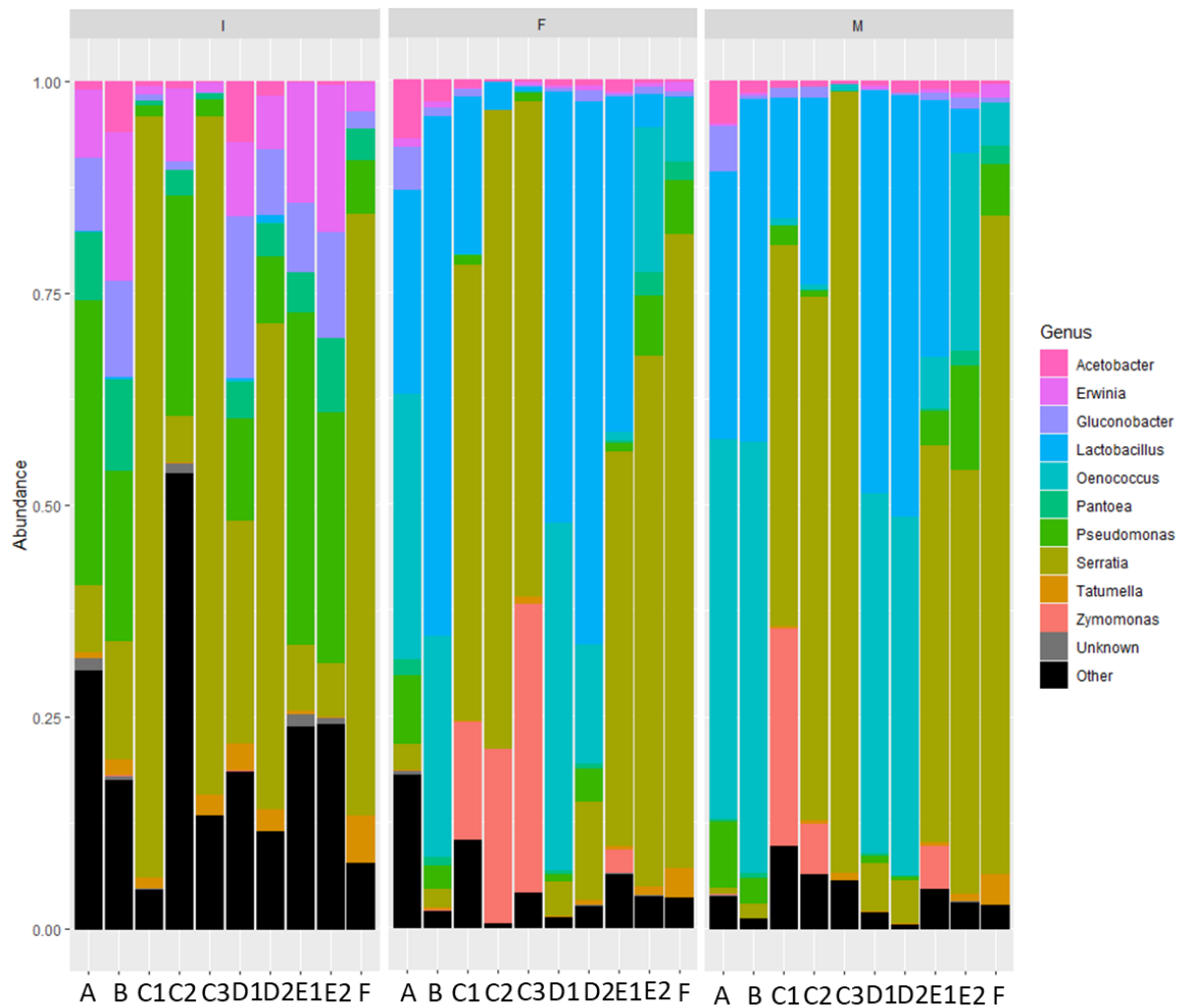


Figure 2. Phylogenetic taxonomy for bacterial communities showing dynamic changes at the genus level during cider fermentation of producer tanks A, B, C1, C2, D1, D2, E1, E2 and F.

Microbial composition at step F and M was different between the tanks. The Figure 4C displays the differences of bacterial composition between tanks according to F and M. The tanks were grouped according to their bacterial composition found at F and M: A/B/D1/D2, C1/C2/C3/E1, and E2/F. The first group of tanks combined the A, B, D1 and D2 tanks with a higher abundance of LAB (*Lactobacillus sp.*, *Oenococcus sp.*) during F and M than in the other tanks. The second regroups C1, C2 C3 and E1 tanks and was characterized by a higher presence of *Lactobacillus sp.* than in the group of tanks E2/F. A lower proportion of *Oenococcus sp.* was also observed in tanks C1, C2 C3 and E1 than in tanks E2/F. This third group combined E2 and F tanks, with a higher presence of *Oenococcus* than in the second group but a lower proportion of *Lactobacillus sp.* and *Serratia sp.* was still present during the fermentation in this group.

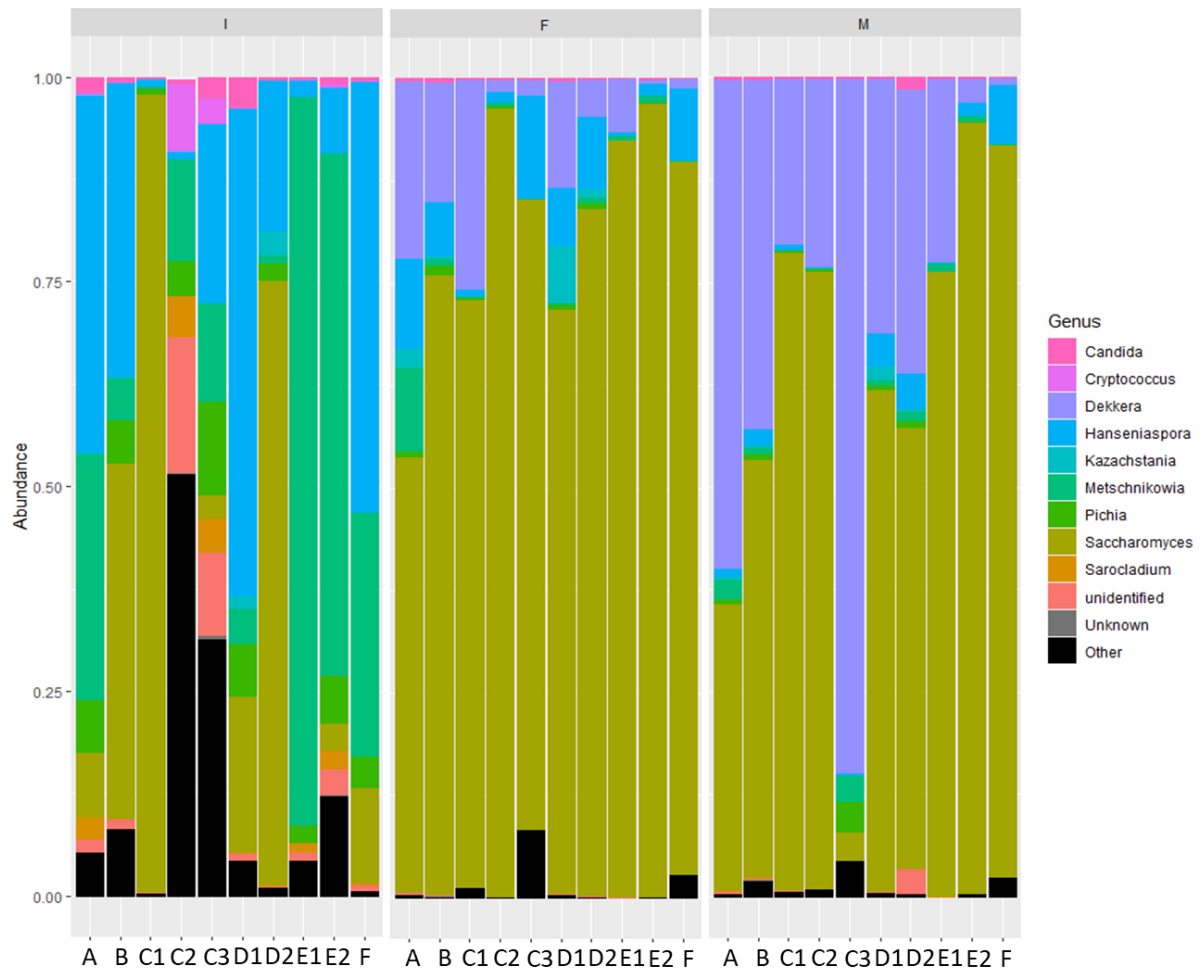


Figure 3. Phylogenetic taxonomy for fungal communities showing dynamic changes at the genus level during cider fermentation of producer tanks A, B, C1, C2, D1, D2, E1, E2 and F.

A highest abundance of *Lactobacillus sp.* and *Oenococcus sp.* was found for the tanks A, B, D1 and D2 while tanks C1, C2, C3, E1, E2 and F were still dominated by *Serratia sp.*. *Zymomonas mobilis* was present in the three tanks of the producer C (C1/C2/C3) but not in all other tanks. *Serratia sp.* represented respectively 55% and 70% of the global abundance at F for tanks E1 and E2 while the proportion of LAB represented respectively 40% and 23%. A higher proportion of *Lactobacillus sp.* was observed in tank E1 than in E2 tank. In contrast, a higher proportion of *Oenococcus sp.* was described for the tank E2 compared to tank E1. The maturation (M) displayed a lower abundance of *Serratia sp.* in all tanks compared to F while *Oenococcus sp.*, *Gluconobacter sp.*, *Acetobacter sp.*, *Komagataeibacter sp.*, *Lactobacillus sp.*, were in higher abundance.

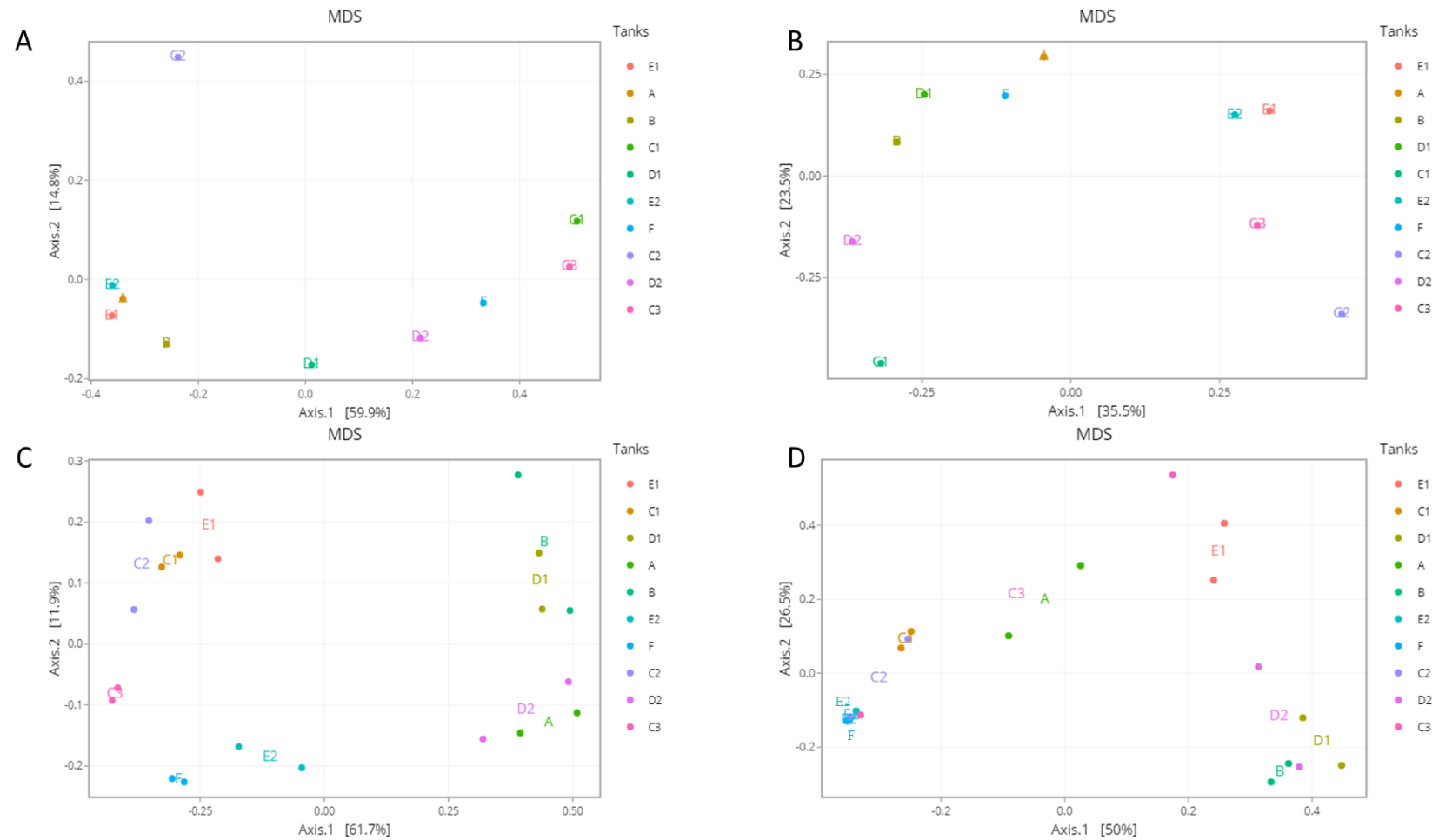


Figure 4. MDS/PCoA representing A) bacterial and B) fungal OTUS distribution at the beginning of fermentation (I) and C) bacterial and D) fungal OTUS distribution at F and M.

The Figure 4D displayed the differences of the fungal communities within the ten tanks at F and M. Three groups of tanks were observed according to their fungal compositions. The first one combined B, D1 and D2 tanks, which presented an abundance of *S. cerevisiae* while the tanks A, C1, C2, C3 and E1 were dominated by *S. uvarum*. The presence of another cluster of *Saccharomyces* genus constitutes the third group for the tank E2. No differences of fungal composition were found at genus level between the tanks at F. At level species, the tanks B, D1 and D2 were dominated by *S. cerevisiae*, *S. uvarum*, *Dekkera anomala* and *Dekkera bruxellensis* while the tanks A, C1, C2, C3 and E2 were dominated by *S. uvarum* and *D. anomala*. The tank E1 was dominated by another cluster of *Saccharomyces*, *S. cariocanus*. Compared to F, the maturation (M) was enriched with *Dekkera sp.* for all tanks except F tank. In contrast, a lower abundance of *Saccharomyces sp.* and *Hanseniaspora sp.* was found at M than at F.

3.3. Physical-chemical differences between producers during cider fermentation

The Table 2 presents the physical-chemical parameters of the ten ciders. The density value of the tank F at I was higher than in the other tanks (1061.70 kg/m^3) and the initial sugar contents exceeded 120 g/L . The pH value of the four tanks newly added in this analysis ranged from 4.1 to 4.3 compared to all 6 others ranging from 3.85 to 4.07. Nitrogen amount was higher for tank E2 (129 mg/L) than in other tanks ($20\text{-}67\text{mg/L}$). The alcohol level at F was of 5.3, 5.4, 6.2% v/v for tanks D1, A and B respectively, 6.6, 6.8 and 6.8% v/v for the tanks C1, C2, E1 and 7.30, 7.60 and 8.30% v/v in the tanks E2, C3, F tanks. The pH value of the tank E1 increased between I and F from 4.11 to 4.28 while this value decreased for tanks E2 and F from 4.22 to 3.90 and 4.30 to 4.20 respectively. The nitrogen was totally consumed during the fermentation for the tanks A, B, C1, C2, C3, D1 and D2 while approximately 20 mg/L remained in tanks E1, E2 and F. A higher total acidity rate was observed to the tank F ($3.70 \text{ g/L H}_2\text{SO}_4$) whereas the volatile acidity rate was lower for the tanks C3, E2 and F ($<0.27\text{g/L H}_2\text{SO}_4$) than in other tanks. No more L-malic acid was quantified at F in all tanks except for E2 (1.50 g/L) and F (2.40 g/L) tanks. The final alcoholic levels at F of tanks E1, C3, E2 and F, were respectively 6.67%, 7.3%, 7.40% and 7.80% (v/v). Glycerol content was higher in tank F (6.01 g/L) than in the other tanks ($3\text{-}5\text{g/L}$). Nitrogen amounts were stable at M compared to F for the tanks E1, E2 and F (20mg/L). The total acidity reached to $3.46 \text{ g/L H}_2\text{SO}_4$ at M for the tank E1 while the volatile acidity was lower for the tanks E2, F and C3 ($0.23\text{-}0.44 \text{ g/L H}_2\text{SO}_4$) than in other tanks (more than 1g/L). Malic acid was still present at M for the tanks E2 and F.

Table 2. Ciders characteristics of producers A, B, C, D, E and F. *All data with significant differences between the first six tanks presented in the chapter I are in bold.*

Parameters		Density	Fructose	Glucose	Sucrose	Sorbitol	Total sugar	Alcoholic level	Glycerol	pH	Nitrogen content	Total acidity	Volatile acidity	L-malic acid	L-lactic acid	D-Lactic acid
		(kg/m ³)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L sucrose)	(% v/v)	(g/L)	(UpH)	(mg/L)	(g/L H2SO4)	(g/L H2SO4)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
Fermentation initiation (I)	A	1044.57	67.50	21.30	17.90	5.78	102.26	0.12	<1.0	3.94	46.23	1.35	0.11	2.31	< 0.10	< 0.10
	B	1047.61	64.00	20.90	26.70	7.50	107.35	0.14	1.30	3.99	76.77	1.49	0.15	2.54	< 0.10	< 0.10
	C1	1050.08	70.50	21.90	31.10	5.57	118.88	0.08	< 1.0	4.07	48.75	1.46	0.16	2.55	< 0.10	< 0.10
	C2	1052.38	72.90	19.60	30.20	4.99	118.08	0.03	1.30	3.96	67.81	1.69	0.04	3.46	< 0.10	< 0.10
	C3	1055.22	79.90	18.50	24.90	7.50	118.40	0.10	< 1.0	4.30	55.00	0.88	0.05	1.70	< 0.10	< 0.10
	D1	1042.03	61.40	17.50	22.30	6.43	97.26	0.12	1.10	3.93	56.04	1.57	0.12	2.74	< 0.10	< 0.10
	D2	1039.54	61.50	17.60	13.40	5.39	88.55	0.58	< 1.0	3.85	19.89	1.63	0.23	2.47	0.18	< 0.10
	E1	1052.75	85.92	19.44	15.97	6.87	116.10	0.06	< 1.0	4.11	61.00	2.01	0.06	3.60	< 0.10	< 0.10
	E2	1057.59	69.60	22.40	29.90	13.10	117.30	0.10	< 1.0	4.22	129.00	1.51	0.06	2.80	< 0.10	< 0.10
	F	1061.70	92.60	25.10	16.30	10.10	128.10	0.10	< 1.0	4.30	56.00	1.07	0.08	2.11	< 0.10	< 0.10
Alcoholic Fermentation (F)	A	1003.3	12.40	< 1.0	< 1.0	5.75	11.80	5.41	3.80	3.94	0	2.01	0.64	< 0.10	1.29	0.79
	B	999.7	4.10	< 1.0	< 1.0	7.94	3.90	6.21	4.38	3.99	0	2.29	0.65	< 0.10	1.37	1.39
	C1	997.82	< 1.0	< 1.0	< 1.0	7.37	< 1.0	6.80	3.33	4.04	0	3.15	0.9	< 0.10	1.05	0.11
	C2	1039.97	67.50	17.90	4.60	5.64	85.74	6.80	2.20	4.29	0	2.59	1.02	< 0.10	0.15	< 0.10
	C3	997.12	< 1.0	< 1.0	< 1.0	8.80	< 1.0	7.60	3.50	4.10	0	2.68	0.24	< 0.10	0.90	< 0.10
	D1	1002.37	10.60	< 1.0	< 1.0	8.56	10.05	5.27	4.20	3.93	0	2.67	1.14	< 0.10	1.71	1.57
	D2	1011.5	18.60	1.60	< 1.0	3.60	21.01	no data	1.89	3.99	0	1.45	0.32	< 0.10	1.62	2.07
	E1	1001.05	3.64	< 1.0	< 1.0	8.37	3.45	6.60	3.94	4.28	15.00	2.77	0.88	< 0.10	1.45	0.36
	E2	1001.31	2.50	< 1.0	< 1.0	13.50	2.40	7.30	4.80	3.90	24.00	2.86	0.14	1.50	1.46	0.20
	F	1000.33	4.80	< 1.0	< 1.0	9.40	4.60	8.20	5.70	4.20	27.00	3.70	0.27	2.40	0.60	0.30
Maturation (M)	A	999.78	5.30	< 1.0	< 1.0	6.20	5.00	5.76	3.80	3.94	0	2.53	1.25	< 0.10	1.23	1.03
	B	998.43	1.40	< 1.0	< 1.0	8.13	1.33	6.39	5.00	3.94	0	2.61	1.23	< 0.10	1.57	1.76
	C1	997.71	< 1.0	< 1.0	< 1.0	7.40	< 1.0	6.81	3.20	4.02	0	3.14	1.28	< 0.10	1.02	0.13
	C2	999.78	< 1.0	< 1.0	< 1.0	5.30	2.9	6.80	2.40	4.26	0	2.8	1.09	< 0.10	0.14	< 0.10
	C3	997.08	< 1.0	< 1.0	< 1.0	8.8	< 1.0	7.30	3.50	4.1	0	3.21	0.44	< 0.10	0.90	< 0.10
	D1	1000.77	7.30	< 1.0	< 1.0	12.40	6.93	5.46	4.60	3.68	0	2.8	1.2	< 0.10	1.81	1.84
	D2	1003.20	12.50	< 1.0	< 1.0	5.87	11.88	5.17	3.34	3.8	0	3.02	1.47	< 0.10	1.66	0.56
	E1	999.65	< 1.0	< 1.0	< 1.0	8.54	< 1.0	6.67	3.86	4.22	14.00	3.46	1.5	< 0.10	1.37	0.41
	E2	1000.58	1.30	< 1.0	< 1.0	13.7	1.20	7.40	4.80	4.00	21.00	2.69	0.23	0.70	1.95	0.20
	F	998.82	2.00	< 1.0	< 1.0	10.00	1.90	8.40	6.01	3.80	23.00	3.20	0.27	1.90	0.90	0.20

A Kruskal-Wallis test at I, F and M was used to analyse differences between the physical-chemical parameters between the 3 groups of tanks defined above by their differences in microbial composition (A/B/D1/D2, C1/C2/C3/E1, and E2/F). pH remains the only factor at I significantly different between the tanks ($p\text{-value} < 0.05$). pH values at I were highest for F and E2 tanks (4.30 and 4.22 respectively) while the tanks A, B, D1 and D2 had the lowest pH values ranging from 3.85 to 3.96. During fermentation and maturation, the volatile acidity, the pH value, the L-malic, D-lactic acid, total sugars contents and the alcohol level were significantly different between the three groups of tanks. Volatile acidity level was lower for the group of tanks E2/F (0.14-0.27 g/L H_2SO_4) than the others (0.44-1.47 g/L H_2SO_4) and the total acidity level followed the same trend. The D-lactic content for the group of tanks E2/F (0.20 g/L) and C1/C2/C3/E1 (0.10-0.44g/L) was lower than in the group of tanks A/B/D1/D2 (0.56-1.76 g/L). The residual sugars levels at F and M were higher for tanks A/B/D1/D2 (10-20g/L) than for tanks C1/C2/C3/E1 (<1.0g to 2.9g/L) and tanks E2/F (<2g/L). In consequence, the alcoholic level was higher for the group of tanks E2/F (7.60-8.20% v/v) than in the tanks A/B/D1/D2 (5-6% v/v). L-malic acid was only observed in tanks E2 and F (1.50-2.40 g/L) during fermentation and maturation. However, the rate of the malic acid consumption in tank E2 was faster than in tank F and the production of L-lactic acid was higher.

A non-parametric analysis was performed to compare physical-chemical parameters between producers (Table 4). The concentration of glycerol in ciders varies according to producers ($p\text{-value} < 0.05$). Glycerol values found for the three tanks of producer C ranged from 2.40 g/L and 3.50 g/L, while it reached to approximatively 4-6g/L for the other tanks and 3.34g/L for tank D2. The impact of the maturation (differences between F and M) on the physical-chemical of ciders was also highlighted by the difference of the volatile acidity content, with higher values at M compared to F.

3.4. Evolution and differences of the aromatic composition during fermentation

3.4.1 Aromatic composition of ciders for distillation

Table 3 presents the sixteen volatile compounds among the 67 detected that could be used for statistical analyses. For the others, too many values under the detection threshold prevent it from using them. The sixteen aromatic compounds and the physical-chemical parameters of each tanks at I, F and M were displayed by Principal Component Analysis (PCA) (Figure 5).

Table 3. Aromatic compounds of interest in ciders of producers A, B, C, D, E and F.

	Odor description	minimum in samples (mg/L)	maximum in samples (mg/L)	Means (mg/L)
Alcohols				
Methanol		22,49	204,83	70,88
Butanol-1	Balsamic	2,33	13,79	7,38
Methyl-2-butanol-1	Wine, fruity	2,46	99,38	19,89
Methyl-3-butanol-1	Cognac, banana, fruity	5,54	157,16	63,28
Hexanol-1	Green, pungent	1,84	5,84	3,90
Isobutanol		2,56	37,31	16,20
Phenyl-2-ethanol	Floral, rose	1,11	55,64	18,65
Esters				
Ethyl acetate	Fruity, green, off flavor	4,90	194,76	51,72
Ethyl-2-methylbutyrate	Wine, fruity	0,01	0,75	0,17
Ethyl lactate	off-flavor	3,65	120,09	25,81
Ethyl succinate	Fruity	0,02	7,61	0,97
Ethyl caproate	Fruity	0,01	0,72	0,26
Ethyl palmitate	Fruity	0,02	0,64	0,30
Volatils phenols				
Ethylcatechol	burnt plastic,horse sweat	0,02	64,30	11,14
Ethylphenol	burnt plastic,horse sweat	0,02	8,22	1,75
Ethylguaiacol	burnt plastic,horse sweat	0,02	1,71	0,41

The two principal components, Dim1 and Dim2, accounted for 61.84% of total variance (52% and 9.84% respectively). Ethyl-2-methylbutyrate, ethyl lactate and hexanol were displayed on Dim2 while the other parameters were displayed on Dim1. Hexanol-1 and butanol-1 were the only aromas found at I. The butanol-1 values at I ranged from 2 mg/L for tank E1 to 13 mg/L for tank C3. The hexanol-1 concentrations varied significantly between tanks ($p < 0.05$). These values ranged from 2 mg/L for tank E1 to 5 mg/L for tank C3. No significant decrease of the concentration of these aromas was found in the tanks during F and M. A PCA was displayed and a non-parametric analysis was performed on aromatic compositions of ciders (Figure 5 and Table 4).

Seven aroma concentrations varied between producers (hexanol-1, ethyl-2-methylbutyrate, ethyl lactate, 2-methylbutanol-1, ethylguaiacol, isobutanol, and phenyl-2-ethanol). The tanks of producers B and D (D1/D2) in this PCA were differently distributed than those of the other producers according to higher values of hexanol-1 (3.6-5.78 mg/L at F), ethyl-2-methylbutyrate (0.30-0.70 mg/L at F), and ethyl lactate (56-120 mg/L at F). For the tank F, the concentrations of 2-methylbutanol-1 were higher (23-41mg/L) than in other tanks (less than 24 mg/L). For tanks E1, F, A, and D2, ethylguaiacol concentration was higher (ranging between 0.7-1.7mg/L) than in others tanks (less than 0.3 mg/L). The tanks F and E2 had higher phenyl-2-ethanol (about 50mg/L) than the other tanks, reaching approximatively 20 mg/L.

Table 4. Scheirer–Ray–Hare analysis results of physical-chemical and aromatic parameters in 10 tanks distributed at F and M.

p*-value<0.05, *p*-value<0.01, ****p*-value<0.001

Aromatic compound	Alcoholic fermentation (n=10tanks)	Maturation (n=10tanks)	Fermentation (F between M)		Differences between ciders of producer		Interaction Fermentation X producer ciders	
	Mean concentrations (mg/L)	Mean concentrations (mg/L)	H-value	Probability (>H)	H-value	Probability (>H)	H-value	Probability (>H)
2-methylbutanol-1	31,15	23,68	0.0914	0.76237	12.7929	0.02540**	1.2062	0.94428
Isobutanol	23,07	22,65	0.0514	0.82060	14.4762	0.01285**	0.1771	0.99934
Ethyl-2-methylbutyrate	0,22	0,17	0.3657	0.54535	16.9833	0.00453***	1.903	0.1996
Ethyl lactate	31,93	41,61	0.8229	0.36435	17.1833	0.00416***	0.1890	0.99923
Ethyl caproate	0,46	0,31	5.8514	0.01556**	5.9643	0.30971	1.2843	0.93654
Ethylguaiaicol	10,82	22,57	0.816	0.3928	4.065	0.0392*	0.091	0.9913
Phenyl-2-ethanol	26,97	27,62	2.5319	0.70408	19.3548	0.00006***	0.1762	0.99935
Hexanol1	3,62	3,80	3.5002	0.51501	16.1958	0.00631**	0.6697	0.99997
Other compound	Mean concentrations (g/L)	Mean concentrations (g/L)	H-value	Probability (>H)	H-value	Probability (>H)	H-value	Probability (>H)
Glycerol	3,79	3,80	0.0057	0.93974	11.0476	0.0456*	2.2800	0.80920
Acidity	Mean concentrations (g/L H ₂ SO ₄)	Mean concentrations (g/L H ₂ SO ₄)						
Volatile acidity	0,55	1,03	7.8229	0.00516***	5.4500	0.36346	0.8271	0.97527

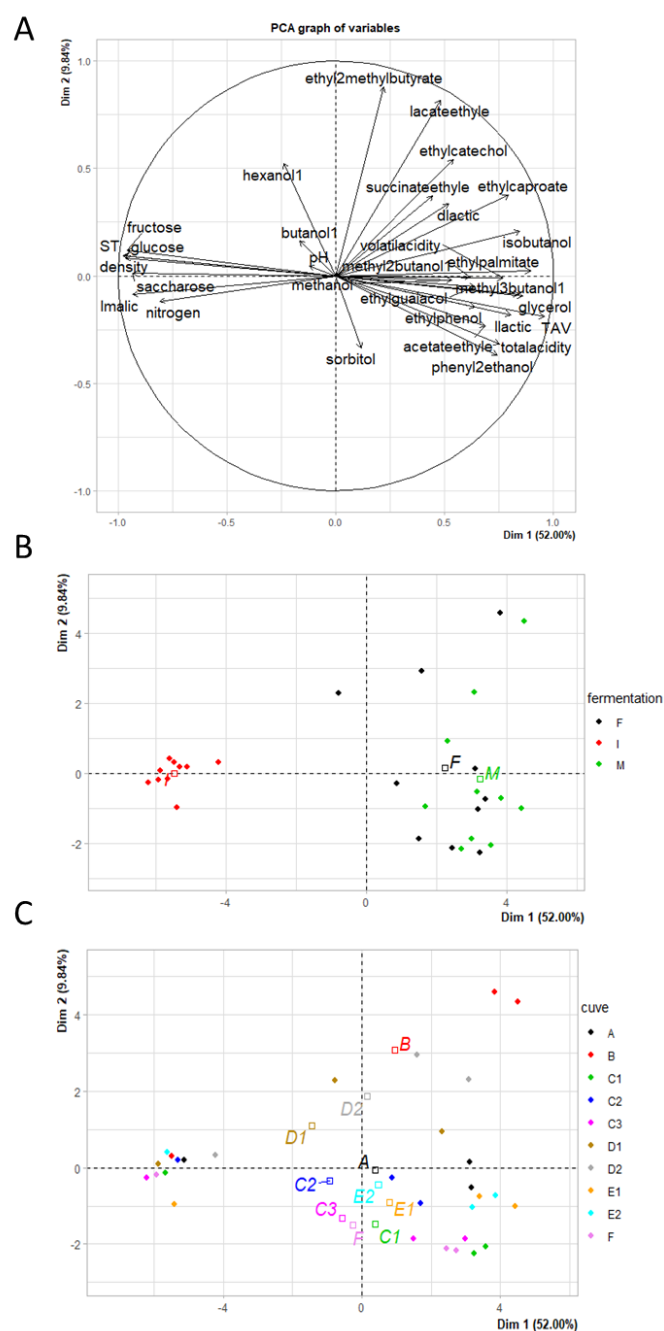


Figure 5. Principal component analysis of physicochemical parameters of ciders for distillation (A). The distribution of cider samples was displayed according to (B) fermentation, (C) tanks.

Differences between F and M on the physical-chemical and aromatic composition of ciders were highlighted by PCA and by Scheirer–Ray–Hare analysis (Figure 5 and Table 4). The ethyl caproate content differed only between F and M. The ethyl caproate values decreased at M (0.25-0.72 mg/L) compared to F (0.19-0.37 mg/L).

3.4.2. Aromatic composition of the distillates

After the maturation (M), the ciders were distilled and the aromatical analyses on the calvados produced were performed. The differences in aromatic composition according to the tanks are presented in Figure 6. Since distillation results in a concentration of flavours, 45 aromatic compounds can be studied compared to 16 in ciders for distillation. The two principal components, Dim1 and Dim2, accounted for 48.80% of total variance (28.46% and 20.34% respectively). The distillates of these ciders were grouped according to their aromatic composition, with the tanks A/B/D1/D2, C1/C2/C3/E1 and E2/F. The group of tanks C1/C2/C3/E1 were distributed according to higher values of aldehydes (ethanal and acetal), ethyl formate and ethyl acetate. The tank F was differently distributed according to higher values of ethyl caproate, phenylethyl caprylate, isobutyl acetate, ethyl palmitate, allylic alcohol, 1-octanol, ethyl caprylate, isoamyl caprate, methanol and ethyl propionate. The tank E2 was characterised by high level of isoamyl laurate and ethyl caproate. The tanks A/B/D1/D2 had the higher aromatic complexity, mixing higher values of esters (isoamyl laurate, ethyl-3-hydroxybutyrate, butyl acetate, ethyl butanoate, hexyl acetate, ethyl furoate, ethyl succinate, ethyl 2-methylbutyrate, ethyl lactate, ethyl isobutyrate), alcohols (propanol-1, butanol-2, butanol-1, 6-methyl-5-hepten-2-ol, cis-hexenol, hexanol-1, isobutanol), phenol volatiles (ethylphenol, ethylguaiacol) and acrolein.

3.5. Links between microbial compositions, physical-chemical and aromatic parameters in ciders for distillation and distillates

Correlation analysis was performed between aromatic compounds of the ciders for distillation and microbiota composition (Figure 7). Spearman's correlation analysis revealed that the population of several microorganisms was significantly correlated with volatile compounds and physical-chemical parameters. Among them, *Oenococcus sp.* (Cluster-B2) was significantly positively correlated with several volatile compounds such as ethyl lactate, ethyl acetate, 2-phenylethanol, methyl-2-butanol-1, ethyl palmitate, ethyl succinate, ethylcatechol, ethylguaiacol, methyl-3-butanol-1, ethylphenol, isobutanol-1 and ethyl caproate. In addition, *Oenococcus sp.* was positively correlated with the presence of *Lactobacillus collinoides* (Cluster-B3), *Saccharomyces cerevisiae* (Cluster-L6) and *Dekkera sp.* (Cluster-L12 and Cluster-L14). In contrast, this bacterium was negatively correlated to L-malic acid and *Hanseniaspora sp.* (Cluster L-20). *Lactobacillus collinoides* (Cluster-B3) was the third most abundant cluster found in this analysis. This bacterium is positively correlated with only one aroma, the ethyl lactate. *Lactobacillus collinoides* is positively correlated to *Saccharomyces*

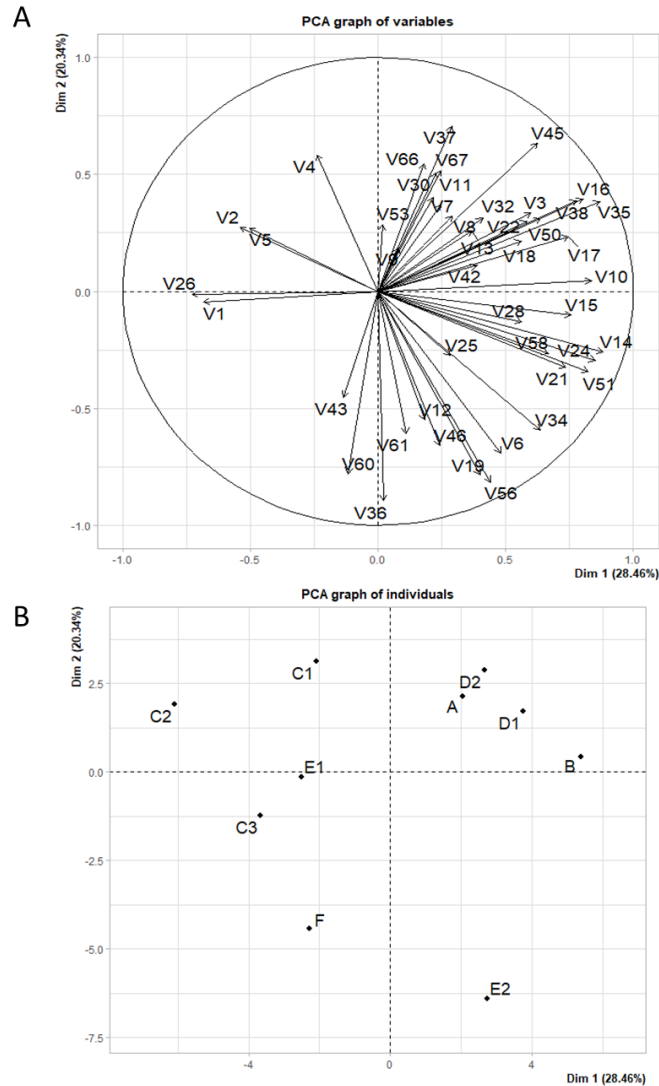


Figure 6. Principal component analysis of A) the 45 aromatic compounds of the microdistillates of ciders of the ten tanks. B) Distribution of the tanks according to the aromatic complexity. The correspondence of the name of aromatic compounds were in supplemental data. V1: Ethanal, V2: Ethyl formate, V3: Acrolein, V4: Ethyl acetate, V5: Acetal, V6: Methanol, V7: Ethyl butanoate, V8: Butanol-2, V9: Propanol-1, V10: Isobutanol, V11: Isoamyl acetate, V12: Allylique alcohol, V13: Butanol-1, V14: Methyl-2 butanol-1, V15: Methyl-3 butanol-1, V16: Ethyl lactate, V17: Hexanol-1, V18: Cis-Hexenol, V19: Ethyl caprylate, V20: Furfural, V21: Ethyl caprate, V22: Ethyl succinate, V23: Phenylethyl acetate, V24: Ethyl laurate, V25: Phenyl-2 éthanol, V26: Total aldehydes, V27: Isobutanol, V28: 1-Pentanol, V29: 1-Octen-3-ol, V30: Ethyl-3-hydroxybutyrate, V31: Ethyl-2-hydroxycaproate, V32: Ethyl furoate, V33: 3-pentanol, V34: Ethyl propionate, V35: Ethyl isobutyrate, V36: Isobutyl acetate, V37: Butyl acetate, V38: Ethyl 2-methylbutyrate, V39: Ethyl isovalerate, V40: Ethyl valerate, V41: Pentyl acetate, V42: 6-methyl-5-hepten-2-ol, V43: Ethyl caproate, V44: Cis-hexenyl acetate, V45: Hexyl acetate, V46: 1-Octanol, V47: Ethyl heptanoate, V48: Ethyl 3-(methylthio)propionate, V49: Nonanol, V50: 4-vinyl anisol, V51: Ethyl benzoate, V52: Decanal, V53: 2-phenylethyl acetate, V54: Isoamyl caprylate, V55: Isobutyl caprate, V56: Isoamyl caprate, V57: Phenylethyl caproate, V58: Ethyl myristate, V59: Isoamyl laurate, V60: Phenylethyl caprylate, V61: Ethyl palmitate, V62: Ethyl stearate, V63: Ethylcatechol, V64: Vinylphénol, V65: Vinylguaïacol, V66: Ethylphénol, V67: Ethylguaïacol.

(Cluster-L3, Cluster-L56), *Kazachstania* (Cluster-L24), *Pichia* (Cluster-L35) and *Dekkera* species (Cluster-L12, Cluster-L14). *Dekkera* sp. was positively correlated with ethyl lactate, ethyl acetate, ethyl succinate, ethylcatechol, ethylguaïacol, ethylphenol, isobutanol-1 and ethyl caproate and the volatile acidity. No interactions between aroma and clusters of *Saccharomyces* species were found. In distillates, few interactions between the aroma and the microbial

composition were observed. *Oenococcus oeni* was positively correlated to ethyl-2-methylbutyrate, ethyl lactate and ethyl isobutyrate. The hexyl acetate was also positively correlated to *Kazachstania bulderi*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora valbyensis* (data not shown). The ethyl isobutyrate was positively correlated to *Hanseniaspora uvarum*.

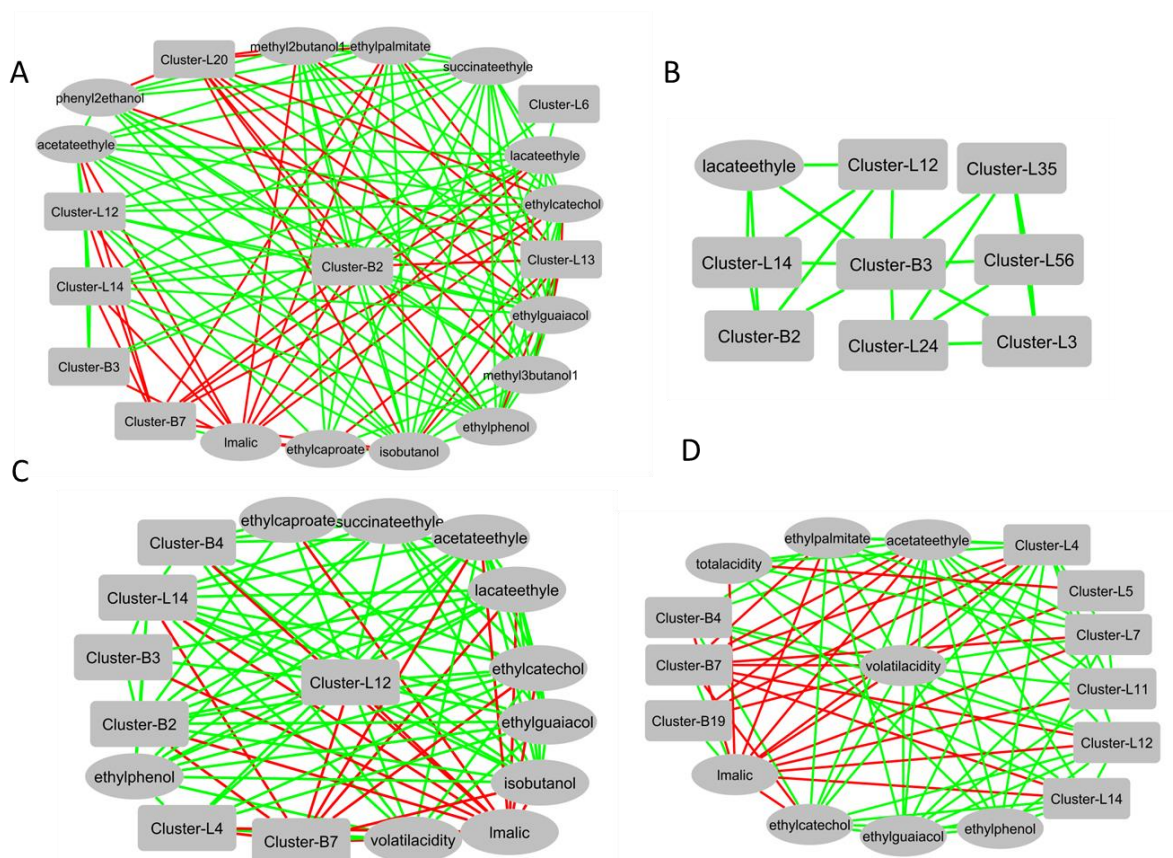


Figure 7. Network analysis based on the co-occurrence of physical-chemical and aromatic characteristics and the microbial communities. Relationships between a) *Oenococcus oeni* (Cluster-B2) b) *Lactobacillus collinoides* (Cluster-B3) c) *Dekkera sp.* (Cluster-L12/L14) d) volatile acidity with the physical-chemical and aromatic parameters analysed in the ten ciders. A connection represents a significant positive correlation ($p < 0.05$) according to Spearman's rank analysis ($r > 0.6$). The red lines mean positive correlations between microbial clusters and physico-chemical/aromatic characteristics and the green lines mean positive correlation between microbial clusters and physico-chemical/aromatic characteristics in cider. Cluster-B2: *Oenococcus oeni*, Cluster-B3: *Lactobacillus collinoides*, Cluster-B4: *Lactobacillus mali*, Cluster-B7: *Zymomonas mobilis*, Cluster-B19: *Pseudomonas sp.*, Cluster-L4: *Kregervanrija fluxuum*, Cluster-L3/L6/L56: *Saccharomyces sp.*, Cluster-L13: Unknown fungi, Cluster-L20: *Metschnikowia sp.*, Cluster-L24: *Kazachstania sp.*, Cluster-L35: *Pichia sp.*.

4. Discussion

4.1. Construction of microbial communities in ciders for distillation

Compared to chapter I, four tanks of a second sampling campaign were added for analysis. Two new producers (tanks E1, E2 and F) and a third tank for producer C were followed, completing the analysis of ciders for distillation to 10 tanks over two years. Microbial dynamics and compositions were analysed for the 10 tanks to strengthen the study and to link it to aroma composition. We also wanted to check the tendencies found in Chapter I and focused on microbial diversity at I, F and M.

Microbial compositions in the must depend on many parameters, such as the environment or practices of the producers (choice of apple varieties, blending, harvesting time ...). The impact of the raw material variety on the conditions of aroma production, physical-chemical and microbial composition was particularly studied (Al Daccache *et al.*, 2020; Alberti *et al.*, 2016; Rita *et al.*, 2011; Rosend *et al.*, 2019). The initial concentrations of sugars and amino acids in the must influence the final product (Al Daccache *et al.*, 2020). The effect of nitrogenous nutrient levels in must on volatile compounds formation during the alcoholic fermentation has been widely studied (Bell *et al.*, 2005; Beltran *et al.*, 2007; Lytra *et al.*, 2020; Mendes-Ferreira *et al.*; Ugliano *et al.*, 2009). In musts (at I), high proportion of *Serratia sp.* were found in tanks C1, C3 and F while a greater bacterial diversity (including *Pseudomonas sp.*) was observed in the other tanks. Abundance of *Serratia sp.* in tanks may be linked to a higher pH in C1, C3, and F tanks compared to other tanks. No groups of tanks emerged from the MDS/PCoA representation of bacterial and fungal distributions at I. The groups of tanks distinguished at F and M (A/B/D1/D2, C1/C2/C3/E1 and E2/F) were not found at I leading to the conclusion that no prediction of the dynamics of the microbial ecosystem can be done from I to F globally but also at the producer level. For fungal diversity, tanks A, B, D1, D2 and F had higher proportion of *Hanseniaspora sp.*, while tanks E1 and E2 were dominated by *Pichia sp.* and tanks C1, C2 and C3 were highly diverse.

On the other end, at F and M, differences of microbial composition in the ten tanks were represented by three distinct groups of tanks (A/B/D1/D2, C1/C2/C3/E1 and E2/F). For bacterial communities, the tanks A, B, D1 and D2 were characterized by a majority of LAB (*Oenococcus sp.* and *Lactobacillus sp.*), while tanks E2 and F still had a high proportion of *Serratia sp.* (found at I) during the fermentation (step F). The tanks C1, C2 C3 and E1 had a more diverse profile, with LAB (but mainly *Lactobacillus sp.*), *Serratia sp.* and *Zymomonas*

mobilis. *Zymomonas mobilis* was found at F in the three tanks of the producer C at two different harvests and fermentation times (C1/C2 in 2017 and C3 in 2018). A high pH cannot be the only factor incriminated for the presence of *Zymomonas mobilis* or *Serratia sp.* as in tanks E2 and F, *Zymomonas mobilis* was not detected. A high pH value promotes the development of spoilage and Gram negative bacteria such as *Zymomonas mobilis* in cider (Swings *et al.*, 1977) and modulates the microbial dynamics and composition during the fermentation process (Laureys *et al.*, 2014; Temudo *et al.*, 2008; Ye *et al.*, 2007). In our study, pH dynamics were significantly different depending on the three groups (Tanks A/B/D1/D2, E2/F and C1/C2/C3/E1). These differences in pH may explain the differences in Gram-negative bacteria (such as *Serratia sp.* and *Zymomonas mobilis*) and LAB abundances between the tanks (Misery *et al.*, 2021). In this second analysis with 10 tanks, the tanks E2 and F contradict the above affirmation with high pH and absence of *Zymomonas mobilis*, suggesting that other parameters must be taken into account such as the size of the tanks. For example, differences of microbial composition between the tanks C1/C2/C3/E1/E2/F with high proportion of *Serratia sp.* and few LAB can be linked to the size of the tanks. The capacity of these tanks did not exceed 100hL while the size of the tanks A/B/D1/D2 was from 1200 to 7500hL. Smaller tanks may be more oxygenated enabling Gram-negative bacteria to grow better than LAB. As in other studies, we showed here that the construction of a spontaneous fermentation microbial community depends on raw material and environment enrichment/contamination during the process (Bokulich *et al.*, 2013; Quigley *et al.*, 2012).

Studying ten tanks, we confirmed our first observation that malolactic fermentation occurred (if so) concomitantly with the alcoholic fermentation in ciders for distillation. In 8 out of 10 tanks, malic acid is completely consumed in the first 3-4 weeks of fermentation. The low consumption rate of malic acid content in tanks E2 and F is in accordance with the low proportion of LAB in these tanks and malolactic fermentation didn't occur for the tanks E2/F. An exception was the tank C3 that had a lower proportion of LAB than the tanks E2 and F whereas malic acid was totally consumed at F and the residual sugars were totally consumed, leading to a higher alcohol level. This could be explained by the lower initial malic acid content of C3 tank (1.70g/L) than in the other tanks (2-3g/L). Even if *Oenococcus oeni* is the the most efficient species to perform malolactic fermentation (Bartowsky *et al.*, 2005; Salih *et al.*, 1990; Sánchez *et al.*, 2012), *Lactobacillus sp.* must not be underestimated in this process (Cappello *et al.*, 2017; Lombardi *et al.*, 2020). In wine, the malolactic fermentation occurs more frequently after the alcoholic fermentation even if this process can take place at early stage of the

fermentation (Comitini *et al.*, 2005). Contrarily to wine, ciders for distillation result of a spontaneous fermentation not controlled by producers. Thus, this fermentation represents a complex ecosystem with numerous interactions, that could explain that the two processes are done simultaneously in this case.

As for fungal communities, the microbial succession of *Hanseniaspora sp.*, and *Pichia sp.* by *Saccharomyces sp.* and *Dekkera sp.* from I to F was observed in all tanks. No differences of fungal composition were found at genus level at F. However, identification of *Saccharomyces* clusters led to separate tanks B, D1 and D2 from the others. This study confirms the occurrence of different *Saccharomyces* species according to the tanks of producers. Several studies have shown the differences of contribution of *Saccharomyces* species to the contribution of aroma and chemical profiles during the fermentation process (Kanter *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2020). Compared to the bacterial dynamics, difference of fungal composition was found at F and M. The analysis of a larger number of tanks confirms that the temporal succession of *Saccharomyces sp.* to *Dekkera anomala/bruxellensis* during the maturation remains a problematic in cider, due to its ability to produce off-flavours aroma (Colomer *et al.*, 2019; Guichard *et al.*, 2019; Vigentini *et al.*, 2008).

4.2. Microbial and aroma interactions in ciders for distillation and distillates

The composition of volatiles compounds depends on the practices of the producers, including the technology, the choice of apple varieties, the ageing and storage conditions (Rosend *et al.*, 2019). Major aromatic compounds in ciders for distillation are esters (78–92% of total volatiles), alcohols (6–16% of total volatiles) and aldehydes. Our study showed that seven aroma concentrations varied between producers (hexanol-1, ethyl-2-methylbutyrate, ethyl lactate, 2-methylbutanol-1, ethylguaiacol, isobutanol, and phenyl-2-ethanol). The tanks of the producers B and D (D1/D2) were differently distributed than those of the other producers, mainly because of higher values of hexanol-1, ethyl-2-methylbutyrate and ethyl lactate. Moreover 4-ethylguaiacol and phenyl-2-ethanol contents were different between producers. Higher levels of volatile compounds were directly linked to a higher amino acid content. The tank F had higher nitrogen content (129 mg/L) than the other tanks (ranging from 20 to 76 mg/mL) and its concentrations of 2-methylbutanol-1, phenyl-2-ethanol and ethylguaiacol were also higher than in other tanks.

The ciders of the ten tanks were distilled after alcoholic fermentation (at F) and after maturation (at M) and their aromatic composition was analysed. Only the concentrations of ethyl caproate

and the volatile acidity were different between F and M. During maturation (M), the ethyl ester content decreased while the volatile acidity increased. Few studies have been performed on the impact of the cider maturation on the chemical composition of cider distillates. Cider maturation was shown to lead to an increase of ethyl esters and others aromas such as 2-butanol, 2-propen-1-ol and 4-ethylguaiacol (Madrera *et al.*, 2008) and the final product (calvados) made from the most matured cider (volatile acidity 1.5 g acetic acid/L) scored better for “odour quality”. In our study, the final volatile acidity level ranged from 1.09 g/L to 1.47 g/L for the tanks A, B, D1, D2, C1, C2 and E1 while the level of volatile acidity of the tanks E2, C3 and F was lower (0.23-0.44 g/L). Thus, we can suggest that the distillation of these ciders might be of lower “odour quality”. In addition, these differences can be explained by the specific microbial composition of these three tanks.

In our study, the aromatic complexity is directly link to the microbial composition. Indeed, the tanks C1/C2/C3/E1, A/B/D1/D2 and E2/F were grouped according to their aromatic complexity as they were for their bacterial diversity. The tanks C1/C2/C3/E1 were mainly characterized by high level of aldehydes (ethanol, acetal). These aroma compounds contribute to the sensory properties of ciders and can affect aging and color stability for the brandy. An excess of acetaldehyde (more than 30 mg/L) in cider for distillation imparts an undesirable green-like aroma (Williams *et al.*, 1974). In contrast, the tanks A/B/D1/D2 present a larger aromatic complexity, with the identification of ester, alcohols and phenols volatiles. The tanks E2 and F were distributed differently than the others, each with specific aromas. This study shows a direct link between the dynamics and microbial composition and the aromatic complexity.

First, results confirm the interactions between *Dekkera sp.* with the phenol volatiles (4-ethylguaiacol, ethylphenol and ethylcatechol) and ethyl esters. Many studies were conducted in order to understand the implication of this yeast on the aroma quality (Buron *et al.*, 2011; Colomer Serra *et al.*, 2019; Guichard *et al.*, 2019; Šučur *et al.*, 2016). The development of *Dekkera sp.* during maturation leads to a disappearance of ethyl esters and an occurrence of volatile phenols. Indeed, the interactions between *Dekkera sp.* with the ethyl lactate and ethyl acetate contents confirms the ability of this yeast to produce these aromas by its esterase activity (Buron *et al.*, 2011; Guichard *et al.*, 2019). However, no negative correlation between *Dekkera sp.* and isoamyl acetate was found (data not shown), as shown by Buron *et al.* (2011) and Guichard *et al.* (2019). In cider for distillation, volatile phenols production is unintended because of the ester perception cover-up (Le Quéré *et al.*, 2006). *Dekkera sp.* was positively correlated with LAB, especially with *Lactobacillus sp.* and *Oenococcus sp.*. Studies have

shown the ability of the LAB to cope to stressful environment, especially during the maturation since almost all the carbon sources are used (Bartowsky *et al.*, 2005; G-Alegria *et al.*, 2004). Thus, studying the interactions between the LAB, *Saccharomyces sp.* and *Dekkera sp.* is an interesting topic in order to better control this microbiota present at maturation in cider. Secondly, as for fungal composition, the interactions between the hexyl acetate and *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*) and non-*Saccharomyces* clusters (*Kazachstania bulderi* and *Hanseniaspora valbyensis*) are interesting to note. The genus *Hanseniaspora* was also correlated to the ethyl isobutyrate content. Many studies were conducted in order to a better understanding of the implication of non-*Saccharomyces* species in the aromatic complexity (Belda *et al.*, 2015; Ciani *et al.*, 2010; Escribano-Viana *et al.*, 2018; Soden *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2019). *H. uvarum* was also known to affect the chemical and sensory profiles of wines (Hu *et al.*, 2018). The implication of non-*Saccharomyces* yeasts in cider for distillation in calvados is to be further investigated.

Compared to yeast, few studies deal with the involvement of the LAB on the aromatic quality of cider for distillation. A study from Maicas *et al.* (1999) shows the potential of the MLF in a higher production of total higher alcohols, esters and acids. LAB can also produce higher alcohols, fatty acids, lactones and sulfur and nitrogen compounds (Swiegers *et al.*, 2005). The esterase activity and amino acid metabolism of LAB have also been demonstrated in wine (Moreno-Arribas *et al.*, 2009). Some studies based on wine and beer show that the control of the malolactic fermentation can lead to a better production of interesting aromas while others show the implication of the development of LAB in organoleptic disorder (Li *et al.*, 2020; Lytra *et al.*, 2020; Nsogning Dongmo *et al.*, 2016, 2017; Sauvageot *et al.*, 2000). In our study, the tanks B, D1 and D2 were dominated at F and M by LAB, and some aromas such as ethyl-2-methylbutyrate and ethyl lactate were in higher concentrations. The Cytoscape software showed many interactions between LAB, aromas and physical-chemical parameters, especially with *Oenococcus oeni*. Indeed, the *Lactobacillus sp.* interactions were found with ethyl lactate, *Saccharomyces sp.* and *Dekkera sp.*, while the *Oenococcus oeni* interactions were with ethyl esters (ethyl lactate, ethyl acetate, ethylcaproate, ethyl palmitate, ethyl succinate), phenol volatiles (ethylcatechol, ethylphenol, ethylguaiaicol) and alcohols (2-phenylethanol, methyl-2-butanol-1, methyl-3-butanol-1, isobutanol). The study of Nsogning Dongmo *et al.*, (2016) showed that *Lactobacillus* strains significantly affect the concentration of ethyl-2-methylbutyrate even if it does not modulate the global aromatic composition of the product. In cider for distillation, we showed that this compound is produced at low level and is not

correlated to *Lactobacillus sp.*. The implication of *Oenococcus sp.* in the biochemical changes during malolactic fermentation was widely studied (Bartowsky *et al.*, 2005). Many studies deal with *Oenococcus sp.* metabolic activity and their potential to produce aromas such as lactic acid, acetic acid, ethyl lactate and acetate esters and as 4-ethylguaiacol and ethylphenol that are undesirable in cider (Bartowsky *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2020). In wine, Ugliano *et al.* (2006) showed that the malolactic fermentation by *O. oeni* strain influences the production of 2-phenylethanol, as found in our study. The link of ethyl lactate, ethyl acetate and the LAB is of particular interest here. While these two molecules are undesirable aroma in ciders for distillation many studies show the implication of the LAB in their production (Li *et al.*, 2020, 2019; Madrera *et al.*, 2008; Mukisa *et al.*, 2017; Tristezza *et al.*, 2016). The work of Mosciano *et al.* (1993) on the description of ethyl lactate defined ethyl lactate as sweet, fruity, bringing notes of pineapple and caramel. This aroma is a desirable marker of the activity of TML in wine and is known to alter organoleptic properties (Kaunzinger *et al.*, 1996). Even if the cider industry tends to limit the production of this molecule in ciders for distillation, its implications in the global complexity aromatic and fruitiness, depending on level of perception and interaction with other aroma, should be further investigated.

5. Conclusion

Cider for distillation and calvados are complex alcoholic beverages produced by fermentation of apple must. Our study highlighted the links between physical-chemical, aromatic and microbial compositions and showed how the spontaneous fermentation was affected by raw material, practices of the producers (size of tanks, choice of apple varieties) and the environment. This work also underlined the impact of the microbial ecosystem of musts in the quality of cider-making, leading to a better understanding of the influence and contribution of yeast and LAB metabolic activities in aroma composition. Additional work on microbial interactions between *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus sp.*, *Saccharomyces* and *Dekkera* should be further investigated.

References

- Al Daccache, M., Koubaa, M., Maroun, R.G., Salameh, D., Louka, N., and Vorobiev, E. (2020).** Impact of the physicochemical composition and microbial diversity in apple juice fermentation process: a review. *Molecules* 25, 3698.
- Alberti, A., Machado dos Santos, T.P., Ferreira Zielinski, A.A., Eleutério dos Santos, C.M., Braga, C.M., Demiate, I.M., and Nogueira, A. (2016).** Impact on chemical profile in apple juice and cider made from unripe, ripe and senescent dessert varieties. *LWT - Food Science and Technology* 65, 436–443.
- Álvarez-Pérez, J.M., Campo, E., San-Juan, F., Coque, J.J.R., Ferreira, V., and Hernández-Orte, P. (2012).** Sensory and chemical characterisation of the aroma of Prieto Picudo rosé wines: The differential role of autochthonous yeast strains on aroma profiles. *Food Chemistry* 133, 284–292.
- Awad, P., Athès, V., Decloux, M.E., Ferrari, G., Snakkers, G., Raguenaud, P., and Giampaoli, P. (2017).** Evolution of volatile compounds during the distillation of cognac Spirit. *J. Agric. Food Chem.* 65, 7736–7748.
- Bartowsky, E.J. et al. (2005).** *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation – moving into the molecular arena. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11, 174–187.
- Belda, I., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., Calderon, F., and Benito, S. (2015).** Dynamic analysis of physiological properties of *Torulaspora delbrueckii* in wine fermentations and its incidence on wine quality. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 1911–1922.
- Bell, S.-J., and Henschke, P.A. (2005).** Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Aust J Grape Wine Res* 11, 242–295.
- Beltran, G., Rozès, N., Mas, A., and Guillamón, J.M. (2007).** Effect of low-temperature fermentation on yeast nitrogen metabolism. *World J Microbiol Biotechnol* 23, 809–815.
- Blanco-Gomis, D., Herrero-Sánchez, I., and Mangas Alonso, J.J. (1998).** Characterisation of apple cider cultivars by chemometric techniques using data from high-performance liquid chromatography and flow-injection analysis. *Analyst* 123, 1187–1191.
- Bokulich, N.A., and Mills, D.A. (2013).** Facility-specific “House” microbiome drives microbial landscapes of artisan cheesemaking plants. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 5214–5223.
- 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 Chemistry* 125, 542–548.
- Cappello, M.S., Zapparoli, G., Logrieco, A., and Bartowsky, E.J. (2017).** Linking wine lactic acid bacteria diversity with wine aroma and flavour. *International Journal of Food Microbiology* 243, 16–27.

Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., and Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Research* 10, 123–133.

Colomer Serra, M., Funch, B., and Forster, J. (2019). The raise of *Brettanomyces* yeast species for beer production. *Current Opinion in Biotechnology* 56, 30–35.

Comitini, F., Ferretti, R., Clementi, F., Mannazzu, I., and Ciani, M. (2005). Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and malolactic bacteria: preliminary characterization of a yeast proteinaceous compound(s) active against *Oenococcus oeni*. *Journal of Applied Microbiology* 99, 105–111.

Coton, M., Laplace, J.M., Auffray, Y., and Coton, E. (2006). “Framboisé” spoilage in French ciders: *Zymomonas mobilis* implication and characterization. *LWT - Food Science and Technology* 39, 972–979.

De Roos, J., Verce, M., Weckx, S., and De Vuyst, L. (2020). Temporal shotgun metagenomics revealed the potential metabolic capabilities of specific microorganisms during lambic beer production. *Front. Microbiol.* 11, 1692.

El Hadi, M., Zhang, F.-J., Wu, F.-F., Zhou, C.-H., and Tao, J. (2013). Advances in fruit aroma volatile research. *Molecules* 18, 8200–8229.

Escribano-Viana, R., González-Arenzana, L., Portu, J., Garijo, P., López-Alfaro, I., López, R., Santamaría, P., and Gutiérrez, A.R. (2018). Wine aroma evolution throughout alcoholic fermentation sequentially inoculated with non-*Saccharomyces*/*Saccharomyces* yeasts. *Food Research International* 112, 17–24.

Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S., Hernandez-Raquet, G., Combes, S., and Pascal, G. (2018). FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* 34, 1287–1294.

Faust K, Raes J. (2016). CoNet app: inference of biological association networks using Cytoscape. *F1000 Res.* 5:1519.

G-Alegria, E., Lopez, I., Ruiz, J.I., Saenz, J., Fernandez, E., Zarazaga, M., Dizy, M., Torres, C., and Ruiz-Larrea, F. (2004). High tolerance of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol. *FEMS Microbiology Letters* 230, 53–61.

Gómez-Rubio, V. et al. (2017). ggplot2 - Elegant Graphics for Data Analysis (2nd Edition). J. Stat. Soft. 77.

Guichard, H., Lemesle, S., Ledauphin, J., Barillier, D., and Picoche, B. (2003). Chemical and sensorial aroma characterization of freshly distilled calvados. 1. evaluation of quality and defects on the basis of key odorants by olfactometry and sensory analysis. *J. Agric. Food Chem.* 51, 424–432.

Guichard, H., Poupard, P., Legoahec, L., Millet, M., Bauduin, R., and Le Quéré, J.-M. (2019). *Brettanomyces anomalus*, a double drawback for cider aroma. *LWT* 102, 214–222.

Hu, K., Jin, G.-J., Xu, Y.-H., and Tao, Y.-S. (2018). Wine aroma response to different participation of selected *Hanseniaspora uvarum* in mixed fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International* 108, 119–127.

Kalinowska, M., Bielawska, A., Lewandowska-Siwkiewicz, H., Priebe, W., and Lewandowski, W. (2014). Apples: Content of phenolic compounds vs. variety, part of apple and cultivation model, extraction of phenolic compounds, biological properties. *Plant Physiology and Biochemistry* 84, 169–188.

Kanter, J.-P., Benito, S., Brezina, S., Beisert, B., Fritsch, S., Patz, C.-D., and Rauhut, D. (2020). The impact of hybrid yeasts on the aroma profile of cool climate Riesling wines. *Food Chemistry: X* 5, 100072.

Kaunzinger, A., Wüst, M., Gröbmiller, H., Burow, S., Hemmrich, U., Dietrich, A., Beck, T., Hener, U., Mosandl, A., and Rapp, A. (1996). Enantiomer distribution of ethyl lactate? a new criterion for quality assurance of wine. *Z Lebensm Unters Forch* 203, 499–500.

Laureys, D., and De Vuyst, L. (2014). Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water kefir fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 2564–2572.

Le Quéré, J.-M., Husson, F., Renard, C.M.G.C., and Primault, J. (2006). French cider characterization by sensory, technological and chemical evaluations. *LWT - Food Science and Technology* 39, 1033–1044.

Ledauphin, J., Le Milbeau, C., Barillier, D., and Hennequin, D. (2010). Differences in the volatile compositions of french labeled brandies (Armagnac, Calvados, Cognac, and Mirabelle) using GC-MS and PLS-DA. *J. Agric. Food Chem.* 58, 7782–7793.

Leser, T.D., Amenuvor, J.Z., Jensen, T.K., Lindecrone, R.H., Boye, M., and Moller, K. (2002). Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 673–690.

Li, C.X., Zhao, X.H., Zuo, W.F., Zhang, T.L., Zhang, Z.Y., and Chen, X.S. (2020). The effects of simultaneous and sequential inoculation of yeast and autochthonous *Oenococcus oeni* on the chemical composition of red-fleshed apple cider. *LWT* 124, 109184.

Li, X., Zhang, X., Jian, H., Xu, X., and Xi, Y. (2019). Biocycle fermentation based on lactic acid bacteria and yeast for the production of natural ethyl lactate. *ACS Omega* 4, 16009–16015.

Liu, J., Liu, M., Ye, P., Lin, F., Huang, J., Wang, H., Zhou, R., Zhang, S., Zhou, J., and Cai, L. (2020). Characterization of major properties and aroma profile of kiwi wine co-cultured by *Saccharomyces* yeast (*S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. uvarum*) and *T. delbrueckii*. *Eur Food Res Technol* 246, 807–820.

Lombardi, S.J., Pannella, G., Iorizzo, M., Testa, B., Succi, M., Tremonte, P., Sorrentino, E., Di Renzo, M., Strollo, D., and Coppola, R. (2020). Inoculum strategies and performances of malolactic starter *Lactobacillus plantarum* m10: impact on chemical and sensorial characteristics of Fiano wine. *Microorganisms* 8, 516.

Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15, 550.

- Ly, S., Mith, H., Tarayre, C., Taminiau, B., Daube, G., Fauconnier, M.-L., and Delvigne, F. (2018).** Impact of microbial composition of cambodian traditional dried starters (Dombea) on flavor compounds of rice wine: combining amplicon sequencing with HP-SPME-GCMS. *Front. Microbiol.* 9, 894.
- Lytra, G., Miot-Sertier, C., Moine, V., Coulon, J., and Barbe, J.-C. (2020).** Influence of must yeast-assimilable nitrogen content on fruity aroma variation during malolactic fermentation in red wine. *Food Research International* 135, 109294.
- Madrera, R.R., Hevia, A.G., García, N.P., and Valles, B.S. (2008).** Evolution of aroma compounds in sparkling ciders. *LWT - Food Science and Technology* 41, 2064–2069.
- Maicas, S., Gil, J.-V., Pardo, I., and Ferrer, S. (1999).** Improvement of volatile composition of wines by controlled addition of malolactic bacteria. *Food Research International* 32, 491–496.
- McMurdie, P.J., and Holmes, S. (2013).** phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE* 8, e61217.
- Mendes-Ferreira, A., Barbosa, C., Lage, P., and Mendes-Faia, A. (2011).** The impact of nitrogen on yeast fermentation and wine quality. *Ciência Téc. Vitiv.* 26, 17–32.
- Misery, B., Legendre, P., Rue, O., Bouchart, V., Guichard, H., Laplace, Jm., and Cretenet, M. (2021).** Diversity and dynamics of bacterial and fungal communities in cider for distillation. *International Journal of Food Microbiology* 108987.
- Moreno-Arribas *et al.* (2009).** Biochemical transformations produced by malolactic fermentation. M.V. Moreno-Arribas, M.C. Polo (Eds.), *Wine chemistry and Biochemistry*, Springer, New York, pp. 27-58.
- Mosciano G., Fasano M., Cassidy J., Connelly K., Mazeiko P., Montenegro A. (1993).** Organoleptic characteristics of flavour materials. *Perfum Flavor* 1993;18: 38-41.
- Mukisa, I.M., Byaruhanga, Y.B., Muyanja, C.M.B.K., Langsrud, T., and Narvhus, J.A. (2017).** Production of organic flavor compounds by dominant lactic acid bacteria and yeasts from *Obushera*, a traditional sorghum malt fermented beverage. *Food Sci Nutr* 5, 702–712.
- Nilsson, R.H., Larsson, K.-H., Taylor, A.F.S., Bengtsson-Palme, J., Jeppesen, T.S., Schigel, D., Kennedy, P., Picard, K., Glöckner, F.O., Tedersoo, L., *et al.* (2019).** The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Research* 47, D259–D264.
- Nsongning Dongmo, S., Procopio, S., Sacher, B., and Becker, T. (2016).** Flavor of lactic acid fermented malt based beverages: Current status and perspectives. *Trends in Food Science & Technology* 54, 37–51.
- Nsongning Dongmo, S., Sacher, B., Kollmannsberger, H., and Becker, T. (2017).** Key volatile aroma compounds of lactic acid fermented malt based beverages – impact of lactic acid bacteria strains. *Food Chemistry* 229, 565–573.

Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., and Cotter, P.D. (2012). High-throughput sequencing for detection of subpopulations of bacteria not previously associated with artisanal cheeses. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 5717–5723.

Rita, R.-D., Zanda, K., Daina, K., and Dalija, S. (2011). Composition of aroma compounds in fermented apple juice: effect of apple variety, fermentation temperature and inoculated yeast concentration. *Procedia Food Science* 1, 1709–1716.

Rosend, J., Kuldj  r  v, R., Rosenvald, S., and Paalme, T. (2019). The effects of apple variety, ripening stage, and yeast strain on the volatile composition of apple cider. *Heliyon* 5, e01953.

Salih, A.G., Qu  r  , J.-M.L., Drilleau, J.-F., and Fernandez, J.M. (1990). Lactic acid bacteria and malolactic fermentation in the manufacture of spanish cider. *Journal of the Institute of Brewing* 96, 369–372.

Sánchez, A., Coton, M., Coton, E., Herrero, M., García, L.A., and Díaz, M. (2012). Prevalent lactic acid bacteria in cider cellars and efficiency of *Oenococcus oeni* strains. *Food Microbiology* 32, 32–37.

Sauvageot, N., Gouffi, K., Laplace, J.-M., and Auffray, Y. (2000). Glycerol metabolism in *Lactobacillus collinoides*: production of 3-hydroxypropionaldehyde, a precursor of acrolein. *International Journal of Food Microbiology* 55, 167–170.

Soden, A., Francis, I.L., Oakey, H., and Henschke, P.A. (2000). Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. *Aust J Grape Wine Res* 6, 21–30.

  u  ur, S.,   ade  , N., and Ko  merl, T. (2016). Volatile phenols in wine: Control measures of *Brettanomyces/Dekkera* yeasts. *Acta Agric. Slov.* 107, 453.

Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A., and Pretorius, I.S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust J Grape Wine Res* 11, 139–173.

Swings, J., and De Ley, J. (1977). The biology of *Zymomonas*. *Bacteriological Reviews* 41, 1–46.

Temudo, M.F., Muyzer, G., Kleerebezem, R., and van Loosdrecht, M.C.M. (2008). Diversity of microbial communities in open mixed culture fermentations: impact of the pH and carbon source. *Appl Microbiol Biotechnol* 80, 1121–1130.

Tristezza, M., di Feo, L., Tufariello, M., Grieco, F., Capozzi, V., Spano, G., Mita, G., and Grieco, F. (2016). Simultaneous inoculation of yeasts and lactic acid bacteria: Effects on fermentation dynamics and chemical composition of Negroamaro wine. *LWT - Food Science and Technology* 66, 406–412.

Ugliano, M., Fedrizzi, B., Siebert, T., Travis, B., Magno, F., Versini, G., and Henschke, P.A. (2009). Effect of nitrogen supplementation and *Saccharomyces* species on hydrogen sulfide and other volatile sulfur compounds in shiraz fermentation and wine. *J. Agric. Food Chem.* 57, 4948–4955.

Vanbeneden, N., Gils, F., Delvaux, F., and Delvaux, F.R. (2008). Formation of 4-vinyl and 4-ethyl derivatives from hydroxycinnamic acids: Occurrence of volatile phenolic flavour

compounds in beer and distribution of Pad1-activity among brewing yeasts. *Food Chemistry* 107, 221–230.

Vigentini, I., Romano, A., Compagno, C., Merico, A., Molinari, F., Tirelli, A., Foschino, R., and Volonterio, G. (2008). Physiological and oenological traits of different strains under wine-model conditions. *FEMS Yeast Research* 8, 1087–1096.

Wei, J., Wang, S., Zhang, Y., Yuan, Y., and Yue, T. (2019). Characterization and screening of non-*Saccharomyces* yeasts used to produce fragrant cider. *LWT* 107, 191–198.

Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., and Lane, D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173, 697–703.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. In *PCR Protocols*, (Elsevier), pp. 315–322.

Williams, A.A. et al. (1974). Flavour research and the cider industry. *Journal of the Institute of Brewing* 80, 455–470.

Wiśniewska, P., Dymerski, T., Wardencki, W., and Namieśnik, J. (2015). Chemical composition analysis and authentication of whisky: Chemical composition analysis and authentication of whisky. *J. Sci. Food Agric.* 95, 2159–2166.

Xu, Y., Zhao, G.A., and Wang, L.P. (2006). Controlled formation of volatile components in cider making using a combination of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora valbyensis* yeast species. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33, 192–196.

Ye, N.-F., Lü, F., Shao, L.-M., Godon, J.-J., and He, P.-J. (2007). Bacterial community dynamics and product distribution during pH-adjusted fermentation of vegetable wastes. *Journal of Applied Microbiology* 103, 1055–1065.

Table A1. List of aromatic compounds analysed in this study.

Esters			Alcohols			Aldehydes			Phenols volatils		
molecule name	N° CAS	Identification method	molecule name	N° CAS	Identification method	molecule name	N° CAS	Identification method	molecule name	N° CAS	Identification method
Ethyl propionate	105-37-3	GC-MS	6-methyl-5-hepten-2-ol	1569-60-4	GC-MS	Nonanal	124-19-6	GC-MS	Ethylguaiaicol	2785-89-9	LC-UV
Methyl butyrate	623-42-7	GC-MS	4-vinyl anisol	637-69-4	GC-MS	Decanal	112-31-2	GC-MS	4-Ethylphenol	123-07-9	LC-UV
Ethyl isobutyrate	97-62-1	GC-MS	1-Octanol	111-87-5	GC-MS	Isobutanol	78-84-2	GC-FID	4-Ethylcatechol	1124-39-6	LC-UV
Ethyl 2-methylbutyrate	7452-79-1	GC-MS	3-Pentanol	584-02-1	GC-FID	Ethanal	75-07-0	GC-FID	Vinylguaiaicol	7786-61-0	LC-UV
Ethyl isovalerate	108-64-5	GC-MS	1-Pentanol	71-41-0	GC-FID	Acrolein	107-02-8	GC-FID	4-Vinylphenol	2628-17-3	LC-UV
Pentyl acetate	628-63-7	GC-MS	1-Octen-3-ol	3391-86-4	GC-FID	Acetal		GC-FID			
Ethyl caproate	123-66-0	GC-MS	Cis-3-hexen-1-ol	928-96-1	GC-FID	Methanol	67-56-1	GC-FID			
Cis-hexenyl acetate	3681-71-8	GC-MS	Butanol-2	78-92-2	GC-FID	Furfural	98-01-1	GC-FID			
Isoamyl caprylate	2035-99-6	GC-MS	Propanol-1	71-23-8	GC-FID						
Isoamyl laurate	6309-51-9	GC-MS	Isobutanol	78-83-1	GC-FID						
Phenylethyl caprylate	5457-70-5	GC-MS	Allylic alcohol	107-18-6	GC-FID						
Ethyl palmitate	628-97-7	GC-MS	Butanol-1	71-36-3	GC-FID						
Ethyl stearate	111-61-5	GC-MS	Methyl-2-butanol-1	137-32-6	GC-FID						
Phenylethyl caproate	6290-37-5	GC-MS	Methyl-3-butanol-1	123-51-3	GC-FID						
Isobutyl acetate	110-19-0	GC-MS	Hexanol-1	203-852-3	GC-FID						
Ethyl valerate	539-82-2	GC-MS	Phenyl-2-ethanol	60-12-8	GC-FID						
Ethyl heptanoate	106-30-9	GC-MS									
Ethyl benzoate	93-89-0	GC-MS									
Ethyl 3-(methylthio)propionate	13327-56-5	GC-MS									
Butyl acetate	123-86-4	GC-FID									
Ethyl-3-hydroxybutyrate	5405-41-4	GC-FID									
Ethyl-2-hydroxycaproate	52089-55-1	GC-FID									
2-Phenylethyl acetate	103-45-7	GC-FID									
Isoamyl caprate	2306-91-4	GC-FID									
Isobutyl caprate	30673-38-2	GC-FID									
Ethyl acetate	141-78-6	GC-FID									
Ethyl butyrate	105-54-4	GC-FID									
Hexyl acetate	142-92-7	GC-FID									
Ethyl lactate	687-47-8	GC-FID									
Isoamyl acetate	123-92-2	GC-FID									
Diethyl succinate	123-25-1	GC-FID									
Ethyl furoate	614-99-3	GC-FID									
Ethyl caprylate	106-32-1	GC-FID									
Ethyl caprate	110-38-3	GC-FID									
Ethyl laurate	106-33-2	GC-FID									
Ethyl myristate	124-06-1	GC-FID									
Ethyl formate	109-94-4	GC-FID									
Phenylethyl acetate	103-45-7	GC-FID									

Chapitre III

Comparaison des productions cidricoles chez les producteurs et en atelier pilote

Un des objectifs du projet MoNArC était de comparer l'évolution de cidres de distillation à partir du même moût mais fermenté selon deux conditions différentes : 10 cuves chez les producteurs et 10 cuves contrôlées à l'ARAC (Association de Recherche Appliquée à la transformation Cidricoles) dans un plan pilote. Pour cela, 200 litres de moûts de chaque cuve des dix producteurs ont été collectés au moment du pressage et stockés dans des conditions contrôlées en laboratoire (ARAC) jusqu'à un minimum de 3 mois après la fin de la fermentation alcoolique. Les cuves contrôlées ont été nommées Ab, Bb, C1b, C2b, D1b, D2b, C3b, E1b, E2b, Fb. Les mêmes analyses microbiennes, physico-chimiques et aromatiques ont été effectuées pendant la fermentation, comme décrites dans les chapitres I et II.

Aucune différence entre les compositions bactériennes des cuves des producteurs et celles de l'ARAC n'a été constatée en début de fermentation. Cependant, des différences de composition levuriennes ont été observées en début de fermentation, suggérant que le transfert dans une nouvelle cuve à l'ARAC aurait permis une oxygénation du moût. Cette oxygénation peut expliquer en partie le ralentissement de la fermentation des cuves à l'ARAC en comparaison des fermentations observées dans les cuves des producteurs.

En fin de fermentation alcoolique, les compositions bactériennes entre les cuves des producteurs et de celles de l'ARAC ne diffèrent pas. Quant aux levures, la fermentation alcoolique a eu tendance à effacer les différences de diversité entre les producteurs et les cuves ARAC observées en début de fermentation par l'implantation de *Saccharomyces sp.* et *Dekkera sp.*. Une proportion plus élevée de *Kazachstania sp.* a été néanmoins observée pour les cuves D1b et D2b par rapport aux cuves D1 et D2. De plus, une augmentation de la proportion en *Dekkera sp.* pour les cuves Ab, C2b, E1b et Fb. En fin de maturation, une plus grande proportion en bactéries acétiques (*Gluconobacter sp.*, *Acetobacter sp.* et *Komagataeibacter sp.*) et en *Dekkera sp.* a été constatée pour les cuves de l'ARAC. Lors de cette période, une proportion en *Kregervanrija sp.* a été observée en plus grande abondance dans toutes les cuves de l'ARAC par rapport à celles des producteurs. Cette spécificité peut indiquer que ces levures proviennent de l'environnement de travail à l'ARAC plutôt que du moût. La distribution des cuves de l'ARAC selon leur composition bactérienne est similaire à celle obtenue avec les cuves des producteurs, sauf pour les cuves E1/E1b et E2/E2b. En effet, une proportion plus élevée en LAB pour les cuves E1b et E2b que pour les cuves E1 et E2 a été constatée.

Aucune différence physico-chimique entre les cuves des producteurs et celles des laboratoires n'a été observée. Même si la composition aromatique paraît différente entre les

deux conditions, la grande variabilité entre les cuves ne nous a pas permis d'établir de liens entre la composition microbienne et la complexité aromatique des cuves.

Cette étude a permis de confirmer les résultats du chapitre II en confortant nos découvertes en étudiant le même moût dans deux conditions de fermentation. Peu de différences entre la fermentation contrôlée à l'ARAC et celle chez les producteurs ont été observées. Les quelques différences soulignées peuvent avoir pour origine l'oxygénation suite au transfert du moût ou encore de l'ensemencement microbien lié à l'environnement de travail à l'ARAC, mais d'autres travaux doivent être effectués pour explorer ces deux paramètres. Enfin, la modulation de la température ou de la taille de la cuve n'a pas suffi à contrôler la fermentation spontanée qui a eu lieu soulignant l'importance de la qualité et du choix du mélange de pommes dans la production de calvados.

Comparison of microbial dynamics and distillates at laboratory and industrial scales

B. MISERY^a, P. LEGENDRE^b, JC. DECHATRE^c, JP. SIMON^c, V. BOUCHART^b, H. GUICHARD^d, JM. LAPLACE^a and M. CRETENET^a

^a Normandie Univ, UNICAEN, UNIROUEN, ABTE ,14000 Caen, France

^b LABÉO Frank Duncombe, 1 Route de Rosel, 14053 Caen Cedex 4, France

^c Association de Recherche Appliquée à la transformation Cidricoles, Le Robillard 14170 L'Oudon, France

^d Institut Français des Produits Cidricoles (IFPC), Domaine de la Motte 35653 Le Rheu, France

One of the objectives of the MoNArC project was to compare the evolution of ciders for distillation starting from the same must but fermented at two different scales and conditions: 10 tanks at the producers and 10 tanks controlled by ARAC in their pilot plan. 200L of musts of each tank from the ten producers were collected at pressing time and stored in controlled condition in ARAC laboratory until a minimum of 3 months after the end of the alcoholic fermentation. These tanks were named Ab, Bb, C1b, C2b, D1b, D2b, C3b, E1b, E2b, Fb. The same microbial, physical-chemical and aromatic analyses during fermentation were performed as described in the Chapter II. The duration of the fermentation process, the duration of the maturation period, the volumes of the tanks and the producer location are given in Table 1. Tanks from ARAC had a higher fermentation rate until the end of alcoholic fermentation compared to those of producers, except for the tanks E1b and E2b.

Table 1. Duration, average outside temperature, volume data and location of cider tanks from producers and in controlled condition.

Tanks	Fermentation Initiation (I)	Alcoholic Fermentation (F)	Maturation period (M)	Temperature I (°C)	Temperature F (°C)	Temperature M (°C)	Tanks volume (hL)	Location
A	25/10/2017	8 weeks	11 weeks	13.7	6.3	16.8	7500	Pays d'Auge. Calvados
Ab	25/10/2017	4 weeks	12 weeks	15.0	8.2	20	2	
B	26/10/2017	6 weeks	14 weeks	13.7	6.3	16.8	1300	Pays d'Auge. Orme
Bb	26/10/2017	6 weeks	12 weeks	15.0	6.3	20	2	
C1	23/10/2017	9 weeks	6 weeks	13.4	7.2	15.3	60	Cotentin. Manche
C1b	23/10/2017	6 weeks	12 weeks	15.0	7.2	20	2	
C2	08/11/2017	6 weeks	7 weeks	13.4	7.2	15.3	60	Cotentin. Manche
C2b	08/11/2017	7 weeks	21 weeks	15.0	7.5	20	2	
C3	19/11/2018	16 weeks	14 weeks	12.57	7.81	11.52	60	Cotentin. Manche
C3b	19/11/2018	8 weeks	22 weeks	12.57	11.52	14.16	2	
D1	19/10/2017	6 weeks	11 weeks	13.8	7.1	18.2	1200	Sud Manche
D1b	19/10/2017	6 weeks	20 weeks	15.0	8.7	20	2	
D2	09/11/2017	7 weeks	22 weeks	13.8	7.1	18.2	1200	Sud Manche
D2b	09/11/2017	6 weeks	21 weeks	15.0	7.1	20	2	
E1	05/10/2018	11 weeks	12 weeks	12.9	7.51	7.58	60	Pays d'Auge. Calvados
E1b	05/10/2018	30 weeks	2 weeks	12.9	7.51	16.61	2	
E2	23/11/2018	12 weeks	6 weeks	12.9	7.51	8.72	57	Pays d'Auge. Calvados
E2b	23/11/2018	16 weeks	12 weeks	12.9	8.72	16.61	2	
F	16/11/2018	22 weeks	2 weeks	12.9	8.94	9.76	100	Bessin. Calvados
Fb	16/11/2018	26 weeks	8 weeks	12.9	10.42	15.27	2	

Outside temperatures for the controlled tanks were similar to those of the producers at I and F. The temperature was higher in controlled tanks than from the tanks of producers at M. The Figure 1 and 2 presents the bacterial and fungal composition of all the 20 tanks (10 from the producers and 10 from ARAC).

No difference between bacterial compositions of the producers tanks and the ones from ARAC was found at I (Figure 1). On the other end, fungal communities from the same must were different between producer and ARAC tanks at I (Figure 2). This result may indicate that, even if we took all the precautions possible, the transfer of the must from the producer to the ARAC site was too long between allowing a greater oxygenation. Yeast were more sensitive to these modifications and therefore, it was only visible at their level. This oxygenation during transfer can also explained that the duration until fermentations rates until the end of alcoholic fermentation were superior in ARAC tanks. At F and M, no significant differences were found in bacterial composition between the condition except for the tanks E1/E1b and D2/D2b. A lower proportion of *Serratia sp.* and a higher proportion of *Oenococcus sp.* were found in tank E1b than in tank E1. A higher proportion of *Oenococcus sp.* was observed in tank D2b at F than in the tank D2 with higher proportion of the acetic acid bacteria at M for the tank D2b. At M, all ARAC tanks had a higher proportion of acetic acid bacteria (AAB) such as *Gluconobacter*, *Acetobacter* and *Komagataibacter sp.* compared to their counterpart from the producer. As for the yeasts, alcoholic fermentation tended to erase the differences of diversity between producers

and ARAC tanks observed at I with the implantation of *Saccharomyces sp.* and *Dekkera sp.*. However, at F, a higher proportion of *Kazachstania sp.* was observed for the tanks D1b and D2b compared to D1 and D2 tanks and increase of *Dekkera sp.* population was observed for the ARAC tanks Ab, C2b, E1b and Fb, while this proportion remains stable for tanks Bb, D1b, D2b and E2b. This tendency is reinforced at M with a higher proportion of *Dekkera sp.* for all ARAC tanks, except the C1b tank. Interestingly, *Kregervanrija sp.* was in higher abundance in all ARAC tanks compared to those from producers. Its specific abundance in all ARAC tanks may indicate that these yeast came from the ARAC environment rather than the must.

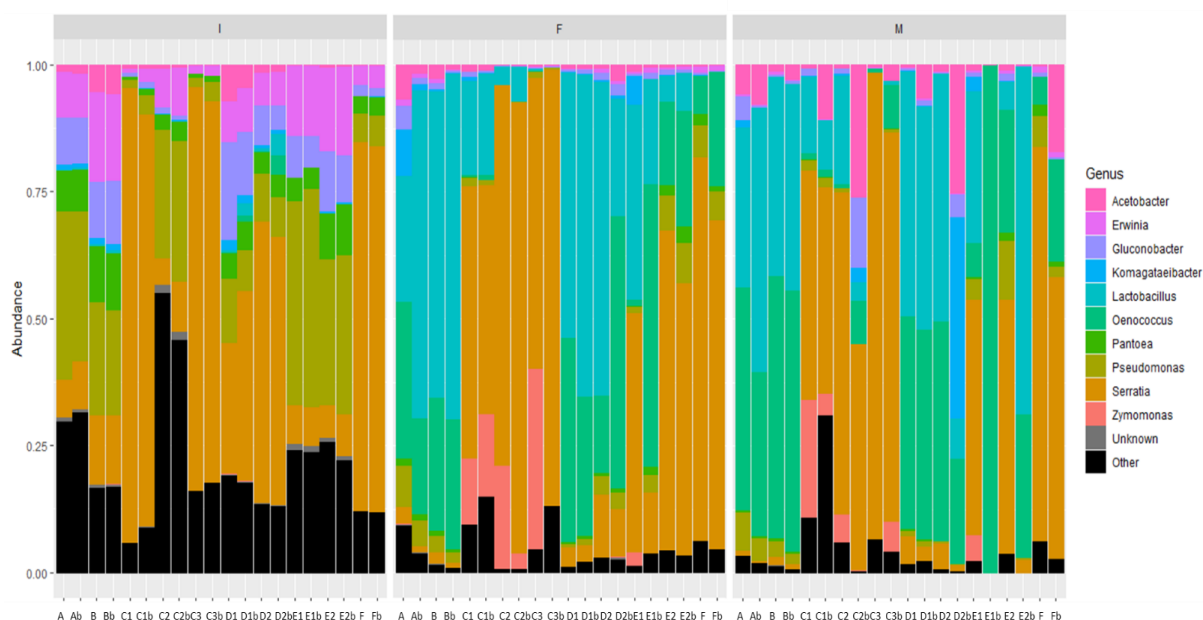


Figure 1. Phylogenetic taxonomy for bacterial communities showing dynamic changes at the genus level during cider fermentation of producer tanks (A, B, C1, C2, D1, D2, E1, E2 and F) and the cider fermentation in controlled-temperature conditions (Ab, Bb, C1b, C2b, D1b, D2b, E1b, E2b and Fb.)

The distribution of the controlled tanks and the tanks from producers according to their microbial composition was displayed in MDS/PCoA (Figure 3). According to the bacterial composition, the tanks A/Ab/B/Bb/D1/D1b/D2/D2b/E1b/E2b were differently distributed than tanks E1/E2/C1/C1b/C2/C2b/C3/C3b/F/Fb. The difference between these two groups was a higher abundance of lactic acid bacteria (LAB) for the first group and of *Enterobacteriaceae* (*Serratia sp.*) for the second group. The distribution of ARAC tanks according to their bacterial composition is similar as the one obtained with the producer tanks only, except for the tanks E1/E1b and E2/E2b. A higher presence of LAB was found for E1b and E2b compared to the tanks E1 and E2. A higher proportion of the AAB was observed at M for ARAC tanks. As assumed at I, a higher oxygenation in the smaller tanks of ARAC seemed to encourage the growth of AAB, even if the global bacterial dynamics between the two conditions were similar.

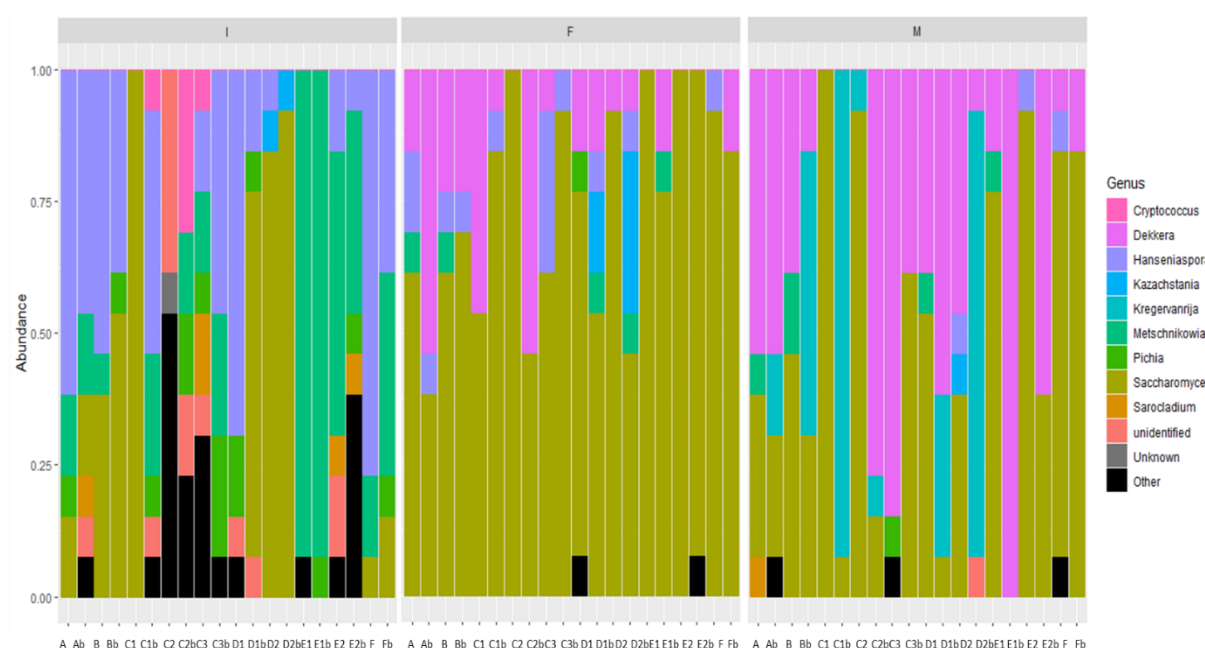


Figure 2. Phylogenetic taxonomy for fungal communities showing dynamic changes at the genus level during cider fermentation of producer tanks (A, B, C1, C2, D1, D2, E1, E2 and F) and the cider fermentation in controlled-temperature conditions (Ab, Bb, C1b, C2b, D1b, D2b, E1b, E2b and Fb).

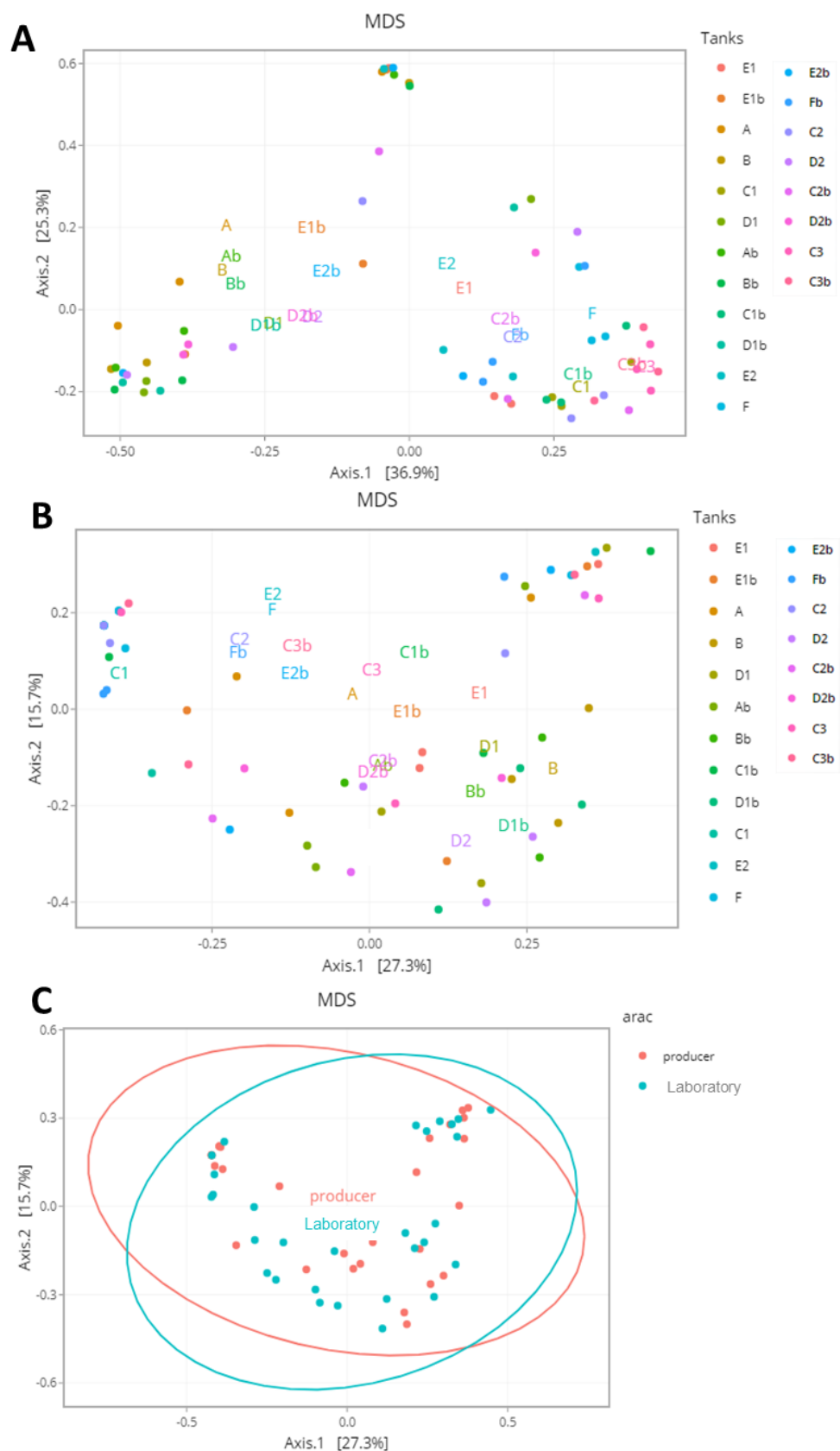


Figure 3. MDS/PCoA representing A) bacterial and B) fungal OTUS distribution according to tanks and C) microbial composition according to the two conditions of fermentation.

The Kruskal-Wallis test was performed in order to establish the differences of physical chemical composition between the tanks of producers and those in laboratory. As for microbial communities, no significant difference in aromatic composition and physical-chemical characteristics of ciders for distillation was observed between the ARAC and producer tanks at F and M. The distribution of the tanks according to their aroma composition and physical-chemical characteristics was displayed by PCA and did not show significant differences between the ARAC and producer tanks (Figure 4). The tanks Ab, C1b, E1b and Fb were differently distributed than the other tanks. As found in the Chapter II, the tanks A/B/D2 were differently distributed according to higher values of ethyl lactate and D-lactic acid. However, the tank D1 was not grouped with these three tanks. No correlation was found between the high proportion of *Dekkera sp.* and phenol volatile in tanks Ab, C1b, E1b and Fb. When aromatic composition of the distillates is compared rather than the one from ciders for distillation, the tanks of the producers A/B/D producers are grouped with a larger aromatic complexity and confirm the link with the higher proportion of LAB in these tanks (Figure 5). A difference in aromatic composition may be distinguished between ARAC and producer tanks but the variables on the PCA explained only 38% of the variability that made difficult to go further in this comparison.

The objective of the comparison between ARAC and producer tank was to observe the differences of microbial, physical-chemical and aromatic composition of ciders for distillation and distillates. On one hand, the study confirmed the results of chapter II comforting our findings when studying the same must in two fermentations conditions. On the other hand, few differences between more controlled conditions at ARAC and the ones at producers could be highlighted. These differences may have for origin oxygenation and microbial enrichment but further work needs to be done to explore these two parameters. Finally, the modulation of the temperature or the size of the tank were not enough to control the spontaneous fermentation that took place stressing the importance of the quality and choice of apple blend in the production of calvados.

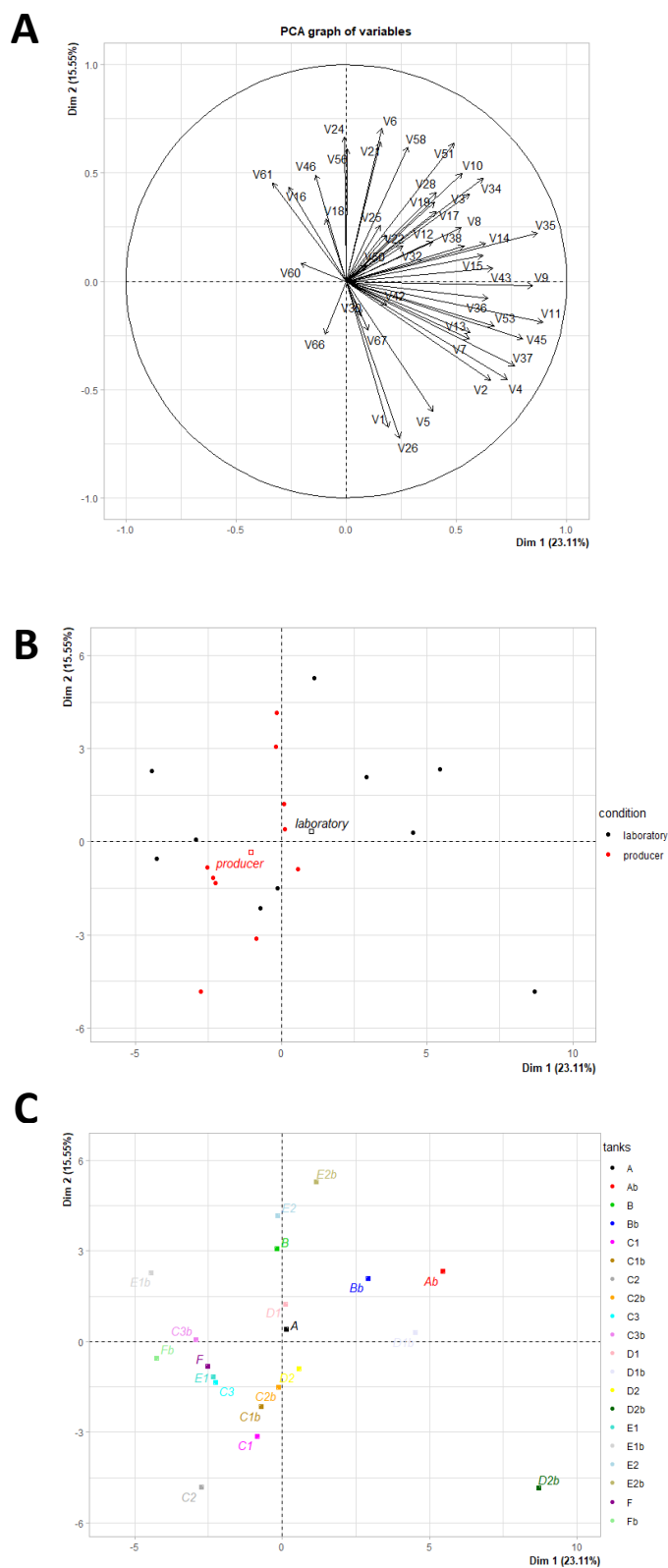


Figure 5. Principal component analysis of the aromatic composition of calvados. The distribution was displayed according to (B) the control condition C) the tanks.

Supplemental data: Ciders characteristics of ciders in controlled condition Ab, Bb, C1b, C2b, C3b, D1b, D2b, E1b, E2b and Fb.

Parameters		Density	Fructose	Glucose	Sucrose	Total sugar	Alcoholic level	Glycerol	pH	Nitrogen content	Total acidity	Volatile acidity	L-malic acid	L-lactic acid	D-Lactic acid
		(kg/m ³)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L sucrose)	(% v/v)	(g/L)	(UpH)	(mg/L)	(g/L H2SO4)	(g/L H2SO4)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
Fermentation initiation (I)	Ab	1043.40	68.90	23.70	10.20	98.17	<1.0	0.26	3.95	35.31	1.51	0.15	2.27	< 0.1	< 0.1
	Bb	1047.57	63.90	20.50	25.60	105.78	<1.0	0.15	3.98	77.34	1.47	0.12	2.59	0.074	< 0.1
	C1b	1049.96	68.00	20.70	29.30	113.57	< 1.0	< 1.0	4.01	53.80	1.43	0.12	2.42	< 0.1	< 0.1
	C2b	1052.40	71.80	19.70	29.80	116.73	1.1	< 1.0	3.93	67.53	1.69	0.03	3.51	< 0.1	< 0.1
	C3b	1055.22	79.87	18.53	24.94	118.43	< 1.0	< 1.0	4.28	55.00	0.88	0.05	1.74	< 0.1	< 0.1
	D1b	1039.32	58.10	16.60	18.10	89.07	< 1.0	0.57	3.82	23.26	1.72	0.21	2.52	0.21	0.08
	D2b	1035.42	57.80	16.90	9.40	80.37	1.1	1.03	3.8	16.81	1.75	0.27	2.14	0.42	0.14
	E1b	1052.58	86.11	21.51	16.25	118.49	< 1.0	< 1.0	4.12	61.00	1.95	0.05	3.66	< 0.1	< 0.1
	E2b	1058.01	68.85	21.60	28.68	114.61	< 1.0	< 1.0	4.28	113.00	1.38	0.05	2.81	< 0.1	< 0.1
	Fb	1061.68	91.78	24.99	16.32	127.25	< 1.0	< 1.0	4.27	53.00	1.07	0.08	2.00	< 0.1	< 0.1
Alcoholic Fermentation (F)	Ab	998.72	2.10	< 1.0	< 1.0	1.99	4.60	5.98	3.9	8.41	1.95	0.43	< 0.1	1.28	1.26
	Bb	1004.20	12.51	< 1.0	< 1.0	11.88	4.06	5.67	3.9	0	2.49	0.56	< 0.1	1.44	1.58
	C1b	1002.72	-	-	-	-	-	6.24	4.1	0	2.56	X	< 0.1	1.07	0.15
	C2b	1031.24	59.27	10.47	< 1.0	66.25	2.30	2.70	3.94	0	2.45	0.51	< 0.1	0.40	< 0.1
	C3b	1046.37	77.64	20.67	7.13	100.52	1.09	1.61	4.28	30.00	1.53	0.35	< 0.1	0.27	0.03
	D1b	1006.09	17.24	1.34	< 1.0	17.65	4.25	4.77	3.90	0	2.5	0.81	< 0.1	1.65	1.48
	D2b	1009.98	26.50	2.50	< 1.0	27.55	3.00	4.28	3.97	6.16	2.12	0.46	< 0.1	1.84	0.59
	E1b	1001.47	5.32	<1.0	<1.0	5.05	4.64	6.64	4.16	25.00	2.05	0.54	< 0.1	2.29	0.33
	E2b	1001.93	4.51	<1.0	<1.0	4.28	4.89	7.26	3.98	22.00	2.59	0.19	0.48	2.32	0.27
	Fb	998.88	4.27	<1.0	<1.0	4.06	4.99	8.38	4.22	31.00	2.17	0.29	< 0.1	1.77	0.21
Maturation (M)	Ab	997.10	< 1.0	< 1.0	< 1.0	<1.0	3.20	6.03	3.83	0	3.19	1.18	< 0.1	1.45	2.02
	Bb	998.86	1.90	< 1.0	< 1.0	1.80	4.30	6.31	3.86	0	3.38	1.26	< 0.1	1.95	2.21
	C1b	998.04	1.10	< 1.0	< 1.0	1.04	3.70	6.87	4.07	0	2.68	0.50	< 0.1	1.24	0.25
	C2b	1004.86	13.20	< 1.0	< 1.0	12.60	3.50	6.13	4.12	0	3.37	1.10	< 0.1	0.66	0.40
	C3b	999.58	6.06	<1.0	<1.0	5.76	3.68	7.26	4.07	32.00	2.81	0.91	< 0.1	0.77	0.35
	D1b	999.17	2.88	< 1.0	< 1.0	2.74	4.88	5.46	3.73	0	3.94	1.65	< 0.1	1.76	2.43
	D2b	997.16	< 1.0	< 1.0	< 1.0	<1.0	2.73	5.62	3.77	0	4.21	2.32	< 0.1	1.53	1.87
	E1b	999.45	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	4.89	6.93	4.15	12.00	2.04	0.82	< 0.1	2.17	0.76
	E2b	998.52	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	2.06	7.55	3.92	23.00	3.85	1.59	< 0.1	2.64	1.82
	Fb	997.08	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	5.27	8.61	4.08	18.00	2.28	0.42	< 0.1	2.00	0.40

Chapitre IV

Dégradation du glycérol chez les souches de *Lactobacillus* isolées de cidre de distillation

A l'issue de la fermentation alcoolique et de la transformation malolactique, les cidres arborent une flore lactique abondante et diversifiée. Cette flore lactique peut alors métaboliser les sources de carbone résiduelles, qu'il s'agisse du fructose du glycérol ou de l'acide lactique, et ainsi être à l'origine d'altérations dont la piquûre acroléique. La piquûre acroléique demeure l'une des principales préoccupations de la filière cidricole. Comprendre et définir les conditions d'apparition de cette altération constituent donc un enjeu majeur pour les producteurs de cidre. La production d'acroléine est étroitement liée au métabolisme du glycérol par des LAB appartenant majoritairement au genre *Lactobacillus*. Bien que *L. collinoides* soit décrite comme la principale bactérie responsable de la dégradation du glycérol dans les cidres, l'opéron responsable de cette activité (opéron *pdu*) est retrouvé avec une forte similarité chez *L. diolivorans* et *L. brevis*.

Une collection de souches de *Lactobacillus* isolées des cidres de distillation a été générée. Parmi elles, une grande majorité a été identifiée comme *L. collinoides* (70 souches sur 72), suivie par une souche de *L. brevis* et une souche de *L. diolivorans*. Nous avons pu identifier deux types d'opéron *pdu* : l'un similaire à celui de la souche de *L. collinoides* de référence LMG18850 (qualifié de type I), connue pour dégrader le glycérol et le second (qualifié de type II) associé à la souche de *L. collinoides* de référence DSM20515^T, qui ne dégrade pas le glycérol. Parmi les 70 souches de *L. collinoides*, 41 souches possèdent l'opéron de type I et 39 le type II. Toutes les souches possédant l'opéron de type I sont capables de dégrader le glycérol alors que 31% des souches possédant l'opéron de type II en sont totalement incapables. Ainsi, 3 profils génétiques et métaboliques ont pu être mis en évidence. Les souches *L. diolivorans* UCMA16955 et *L. brevis* UCMA20661 (opéron de type I) sont également capables de métaboliser le glycérol.

Les premiers travaux de ce chapitre présentent les liens entre la production d'acroléine et la présence de *L. collinoides* lors de la fermentation des dix cidres à distiller analysés (les mêmes que ceux du chapitre II). Un lien se dégage entre la présence de *L. collinoides* lors de la fermentation et la production d'acroléine dans les distillats. Cependant, le faible taux d'acroléine et les différents profils de *L. collinoides* observés nous amènent à penser que la présence de cette espèce au sein du cidre ne suffit pas à évaluer le risque de piquûre acroléique. De plus, les quantités en acroléine observées dans certains distillats peuvent être parfois plus importantes en fin de fermentation alcoolique qu'en fin de maturation. Ainsi la dégradation du

glycérol, bien que souvent annoncée en fin de maturation, pourrait avoir lieu plus précocement dans certaines conditions.

Ces travaux nous ont naturellement amenés à étudier l'impact des paramètres physico-chimiques sur le métabolisme du glycérol pour les trois profils. Les souches de *L. collinoides* UCMA15355 (opéron type II, capable de dégrader le glycérol), UCMA20075 (opéron type II, incapable de dégrader le glycérol), *L. collinoides* UCMA20009, *L. diolivorans* UCMA16955 et *L. brevis* UCMA20661 (type I, dégradant le glycérol) ont été choisies dans la construction d'un plan expérimental (D-optimal) à 6 facteurs (glucose, fructose, azote, éthanol, acide malique, pH) et trois niveaux.

Les résultats montrent que la souche *L. collinoides* UCMA20009 (type I) est capable de dégrader le glycérol tant dans des conditions favorables (pH élevé, fortes concentrations en sucre, présence d'azote et d'acide malique, peu d'éthanol), que défavorables (faible concentration de sucres, fort taux d'éthanol, pH relativement bas). La dégradation du glycérol par l'enzyme glycérol déshydratase est confirmée par la production de 1,3-propanediol (1,3-PDL), produit final du métabolisme du glycérol. Pour les souches possédant l'opéron de type II, les résultats montrent que ce profil génétique est moins "efficace" quant à la dégradation du glycérol. Dans toutes les conditions testées, la souche *L. collinoides* UCMA20075 (type II) est incapable de métaboliser le glycérol. Cependant, la souche *L. collinoides* UCMA15355 (type II) est malgré tout capable de dégrader le glycérol mais dans des conditions particulières réunissant de fortes concentrations en sucres, azote et acide malique, un pH élevé et sans éthanol. De plus, la consommation en glycérol dans ces uniques conditions ne dépasse pas les 36 % pour cette souche alors qu'elle peut être complète chez la souche possédant l'opéron de type I.

Ce travail montre que la compréhension des mécanismes de production en acroléine dans les cidres reste une réelle problématique. En effet, l'apparition d'acroléine peut aussi bien avoir lieu lors de la fermentation alcoolique que lors de la maturation et la grande diversité génétique et métabolique de *L. collinoides* pouvant se retrouver dans un même cidre explique en partie la difficulté des producteurs à maîtriser le risque de piqure acroléique.

Genetic and metabolic diversity of the degradation of glycerol by *Lactobacillus* species isolated from ciders

B. MISERY^a, F. COUSIN^a, D. HENNEQUIN^b, JM. LAPLACE^a and M. CRETENET^a

^a Normandie Univ, UNICAEN, UNIROUEN, ABTE ,14000 Caen, France

^b IUT-UFR Sciences, ERPCB, 14000 Caen, France

Abstract

This study consisted in a screening of degrading-glycerol and non-degrading glycerol *Lactobacillus* strains isolated from ciders for distillation. Their ability to consume the glycerol was assessed by genetic (screening of the operon *pdu*, encoding for the glycerol deshydratase) and metabolic experiences in conditions enhancing the glycerol deshydratase metabolic pathway. The glycerol deshydratase is responsible for the formation of 3-HPA, a precursor of acrolein leading to bitterness in calvados. In order to analyse the glycerol metabolism under cider-like conditions, an experimental design was constructed to analyse the physical-chemical parameters that can influence *L. collinoides* strains (concentrations of glucose, fructose, malic acid, ethanol, pH). The presence of *L. collinoides* was always associated with a production of acrolein in ciders. However, not all *Lactobacillus* strains were able to degrade glycerol. Our collection of *Lactobacillus* strains was composed of 70 strains of *L. collinoides*, 1 *L. brevis* and 1 *L. diolivorans*. Three genetic and metabolic profiles were observed: all the strains harbouring the operon *pdu* type I were able to degrade the glycerol while 31% of the strains possessing the operon *pdu* type II were unable. pH appears as one of the major physical-chemical parameters that control the ability of *L. collinoides* to degrade glycerol doe both *pdu* type. The monitoring of acrolein level in ciders for distillation and distillates showed that a high production of acrolein can be observed both at the end of alcoholic fermentation and maturation. This work shows that a better monitoring of the *Lactobacillus* strains harbouring the operon type I would be necessary to better understand their implication in acrolein spoilage.

Keywords: glycerol metabolism, *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus diolivorans*, acrolein, nitrogen, ethanol, sugar, pH

1. Introduction

Glycerol is a by-product of alcoholic fermentation in beverages such as wine and cider that when degraded can be responsible for an unpleasant bitter taste. *Lactobacillus sp.* convert glycerol in 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA) that can be further transform in acrolein spontaneously by thermal dehydration and spoils the quality of the cider or the calvados brandy. Several *Lactobacillus* species such as *Lactobacillus brevis*, *L. (para)collinoides*, *L. casei*, *L. diolivorans*, *L. hilgardii*, *L. sicerae* and *L. suebicus* were identified in cider but the degradation of glycerol is documented to be mainly achieved by *L. collinoides* (Claisse and Lonvaud-Funel, 2001; Cousin *et al.*, 2017; Puertas *et al.*, 2014). However, the enzyme responsible for the formation of 3-HPA, a glycerol dehydratase coenzyme B12-dependent (EC 4.2.1.30), was also described in *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus diolivorans* (Claisse *et al.*, 2001; Garai-Ibabe *et al.*, 2008; Sauvageot *et al.*, 2000; Schütz *et al.* 1983). In *L. collinoides*, this enzyme is encoded by the operon *pdu* but its diversity within this species remains poorly known (Sauvageot *et al.*, 2000).

The incidence of fructose, pH and storage temperature on glycerol metabolism has been studied by Garai-Ibabe *et al.* (2008). This work supports that *L. collinoides* cannot grow with glycerol as sole carbon source and the addition of fructose is necessary to enhance glycerol degradation. The glycerol was not consumed at low pH (3.3 and 3.6) whereas the temperature has no impact of this metabolic pathway. At pH 3.6, the 3-HPA can be maintained in the medium, which can lead to its accumulation and further transformation to acrolein during distillation. The study of Sauvageot *et al.* (2000) evaluates the stimulation of the glycerol metabolism by the presence of glucose in *L. collinoides*. The results have shown that a specific ratio glucose/glycerol promotes the production of 3-HPA and therefore, acrolein. In cider, the distillation step has an influence on the final acrolein content in calvados (Ledauphin *et al.*, 2006). Legislative constraints limit acrolein content in calvados to 0.15g/hL. However, Ledauphin *et al.* (2006) identified that acrolein content ranged between 0.7 and 5.2 mg/l in samples of “good quality” freshly distilled calvados whereas it was between 7 and 15 µg/l in samples of cider. Other physical-chemical parameters may also influence glycerol metabolism such as other sources of carbon (glucose or malic acid). In addition, a high concentration of nitrogen in cider could also promote the growth of lactic acid bacteria, and therefore the glycerol metabolism during the fermentation. The alcohol level can also inhibit the growth and the metabolism of this bacterium.

In this context, genetic and metabolic diversity of the conversion of glycerol in 3-HPA were studied using a threefold strategy. First, the genetic diversity of the operon *pdu* of *Lactobacillus* species and a metabolic screening of glycerol-degrading lactobacilli strains in favourable laboratory conditions (*Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus diolivorans*) were performed. Then, presence of *L. collinoides* and acrolein were followed in a field study in tanks of 10 producers of cider for distillation. Finally, an experimental plan was designed to evaluate the influence of pH value, carbon source (fructose, glucose, acid malic), ethanol and nitrogen contents on the glycerol metabolism in three strains of *L. collinoides* (representing three different genetic and metabolic profiles), one of *L. brevis* and one of *L. diolivorans*.

2. Material and methods

2.1. Screening of *Lactobacillus* species

Lactobacillus strains were isolated from ciders using different selective media listed in Table A1. *Lactobacillus* species were described by a multiplex PCR for the selection of *Lactobacillus collinoides*, *L. diolivorans* and *L. brevis* species. Briefly, couple of primers were generated to target 16S rRNA sequences of *Lactobacillus collinoides*, *L. diolivorans* and *L. brevis* (Table A2). PCR amplifications were performed in a Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) under the following conditions: 3 min at 95 °C for initial denaturation, 35 cycles of 15 s at 95 °C for denaturation, annealing for 15 s at 53 °C, and elongation at 72 °C for 20 s, then a final extension 5 min at 72 °C. Amplicons were analysed by gel electrophoresis on 2 % agarose gel for 45 min at 100 V. The molecular size marker GeneRuler 100 bp DNA Ladder (ThermoFisher Scientific) was used. The PCR amplification patterns were documented by a gel-doc system. A collection of 72 strains of *Lactobacillus* was built, with the addition of the reference strains of *L. collinoides* (LMG18850, DSM20515^T), *L. diolivorans* DSM14421^T and *L. brevis* DSM20054^T (Table1). Their ability to degrade the glycerol was evaluated according to Sauvageot *et al.*, (2000). Briefly, cultures were grown in MRS media (De Man, Rogosa and Sharpe, Difco) supplemented with 54 mM of glycerol and 16 mM of glucose at pH 6.5 at 30 °C with 5% CO₂.

Table 1. Genetic profiles of the operon *pdu* in *Lactobacillus* strains isolated from ciders. Their ability to degrade the glycerol was previously tested according to Sauvageot *et al.* (2000). (T: type strain; UCMA: Université de Caen Microbiologie Alimentaire). *Strains in grey were used for the study using an experimental design.*

UCMA	Identification	Operon <i>pdu</i> type I	Glycerol consumption
LMG18850	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_14441	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_14449	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_14462	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_14464	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_14465	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_14467	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_14468	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_14472	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_14474	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_14478	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_14479	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_14480	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_14507	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_14508	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_14517	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_14518	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_14555	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_14572	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_14748	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_14772	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_15364	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_15531	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_15677	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_16983	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_10361	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_15979	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_16041	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_16159	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_19813	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_19814	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_19815	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_19816	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_19976	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_19977	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_19978	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_19336	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_20009	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_20010	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_20072	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_20074	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
DSM_20054 ^T	<i>Lactobacillus brevis</i>	+	+
UCMA_20661	<i>Lactobacillus brevis</i>	+	+
UCMA_16955	<i>Lactobacillus diolivorans</i>	+	+
DSM_14421 ^T	<i>Lactobacillus diolivorans</i>	+	+

UCMA	Identification	Operon <i>pdu</i> type II	Glycerol consumption
DSM20515 ^T	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	-
UCMA_14627	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	-
UCMA_14628	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	-
UCMA_14669	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	-
UCMA_15257	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	-
UCMA_15355	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_15366	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	-
UCMA_15429	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	-
UCMA_15454	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	-
UCMA_15569	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_15701	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	-
UCMA_15777	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_15966	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_16035	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	-
UCMA_16155	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	-
UCMA_16566	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	-
UCMA_16931	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	-
UCMA_16939	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_17176	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	-
UCMA_19074	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	-
UCMA_19380	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	-
UCMA_19381	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	-
UCMA_19979	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	-
UCMA_19400	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_20069	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_20070	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_20071	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	-
UCMA_20073	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	+
UCMA_20075	<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	-

2.2. PCR screening of glycerol dehydratase gene

Sequences encoding the glycerol dehydratase units (*pduC*, *pduD* and *pduE*) from several lactobacilli species (*L. collinoides* / *L. paracollinoides* / *L. hilgardii* / *L. diolivorans* / *L. brevis*) were recovered via Blast on the NCBI site (<http://www.ncbi.nih.gov>). Sequences alignment was performed by MUSCLE according to the MEGA7 software (Kumar *et al.*, 2016). Specific primers were deduced and performed on *Lactobacillus sp.* strains (Table 2). Couple of primers were generated to target the *pduC* sequence of the two reference strains *Lactobacillus collinoides* LMG18850 and *Lactobacillus collinoides* DSM20515^T. All PCR primers were purchased from Eurofins (France). PCR amplifications were performed in a Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) under the following conditions: 3 min at 95 °C for initial denaturation, 35 cycles of 15 s at 95 °C for denaturation, annealing for 15 s at 53 °C, and elongation at 72 °C for 20 s, then a final extension 5min at 72 °C. Amplicons were analysed by gel electrophoresis on 2 % agarose gels for 45 min at 100 V. The molecular size marker GeneRuler 100 bp DNA Ladder (ThermoFisher Scientific) was used. The PCR amplification patterns were documented by a gel-doc system. As expected, a 711 pb fragment was amplified for the first PCR designed for the *pduC* gene of *L. collinoides* LMG18850 and a 321 pb was amplified for the PCR targetting the *pduC* of *L. collinoides* DSM20515^T (data not shown). PCR amplifications of the *pduC* gene of the strains LMG18850, UCMA20009, UCMA19813, UCMA20072 presented a 711pb fragment and a 321pb fragment for the strains UCMA 20075, UCMA15355, UCMA16566, UCMA15777, showing a similarity with *L. collinoides* DSM20515^T. *L. brevis* UCMA20661 and *L. diolivorans* UCMA16955 showed a 711pb PCR amplification fragment like the strains LMG18850, UCMA20009, UCMA19813, UCMA20072.

Table 2. List of the primers used in this study.

Primer names	Locus	Species targeted	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)
pduC_F1	<i>pduC</i> (type I)	<i>L.collinoides</i> LMG18850 / <i>L.paracollinoides</i> DSM15502 ^T / <i>L.diolivorans</i> DSM14421 ^T / <i>L.brevis</i> DSM20054 ^T / <i>L.panis</i> PM1 ^T	CYGAAACNATTTCGTTTATGG	711pb
pduC_R1	<i>pduC</i> (type I)	<i>L.collinoides</i> LMG18850 ^T / <i>L.hilgardii</i> / <i>L.diolivorans</i> DSM14421 ^T / <i>L.paracollinoides</i> DSM15502 ^T / <i>L.brevis</i> DSM20054 ^T	ATATCTTGMACCATGTCACG	
DSM_pduC_F1	<i>pduC</i> (type II)	<i>L.collinoides</i> DSM20515 ^T	CTGATGTCCATGAGGATATGC	321pb
DSM_pduC_R1	<i>pduC</i> (type II)	<i>L.collinoides</i> DSM20515 ^T	TTGTGGAATATCAGTAACTTTC	

2.3. Acrolein and *L. collinoides* monitoring in cider for distillation and distillates of ten producers

The monitoring of the acrolein production was evaluated in the 10 ciders for distillation at the end of the alcoholic fermentation (F) and the end of maturation (M). The ciders were subsequently micro-distilled and the acrolein was also analysed. The acrolein quantification was performed by GC-FID analysis carried out on an 7890B GC System (Agilent Technologies) coupled with a split injector and a flame ionization detector. The glycerol was analysed by means of high performance liquid chromatography (HPLC Agilent 1100) using quaternary pump equipped with a Phenomenex Luna NH2 column. The presence of *L. collinoides* in the ten tanks of cider for distillation was evaluated by culture-independent (High throughput sequencing 16S) and culture- dependant methods as explained in Misery *et al.* (2021).

2.4. Factors influencing glycerol metabolism in *Lactobacillus* species

Lactobacillus collinoides UCMA15355, UCMA20009, UCMA20075, *L. diolivorans* UCMA16955 and *L. brevis* UCMA20661 strains were selected for the study using an experimental design (Table 3).

Table 3. Bacterial strains used in this study (UCMA: Université de Caen Microbiologie Alimentaire).

Strain name	Identification	Source	Operon <i>pdu</i> type	Degradation of glycerol
UCMA15355	<i>Lactobacillus collinoides</i>	Cider	II*	+
UCMA20009	<i>Lactobacillus collinoides</i>	Cider	I*	+
UCMA20075	<i>Lactobacillus collinoides</i>	Cider	II*	-
UCMA16955	<i>Lactobacillus diolivorans</i>	Cider	I*	+
UCMA20661	<i>Lactobacillus brevis</i>	Cider	I*	+

A D-optimal experimental design was performed in order to evaluate the influence of ethanol (0%, 2.5%, 5% v/v), malic acid (0 mM, 20 mM, 40 mM), sugars (0 mM, 10 mM, 100 mM), nitrogen concentrations (0 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L) and pH values (3.5, 4, 4.5) on the glycerol metabolism in *Lactobacilli* (Table 4). The ability to degrade the glycerol was evaluated in 29 different conditions using a common base medium (Meat extract 10 g/L, Yeast extract 5 g/L, Tween 80 1 g/L, K₂HPO₄ 2 g/L, Sodium acetate 5 g/L, Diammonium citrate 2 g/L, MgSO₄ 0.2 g/L, MnSO₄ 0.05 g/L) supplemented with 5 g/L of glycerol. The strains were first cultivated at 30 °C with 5% CO₂, in MRS medium (De Man, Rogosa and Sharpe, Difco) and used as

preculture to inoculate the fermentation media at 1%. The strains were then cultivated at 30°C with 5% CO₂ during 96 h. The conditions N27, N28 and N29 were replicates media in order to verify the reproducibility of our experimental design.

For each condition, 2mL of culture were filtered with a 0.22 µm filter and store at -20°C. Sugars, glycerol, 1,3 propanediol and lactic acid were quantified using high performance liquid chromatography (HPLC Agilent) 1100 using quaternary pump equipped with a Carbomix column. Samples were diluted at 1/10 with H₂SO₄ at 5mM. The column temperature was set to 40°C and mobile phase was H₂SO₄ at 5mM at a flow rate of 0.6 mL.min⁻¹. Lactic acid, sugars, glycerol and 1,3 propanediol were detected by a refractometer (Waters). L-malic acid was quantified using enzymatic kits (Megazyme, Ireland).

The data of the experimental design were analysed using Modde12.0 software (Sartorius Stedim Data Analytics AB Malmö, Sweden).

3. Results

3.1. Genetic and metabolic profiles of glycerol metabolism in *Lactobacillus* isolated from ciders

A total of 72 *Lactobacillus* strains were isolated from ciders and tested for their ability to degrade glycerol (MRS supplemented with 16 mM glucose and 54 mM glycerol at pH 6.5). Among the 70 strains of *L. collinoides* identified, 41 strains had the *pdu* operon of type I while 29 had the *pdu* operon of type II (Figure 1). All *Lactobacillus collinoides* with the operon *pdu* type I were able to degrade glycerol at pH 6.5. In addition, *L. diolivorans* UCMA16955 and *L. brevis* UCMA20661 isolated from ciders also possess the *pdu* operon of type I and were also able to degrade the glycerol at pH 6.5. In contrast, 31% of *L. collinoides* strains with the operon type II were unable to degrade the glycerol at pH 6.5.

3.2. Acrolein content in ciders for distillation and distillates

The Table 4 presents the main physical-chemical features at the beginning of the fermentation (I), at the end of alcoholic fermentation (F) and the presence of acrolein in the ten ciders for distillation and in the micro-distillates temperatures at the end of the maturation (M). At the end of the alcoholic fermentation (at F), the ciders of distillation of the tanks D2 and B had 0.44 mg/L and 0.50 mg/L of acrolein respectively whereas this molecule was not detected in the other tanks. This presence at F did not necessarily lead to acrolein in the distillates as seen for producer B.

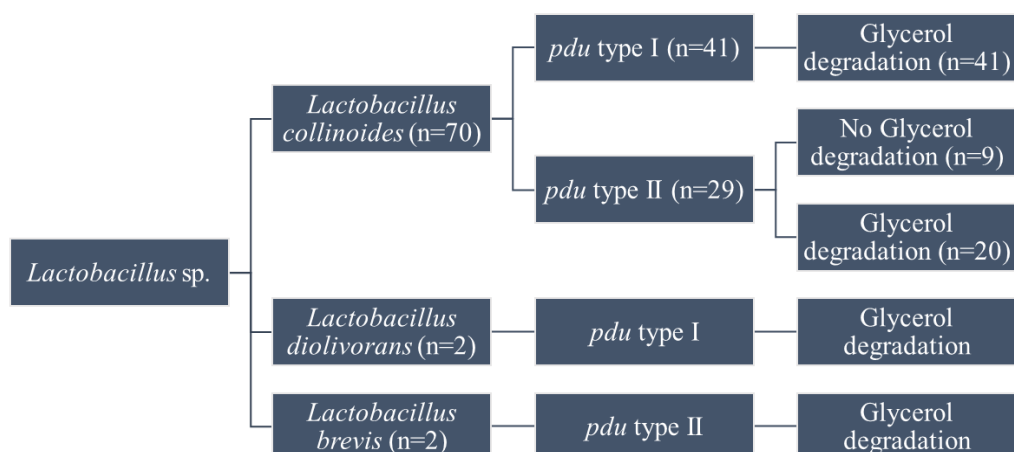


Figure 1. Metabolic and genetic profiles of glycerol metabolism in *Lactobacillus* species.

On the contrary, acrolein was detected in the tank D1 at a concentration of 1.43 mg/L in distillates while no acrolein was detected in the cider for distillation. No acrolein was detected in all ciders for distillation at the end of the maturation (at M). However, acrolein was detected after distillation of the ciders at M. Four distillates contained acrolein (A/B/D1/D2) at concentrations ranging from 0.44 to 4.13 mg/L, with the two higher values for the tanks A and B (3.49 and 4.13 mg/L respectively). For all tanks, no “piqûre acroléique” was detected (<0.15g/L of acrolein) and the distillates was considered as a “good quality” of calvados.

L. collinoides was identified in tanks A, B, D1 and D2. These ciders had an initial pH value under 4.0 compared to the other tanks whose pH ranged from 4.07 to 4.30. In addition, in these tanks, L-malic acid, glucose and the nitrogen were totally consumed at F. A lower alcoholic level (ranging from 5.17 – 6.22 % (v/v)) at F was observed in the tanks A/B/D1/D2 compared to that of other tanks varying (6.60 to 8.20% (v/v)).

3.3. Influence of physical-chemical parameters on the glycerol metabolism of *Lactobacillus* sp.

After a first screening of glycerol-degrading *Lactobacillus* in laboratory conditions, the ability *Lactobacillus* strains to degrade glycerol according to their genetic and metabolic profile was assessed in environmental conditions closer to that encountered in cider. *Lactobacillus collinoides* UCMA15355, UCMA20009, UCMA20075, *L. diolivorans* UCMA16955 and *L. brevis* UCMA20661 strains were selected to study the influence of pH, sugars, malic acid, ethanol, and nitrogen contents on glycerol metabolism.

Table 4. Main physical-chemical features, presence of acrolein and *L. collinoides* in the ten ciders for distillation and microdistillates. *ND: non determined*

Tanks	pH		Fructose (g/L)		Glucose (g/L)		L-malic acid (g/L)		Nitrogen (mg/L)		Alcohol (% v/v)	Glycérol (g/L)	Acrolein (mg/L)				<i>L. collinoides</i> *
	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	F	F	Cider at F	Cider at M	Microdistillate at F	Microdistillate at M	
A	3.94	3.94	67.50	12.40	21.30	< 1.0	2.31	< 0.10	46.23	0	5.41	3.80	<0.20	<0.20	4.13	ND	+
B	3.99	3.99	64.00	4.10	20.90	< 1.0	2.54	< 0.10	76.77	0	6.21	4.38	0.50	<0.20	<0.20	3.49	+
C1	4.07	4.04	70.50	< 1.0	21.90	< 1.0	2.55	< 0.10	48.75	0	6.80	3.33	<0.20	<0.20	<0.20	<0.20	-
C2	3.96	4.29	72.90	67.50	19.60	17.90	3.46	< 0.10	67.81	0	6.80	2.20	<0.20	<0.20	<0.20	<0.20	-
C3	4.30	4.10	79.90	< 1.0	18.50	< 1.0	1.70	< 0.10	55.00	0	7.60	3.50	<0.20	<0.20	<0.20	<0.20	-
D1	3.93	3.93	61.40	10.60	17.50	< 1.0	2.74	< 0.10	56.04	0	5.27	4.20	<0.20	<0.20	1.43	0.44	+
D2	3.85	3.99	61.50	18.60	17.60	1.60	2.47	< 0.10	19.89	0	5.17	1.89	0.44	<0.20	1.73	ND	+
E1	4.11	4.28	85.92	3.64	19.44	< 1.0	3.60	< 0.10	61.00	15.00	6.60	3.94	<0.20	<0.20	<0.20	<0.20	-
E2	4.22	3.90	69.60	2.50	22.40	< 1.0	2.80	1.50	129.00	24.00	7.30	4.80	<0.20	<0.20	<0.20	<0.20	-
F	4.30	4.20	92.60	4.80	25.10	< 1.0	2.11	2.40	56.00	27.00	8.20	5.70	<0.20	<0.20	<0.20	<0.20	-

* *L. collinoides* was evaluated in cider by means of high throughput sequencing and culture-dependant media.

The Table 5 presents the rate of glycerol consumption and of 1,3 propanediol production in these five *Lactobacillus* species.

Firstly, we focused on the glycerol metabolism in *Lactobacillus* strains possessing the *pdu* operon of type I, that, as shown previously, are able to use this compound. The *L. collinoides* UCMA20009 and *L. diolivorans* UCMA16955 strains (*pdu* operon type I) were the main glycerol-degrading strains with a rate of glycerol degradation ranging from 0 to 100% depending on the physical-chemical conditions. For the strain *L. collinoides* UCMA20009, only a low rate of glycerol degradation was observed at conditions N1, N4, N9, N13, N14, N16 N18 and N20, involved in low pH value (3.5). Statistical analysis showed that the pH has a positive effect on the glycerol metabolism of this strain. Higher pH value strengthens the ability to degrade glycerol. The production of 1,3 propanediol varied from 0.82 to 4.41 g/L in these conditions.

L. diolivorans UCMA16955 totally degraded glycerol under conditions N8, N10, N17, N19, N21, N23, N26 to N29. These conditions were characterised by a pH ranging from 4 to 4.5, a low alcoholic level and high concentrations of sugars. Glycerol consumption rates ranged from 36% and 80% in the conditions N12, N15, N22, N24, N25, and N29. For this strain, only the pH value had a positive effect on the glycerol metabolism. The production of 1,3 propanediol varied from 0.75 to 5.22 g/L. On the contrary, whatever the conditions, glycerol consumption rates remained low in *L. brevis* UCMA20661 strain (*pdu* operon type I), except in condition N19 (pH at 4.5, with 40mM of malic acid and 100mM of fructose and glucose) where it reached 35%. The highest production of 1,3 propanediol was 0.57 g/L. Compared to the previous results at pH 6.5, *L. brevis* did not particularly consume glycerol.

Compared to the *L. collinoides* UCMA20009 strain (*pdu* operon of type I), the glycerol degradation was less important in the *L. collinoides* strain possessing the *pdu* operon of type II. We confirmed that the strain UCMA20075 (*pdu* operon of type II) was unable to degrade glycerol in all tested conditions (consumption ranged from 0% to 7%). The statistical analyses showed that a high level of ethanol had a negative impact on the glycerol metabolism in this strain. In contrast, as expected, the *L. collinoides* UCMA15355 strain (*pdu* operon of type II) was able to degrade the glycerol (rate between 10 to 34 %) in conditions N2, N8, N10, N12, N14, N23, N24 and N25. 1,3 propanediol was produced but in smaller quantities (0.44-1.32 g/L) compared to the production in *L. collinoides* UCMA20009 and in *L. diolivorans* UCMA16955.

Table 5. Glycerol degradation and 1,3 propanediol production by *Lactobacillus* species. N27, N28 and N29 are replicates.

Exp Name	pH	Acide malique (mM)	Azote (mg/L)	Ethanol (% v/v)	Glucose (mM)	Fructose (mM)	<i>Lactobacillus</i> <i>collinoides</i> UCMA15355		<i>Lactobacillus</i> <i>collinoides</i> UCMA20009		<i>Lactobacillus</i> <i>collinoides</i> UCMA20075		<i>Lactobacillus</i> <i>diolivorans</i> UCMA16955		<i>Lactobacillus</i> <i>brevis</i> UCMA20661	
							Glycerol consumption (%)	1,3 propanediol production (g/L)	Glycerol consumption (%)	1,3 propanediol production (g/L)	Glycerol consumption (%)	1,3 propanediol production (g/L)	Glycerol consumption (%)	1,3 propanediol production (g/L)	Glycerol consumption (%)	1,3 propanediol production (g/L)
N1	3.5	40	0	0	0	0	0%	0.00	2%	0.00	3%	0.00	0%	0.00	1%	0.57
N2	4.5	0	0	0	0	0	18%	0.00	27%	0.00	7%	0.00	0%	0.00	0%	0.00
N3	3.5	0	100	0	0	0	6%	0.00	0%	0.00	0%	0.00	0%	0.00	0%	0.00
N4	3.5	40	100	5	0	0	0%	0.00	9%	0.00	0%	0.00	0%	0.00	2%	0.00
N5	4.5	0	100	5	0	0	4%	0.04	17%	0.00	5%	0.00	5%	0.00	0%	0.00
N6	3.5	0	0	0	100	0	0%	0.00	30%	1.03	0%	0.00	0%	0.00	0%	0.00
N7	3.5	40	0	5	100	0	5%	0.00	8%	0.00	0%	0.00	1%	0.00	0%	0.00
N8	4.5	0	0	5	100	0	11%	0.18	97%	3.51	0%	0.00	100%	3.15	0%	0.00
N9	3.5	0	100	5	100	0	0%	0.00	6%	0.00	2%	0.00	0%	0.00	6%	0.00
N10	4.5	40	100	0	100	0	10%	0.07	94%	4.08	9%	0.00	100%	4.12	0%	0.00
N11	3.5	0	0	5	10	0	8%	0.00	11%	0.00	0%	0.00	4%	0.00	0%	0.00
N12	4.5	40	0	5	10	0	15%	0.44	85%	1.61	0%	0.00	37%	0.92	0%	0.00
N13	3.5	0	0	0	0	100	0%	0.00	0%	0.00	5%	0.00	0%	0.00	2%	0.00
N14	3.5	40	0	5	0	100	13%	0.00	0%	0.00	0%	0.00	0%	0.00	0%	0.00
N15	4.5	0	0	5	0	100	0%	0.00	100%	4.41	2%	0.00	71%	4.51	0%	0.00
N16	3.5	0	100	5	0	100	3%	0.00	2%	0.00	3%	0.00	5%	0.00	4%	0.00
N17	4.5	40	100	0	0	100	0%	0.00	24%	0.82	1%	0.00	100%	3.39	4%	0.00
N18	3.5	0	0	5	100	100	9%	0.00	4%	0.00	2%	0.00	0%	0.00	0%	0.00
N19	4.5	40	0	0	100	100	1%	0.00	97%	3.26	0%	0.00	100%	4.07	35%	0.00
N20	3.5	40	100	0	100	100	0%	0.00	15%	0.00	5%	0.00	0%	0.00	0%	0.00
N21	4.5	0	100	0	100	100	0%	0.00	100%	2.98	3%	0.00	100%	3.25	0%	0.00
N22	4.5	40	100	5	100	100	0%	0.00	100%	3.14	0%	0.00	40%	2.08	0%	0.00
N23	4.5	20	50	2.5	10	100	12%	0.64	100%	4.23	3%	0.00	100%	5.22	0%	0.00
N24	4	20	0	2.5	0	10	27%	0.39	84%	1.72	0%	0.00	36%	0.75	2%	0.44
N25	4.5	40	50	5	0	10	34%	1.32	62%	1.59	0%	0.00	42%	1.02	3%	0.22
N26	4	40	100	0	10	10	4%	0.00	63%	1.17	5%	0.00	100%	3.31	3%	0.00
N27	4	20	50	2.5	10	10	0%	0.00	93%	2.14	0%	0.00	100%	3.14	0%	0.00
N28	4	20	50	2.5	10	10	5%	0.00	82%	1.53	0%	0.00	100%	3.22	4%	0.00
N29	4	20	50	2.5	10	10	6%	0.03	61%	1.36	2%	0.45	80%	2.99	0%	0.00

4. Discussion

High amounts of lactic acid bacteria are usually found in ciders. *L. collinoides* and *L. diolivorans* are the main predominant glycerol-degrading species in spoiled cider and wines, although *L. diolivorans* is in lower quantity than *L. collinoides* (Gorga *et al.* 2002, Garai-Ibabe *et al.*, 2008). Moreover, many studies deal with the implication of *L. brevis* in beer and wine spoilage and its ability to degrade glycerol (Coton *et al.*, 2010; Feyereisen *et al.*, 2020; Schütz *et al.*, 1984). Our strain diversity study confirmed the results of Garai-Ibabe *et al.* (2008), as only two strains of *L. diolivorans* and one of *L. brevis* were isolated in all the screened ciders and the three strains were able to degrade glycerol in laboratory conditions. Claisse *et al.* (2000) showed that the *L. collinoides* glycerol pathway functions were similar to that described in *L. brevis* and *L. reuteri*. This is in accordance with our results that showed the same type of operon *pdu* in *L. brevis* than *L. collinoides pdu* type I. In *L. diolivorans*, *pdu* type I was also found but not type II. However, we cannot exclude that *pdu* type II did not exist in those two species due to the small number of strains isolated. On the contrary, we observed a genetic diversity within *pdu* operon in *L. collinoides*. The first type was similar to that of the reference strain *L. collinoides* LMG18850 (type I), known to degrade glycerol and the second one (type II) is associated with the reference strain *L. collinoides* DSM20515^T, unable to degrade glycerol. The gene *pdu* type I was more represented in *L. collinoides* than *pdu* type II but further investigation is needed to evaluate this proportion.

When analysing metabolic profile, we first tested glycerol degradation in laboratory conditions using MRS medium supplemented with glycerol at pH 6.5. In this condition, *Lactobacillus diolivorans* UCMA16955 and *L. brevis* UCMA20661 were able to degrade the glycerol and results showed three metabolic and genetic profiles related to glycerol metabolism in *L. collinoides*. An experimental plan was designed and set up to further investigate the ability to degrade glycerol in conditions closer to the one of ciders for distillation. *L. collinoides* with *pdu* type I was always able to degrade glycerol except at pH 3.5 (lower than usual in ciders closer to 4). Strains possessing the *pdu* operon of type I could be able to degrade glycerol in a lesser extent in the conditions tested. Indeed, one hundred per cent of the glycerol was consumed by *L. collinoides* (*pdu* type I) with high concentrations of nitrogen, sugars, malic acid, a high pH and low alcoholic level (conditions associated to the initiation of the must fermentation). Moreover *L. collinoides* UCMA20009 strain was also able to degrade the glycerol with low level of sugars, nitrogen or malic acid and a high level of ethanol (5% v/v).

However, this strain was not able to consume the glycerol in the conditions N2, N3, N4, N7, N9, N13, N14 N16 and N18 that are characterised by a low pH (3.5).

L. collinoides UCMA15355 (*pdu* type II, able to degrade the glycerol at pH 6.5) consumed glycerol only under few conditions, and in a lesser extent than *L. collinoides* UCMA20009. Higher pH value (4- 4.5), high amounts of sugars, nitrogen, malic acid content and no ethanol promoted glycerol degradation for strain the *L. collinoides* UCMA15355. The strain *L. collinoides* UCMA20075 (*pdu* operon of type II no glycerol degradation at pH 6.5) was unable to degrade the glycerol whatever the conditions, confirming our results at pH 6.5. In conclusion, this experimental plan showed that the presence of *L. collinoides* in ciders is not sufficient to assess the risk of glycerol degradation, and therefore the risk of acrolein spoilage. *L. collinoides pdu* type I was able to degrade glycerol in all tested conditions and therefore, seemed to be the most problematic profile for the production of 3-HPA, while *L. collinoides pdu* type II was able to degrade in conditions closer to that of the beginning of the fermentation rather than in the maturation period. In general, high pH value promoted the degradation of glycerol in the conditions tested. According to Garai-Ibabe *et al.* (2008), the pH is a strong parameter influencing 3-HPA accumulation, and therefore a potentially high production of acrolein in distillates. This is in accordance with our study, showing that a low pH impacts the glycerol metabolism for both *Lactobacillus* species harbouring the *pdu* operon type I and II. On the other hand, a high pH promotes the glycerol degradation during the elaboration of the ciders by *L. collinoides* harbouring the *pdu* operon type I and a slight stimulation of the glycerol conversion for some strains possessing the type II, contributing to a higher risk of acrolein spoilage. In our study, the four main tanks with acrolein exhibited the lowest pH values. The risk of the acrolein spoilage is often associated with the presence of *L. collinoides* in cider (Table 3). Low acrolein concentration was found in ciders for distillation, but micro-distillates from tanks A/B/D1/D2 contained acrolein at higher level. Our results were within the ranges quoted/detected in Ledauphin *et al.* (2006). It is to note that in none of the monitored tanks of our study an acrolein spoilage was found in our distillates. The link between the threshold amount of acrolein in ciders and the risk of acrolein spoilage bringing bitterness in calvados has never been clearly established but the legal limit of this molecule in calvados was to 0.15g/hL.

It was therefore difficult to establish what trigger the acrolein spoilage and further evaluate this risk. The metabolic study of glycerol degradation in *Lactobacillus sp.* Shows that glycerol can be converted in 1,3 propanediol during both fermentation and maturation periods while

previous works placed it rather during the maturation period (Dueñas *et al.*, 2002, Garai-Ibabe *et al.*, 2008)) Interestingly, both of *L. collinoides* with the operon *pdu* type I and II were isolated from the same cider tanks, enhancing the complexity to evaluate the risk of glycerol degradation by *L. collinoides* in cider.

One difficulty of our study is that 3-HPA cannot be detected by HPLC limiting the possibility to correlate degradation of glycerol to the production of acrolein. Only the production of 1,3 propanediol was monitored. In some conditions, a degradation of glycerol was observed but no 1,3 propanediol was quantified, suggesting that the 3-HPA produced was still present in the media and was not yet converted to 1,3 propanediol. Sugar content and pH influence 3-HPA accumulation (Garai-Ibabe *et al.*, 2008) so our results on 1,3 propanediol must be carefully used when evaluating the risk of acrolein spoilage. Furthermore, acrolein is highly volatile and can react with other molecules (Ledauphin *et al.*, 2006), limiting its concentration in distillates, as seen in our study for tank at F for the tank D1. Our study gave new results on the genetic and metabolic diversity of *Lactobacillus sp.* in glycerol degradation leading to the possibility that the risk of acrolein spoilage took place during the alcoholic fermentation and the maturation periods. Further investigation is needed to evaluate the risk of acrolein spoilage in relation to 3-HPA production and accumulation as shown by our laboratory and field studies.

5. Conclusion

In this work, *Lactobacillus* strains isolated from ciders for distillation were mainly *L. collinoides*, followed by two strains of *L. brevis* and *diolivorans*. Their ability to degrade glycerol under cider-like conditions showed that three genetic and metabolic profiles could be distinguished. Strains with *pdu* operon of type I are able to degrade glycerol whatever the conditions imposed, except in a high acidic condition (pH 3.5). In contrast, *L. collinoides* strains belonging to the type II degrade glycerol only under high concentrations of sugars, malic acid and nitrogen, with low ethanol level and a high pH value. This implies that more accurate monitoring of strains with type I operon is required to better control the glycerol metabolism with this profile.

References

- Claisse, O., and Lonvaud-Funel, A. (2000).** Assimilation of glycerol by a strain of *Lactobacillus collinoides* isolated from cider. *Food Microbiology* 17, 513–519.
- Claisse, O., and Lonvaud-Funel, A. (2001).** Détection de bactéries lactiques produisant du 3-hydroxypropionaldéhyde (précurseur d'acroléine) à partir du glycérol par tests moléculaires. *Le Lait* 81, 173–181.
- Coton, M., Romano, A., Spano, G., Ziegler, K., Vetrana, C., Desmarais, C., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P., and Coton, E. (2010).** Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria in wine and cider. *Food Microbiology* 27, 1078–1085.
- Cousin, F., Le Guellec, R., Schlusshuber, M., Dalmasso, M., Laplace, JM., and Cretenet, M. (2017).** Microorganisms in Fermented Apple Beverages: Current Knowledge and Future Directions. *Microorganisms* 5, 39.
- Dueñas, M., Irastorza, A., Fernandez, C., Bilbao, A., Campo, G.D., and Munduate, A. (1997).** INFLUENCE OF APPLE JUICE TREATMENTS ON THE CIDER MAKING PROCESS. *Journal of the Institute of Brewing* 103, 251–255.
- Dueñas, M., Irastorza, A., Munduate, A., Santos, J.I., Berregi, I., and del Campo, G. (2002).** Influence of Enzymatic Clarification with a Pectin Methylesterase on Cider Fermentation. *Journal of the Institute of Brewing* 108, 243–247.
- Feyereisen, M., Mahony, J., O'Sullivan, T., Boer, V., and Sinderen, D. (2020).** Beer spoilage and low pH tolerance is linked to manganese homeostasis in selected *Lactobacillus brevis* strains. *J. Appl. Microbiol.* 129, 1309–1320.
- Garai-Ibabe, G., Ibarburu, I., Berregi, I., Claisse, O., Lonvaudfunel, A., Irastorza, A., and Duenas, M. (2008).** Glycerol metabolism and bitterness producing lactic acid bacteria in cidermaking. *International Journal of Food Microbiology* 121, 253–261.
- Gorga, A., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., (2002).** Organisation of the genes encoding glycerol dehydratase of *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus hilgardii* and *Lactobacillus diolivorans*. *Sciences des Aliments* 22, 151–160.
- IDAC (2017).** Fiche technique “Les caractéristiques de l'eau-de-vie”.
- Ledauphin, J., Lefrancois, A., Marquet, N., Beljean-Leymarie, M., and Barillier, D. (2006).** Development of an accurate and sensitive gas chromatographic method for the determination of acrolein content in Calvados and cider. *LWT - Food Science and Technology* 39, 1045–1052.
- Misery B., Legendre P., Rue, O. Bouchart V., Guichard H., Laplace JM. and Cretenet M. (2020).** Diversity and dynamics of bacterial and fungal communities in cider for distillation. *IJFM* 108987.

Puertas, A.I., Arahall, D.R., Ibarburu, I., Elizaquível, P., Aznar, R., and Dueñas, M.T. (2014). *Lactobacillus sicerae* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from Spanish natural cider. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64, 2949–2955.

Sauvageot, N., Gouffi, K., Laplace, J.-M., and Auffray, Y. (2000). Glycerol metabolism in *Lactobacillus collinoides*: production of 3-hydroxypropionaldehyde, a precursor of acrolein. *International Journal of Food Microbiology* 55, 167–170.

Schütz, H. et al. (1984). Anaerobic Reduction of Glycerol to Propanediol-1.3 by *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*. *Syst. Appl. Microbiol.*, 5, 169–178.

Table A1. List of media used for the selection of *Lactobacillus* strains in ciders.

Quantity (g/L)	MRS	Rogosa	Rogosa SL	Tomato juice	Raka-Ray No. 3	MLO	PSM	ZPP
Casein peptone, tryptic digest	10	10	10	10	20	10	10	5
Meat extract	10						10	
Yeast extract	5	5	5	5	5	5	5	3
Glucose	20	20			10	10	20	20
Dextrose			10					
Tween 80	1	1	1			1	1	
K ₂ HPO ₄	2	6	6		2		2	
Na-acetate	5	17	15				5	
(NH ₄) ₂ citrate	2	2	2		2	3.5	2	
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0.2	0.575	0.57		0.98	0.2	0.2	
MnSO ₄ x H ₂ O	0.05	0.12	0.12		0.42	0.05	0.05	
Ferrous sulphate		0.034	0.03					
Glacial acetic acid		1.32	1.32					
Arabinose			5					
Saccharose			5					
Tomato juice						100		
Orange extract								
Malt extract								3
Liver concentrate					1			
Betaine hydrochloride					2			
Potassium aspartate					2.5			
N-Acetyl glucosamine					0.5			
Potassium glutamate					2.5			
Vancomycin hydrochloride							0.01	
Penicillin								0.03
Pimaricine								0.1
Novobiocine							100 µg	
Nystatine							50000 U	
Fructose					5	5		
Maltose					10			
Cysteine -HCl	0.5	0.5	0.5			0.5	0.5	
Malic acid						10		
Cycloheximide 0.1% solution	7 mg	7 mg	7 mg	7 mg	7 mg	7 mg		
pH	5.2	5.4	5.4	6.1	5.4	4.8	5.2	

Table A2. List of primers used for the identification of *Lactobacillus* species.

Primer names	Locus	Species targeted	Sequence (5';-3')	Amplicon size (bp)
Lb.colli_16S_F2 Lb.colli_16S_R2	16S	<i>Lactobacillus collinoides</i>	GGAGTAATGGTTCACCAAG GAATACCGTCAACGTCTGAA	234
Lb.diol_16S_F1 Lb.diol_16S_R1	16S	<i>Lactobacillus diolivorans</i>	GATTTTAGGTGCTTGCACTTG CTAAAGCGATAGCCGAAGC	178
Lb.brevis_16S_F Lb.brevis_16S_R	16S	<i>Lactobacillus brevis</i>	GCTTCCGTTGAATGACGTG ATTAGCTTAGCCTCACGAC	1234-1239
23S_F 23S_R	23S	Bacteria (universal)	TTGTCGGGTAAGTTCCGAC GTAGCTTTTATCCGTTGAGCGA	500

Chapitre V

**Comparaison génomique de huit souches de
Lactobacillus collinoides isolées du cidre de
distillation et déterminants génétiques du
métabolisme du glycérol.**

Nous présentons ici une analyse comparative de huit génomes de souches de *Lactobacillus collinoides* isolées à partir de cidres de distillation. L'étude porte sur la comparaison des différents métabolismes associés à la fermentation (sucre, azote, etc.), ainsi que sur la capacité des souches à métaboliser le glycérol et à répondre aux stress environnementaux qu'impose le cidre de distillation (oxygène, métabolites anti-microbiens). A l'aide d'amorces spécifiques ciblant l'opéron *pdu* (structure génétique codant pour l'enzyme glycérol déshydratase responsable du métabolisme du glycérol), deux types d'opéron *pdu* se profilent : le premier correspond à l'opéron *pdu* de la souche de référence LMG18850 (capable de dégrader le glycérol et de produire du 3-HPA) et le second associé à la souche de référence DSM20515^T, souche incapable de dégrader le glycérol. En fonction de la présence de l'un ou l'autre type d'opéron, huit souches de *L. collinoides* ont alors été choisies (LMG18850, UCMA15355, UCMA15777, UCMA16566, UCMA19813, UCMA20009, UCMA20072 et UMCA20075) pour analyser leur génome.

Les analyses génomiques montrent une faible variabilité des principales caractéristiques génomiques entre les souches (%G+C, taille des génomes). De plus, 81 % des gènes sont partagés entre ces souches (core-génome), ce qui reflète une faible variabilité génomique intraspécifique. Le génome accessoire révèle des différences au niveau de l'opéron *pdu* et de gènes codant pour des enzymes liées à la transformation malolactique comme la malate perméase et la fumarate réductase. Les analyses sur les prédictions génétiques pour les voies métaboliques associées à la fermentation montrent que les souches sont toutes capables de cataboliser les sucres présents dans la matrice cidre (fructose, glucose et saccharose). La tolérance potentielle au stress induit par les radicaux superoxyde a été évaluée chez les huit souches de *L. collinoides*. Seule la souche *L. collinoides* UCMA15777 possède le gène codant pour l'enzyme superoxyde dismutase. Les voies de dégradation et de biosynthèse de plus de 20 acides aminés et/ou amines biogènes sont retrouvées chez les huit souches de *L. collinoides*. Les voies incomplètes de biosynthèse de la cystéine, de l'histidine, de la lysine ou encore de la tyrosine impliquent que ces acides aminés sont essentiels au développement de ces souches.

Outre l'analyse comparative des génomes, nous avons évalué la diversité génomique des souches de *L. collinoides* vis-à-vis de la dégradation du glycérol. La différence majeure dans l'organisation de ces deux types d'opérons réside dans le type de régulateur transcriptionnel situé en amont de l'opéron : pour le premier type d'opéron, le régulateur est identifié comme PocR, alors qu'il s'agit d'un régulateur de la famille des AraC dans le cas du second type

d'opéron. Pour les autres gènes de l'opéron *pdu* (ex : *pduCDE*), seules les séquences varient, ce qui est confirmé par le test PCR via les amorces générées.

Cette étude présente l'environnement génétique de l'espèce *L. collinoides*, les différences associées au génome accessoire afin de mieux comprendre le métabolisme de cette bactérie dans le cidre. De plus, la variabilité génétique observée au sein de l'opéron *pdu* entre les souches de *L. collinoides* suggère des capacités différentes de dégradation du glycérol.

Comparative genomics of *Lactobacillus collinoides* strains isolated from cider reveals different genetic determinants of glycerol degradation

B. MISERY^a, F. COUSIN^a, JM. LAPLACE^a and M. CRETENET^a

^a Normandie Univ, UNICAEN, UNIROUEN, ABTE ,14000 Caen, France

Abstract

Lactobacillus collinoides is a bacterium responsible for alteration in ciders. Its capacity to degrade glycerol to 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA) is due to the presence of the operon *pdu*, encoding for the enzyme glycerol deshydratase. Eight strains of *Lactobacillus collinoides* were sequenced for a comparative genomics analysis. An extensive synteny of the genome sequences of these eight lactobacilli was found. A total of 2858 orthologues common to the eight strains were identified, representing 81% of the pan-genome. Differences in accessory genes between *L. collinoides* strains were CDS coding for malolactic enzymes, malate permease, fumarate reductase and the *pdu* operon. Nitrogen and carbohydrate metabolism were analysed. This whole genome analysis led to further insight in genetic determinant of glycerol metabolism in *L. collinoides* focusing on the diversity of the *pdu* operon between the eight strains of *L. collinoides* and two *Lactobacillus* (*L. diolivorans* and *L. brevis*) was performed. The analysis of the variable genome shows a diversity of *pdu* operon between *L. collinoides* LMG18850, UCMA20009, UCMA19813, UCMA20072 (affiliated to the operon *pdu* type I) and *L. collinoides* UCMA20075, UCMA15355, UCMA16566, UCMA15777 (affiliated to the operon *pdu* type II). The putative transcriptional regulator of the operon *pdu* type I was identified as *pocR* gene, while it was identified as an AraC family transcriptional regulator for the strains with the operon *pdu* type II.

Keywords: *Lactobacillus collinoides*, comparative genomics, *pdu* operon, glycerol metabolism

1. Introduction

L. collinoides is a Gram-positive, non-motile, non-sporulant, rod-shaped bacterium commonly found in naturally found in nutrient-rich habitats, especially fermented beverages (Carr *et al.*, 1972). This lactic acid bacterium (LAB) is responsible for acrolein spoilage in ciders used for apple brandy production. *L. collinoides* strains are morphologically and metabolically diverse, displaying different colony phenotypes and can metabolize a wide range of carbohydrates.

The presence of this microorganism in spoiled cider and beer during fermentation aroused interest for the study of *L. collinoides* metabolism (Arthurs *et al.*, 1999; Funahashi *et al.*, 1998), particularly its ability to degrade glycerol. Glycerol and ethanol result from sugar metabolism during alcoholic fermentation by yeasts and are essential for cider quality. Indeed, glycerol plays an important role on sensory qualities in cider by adding roundness to the cider. Acrolein spoilage is a consequence of the conversion of glycerol into 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA), a precursor of acrolein. This conversion leads to bitter tastes in cider and calvados brandy. The enzyme responsible for the formation of 3-HPA is a glycerol dehydratase coenzyme B12-dependent (EC 4.2.1.30). This enzyme was also described in LAB strains belonging to the genus *Lactobacillus*, especially *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus diolivorans* and *L. collinoides* (Claisse *et al.*, 2001; Garai-Ibabe *et al.*, 2008; Sauvageot *et al.*, 2002; Schütz *et al.*, 1983). This enzyme has also been described in several microorganisms such as *Klebsiella sp.*, *Citrobacter sp.*, *Enterobacter sp.*, *Salmonella sp.*, *Clostridium sp.* (Bobik *et al.*, 1997; Forage and Foster, 1982; Macis *et al.*, 1998; Seyfried *et al.*, 1996; Toraya *et al.*, 1980). The glycerol/diol dehydratase enzyme of *L. collinoides* consists of 3 subunits α , β and γ corresponding respectively to the large, medium and small subunits, encoded by 3 genes (*pduCDE*) grouped in an operon structure of at least 7 genes (Sauvageot *et al.*, 2000). To date, the studies carried out on *L. collinoides* have been mainly based on the analysis and the identification of the glycerol deshydratase, but genomic comparative remained to be done to better understand its metabolism. Characterised in 1972 by Carr *et al.*, its genome was described in 2015 (Sun *et al.*, 2015). To date, few genomes of *L. collinoides* have been sequenced in order to analyse intra-specific differences (Puertas *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2015). Comparative genomics of *Lactobacillus* genus can lead to the identification of genetic elements for metabolic control and environmental adaptation (Nethery *et al.*, 2019 ; Eisenbach *et al.* 2018; Rodrigo-Torres *et al.*, 2019).

This work presents the comparative genomic analysis of eight genomes of *Lactobacillus collinoides* isolated from ciders. Up-stream work on *L. collinoides* and the operon *pdu* diversity lead us to discriminate two types of operon *pdu* : the first one (type I) corresponded to the *pdu* operon of the reference strain LMG18850 (able to degrade the glycerol) and the second one (type II) was associated with the reference strain DSM20515^T (unable to degrade glycerol). When their capacity to degrade glycerol was studied, we found that the *Lactobacillus* strains with the operon *pdu* type I were always able to degrade glycerol whereas some strains with strains with the operon *pdu* type II could or could not degrade it. Thus, a focused comparative analysis on the genomic diversity of *L. collinoides* of these three genetic and metabolic profiles was carried out in order to better understand the diversity of genetic elements that trigger the degradation of glycerol.

2. Material and methods

2.1. *Lactobacillus collinoides* strains used in this study

Lactobacillus collinoides used in this study were selected according to their genetic and metabolic pathway (Table 1). The genetic diversity of the *pdu* operon was assessed by a PCR screening of the glycerol deshydratase as described in Chapter IV. The glycerol metabolism of these strains was assessed following the protocols of Sauvageot *et al.* (2000). The *L. collinoides* strains LMG18850, UCMA19813, UCMA20009, UCMA20072 harbouring the operon *pdu* type I and were able to degrade the glycerol. The *L. collinoides* UCMA15355 and UCMA15777 possess the operon *pdu* type II and were also able to degrade glycerol. The *L. collinoides* strains UCMA16566 and UCMA20075 were chosen to their inability to consume glycerol and harbouring the operon *pdu* type II.

2.2. Genome sequencing

Lactobacillus genomic DNAs were extracted and purified from 2 mL stationary phase cultures by using NucleoSpin® Microbial DNA kit (Macherey Nagel, France) according to the manufacturer's instructions. DNA concentration and quality were determined with 0.8 % agarose gel electrophoresis and quantified by Picogreen assay (Fisher Scientific, France). The genomes of the strains were sequenced using an Illumina HiSeq 2x150pb sequencing by Genewiz (France). Libraries were generated using the Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina, France) according to the manufacturer's instructions. De novo genome assembly was performed for each sample using the de-novo assembler SOAPdenovo2-r241 with k-mer size

61. The ContEst16S for contamination prokaryotic genomes using 16S RNA gene sequences was used (Lee *et al.*, 2017). The genomes sequences were imported in the MicroScope platform for the annotation and exploration of microbial gene functions through genomic, pangenomic and metabolic comparative analysis (Vallenet *et al.*, 2019).

Table 1. Bacterial strains used in this study (UCMA: Université de Caen Microbiologie Alimentaire).

Strain name	Identification	Source	Operon <i>pdu</i> type	Degradation of glycerol
LMG18850	<i>Lactobacillus collinoides</i>	Cider	I*	+
UCMA15355	<i>Lactobacillus collinoides</i>	Cider	II*	+
UCMA15777	<i>Lactobacillus collinoides</i>	Cider	II*	+
UCMA16566	<i>Lactobacillus collinoides</i>	Cider	II*	-
UCMA19813	<i>Lactobacillus collinoides</i>	Cider	I*	+
UCMA20009	<i>Lactobacillus collinoides</i>	Cider	I*	+
UCMA20072	<i>Lactobacillus collinoides</i>	Cider	I*	+
UCMA20075	<i>Lactobacillus collinoides</i>	Cider	II*	-

* Types of operon was determined par PCR screening as explained in materiel and methods. The type I of operon *pdu* is affiliated to the operon *pdu* of LMG18850 (Sauvageot *et al.*, 2000) and the type II of operon *pdu* affiliated to the operon *pdu* of *L. collinoides* DSM20515^T.

2.3. Safety assessment

Genomes of *L. collinoides* were screened with the tools available in the MicroScope platform. The antibiotic resistance prediction was performed by CARD using MicroScope platform. Integron clusters prediction were performed using IntegronFinder v1.5.2. CRISPRCasFinder v4.2.19 was used to predict Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) arrays (Couvin *et al.*, 2018). BAGEL4 server was used to predict genes coding for bacteriocins (van Heel *et al.*, 2018). Genome stability was investigated by analysing prophages with PHASTER server (Arndt *et al.*, 2016) and the presence of plasmids by PlasmidFinder server and the MicroScope platform.

2.4. Comparative genomic analysis and genome clustering

Comparative genomic analyses were performed on the 8 *Lactobacillus collinoides* genomes using MicroScope platform. Contigs < 200 pb and runs of N nucleotides longer than 10 pb were discarded for the importation of the genome sequences in MicroScope platform. The genomic similarity was estimated using Mash, a software that computes a distance between two genomes. This distance was correlated to the ANI like: $D \approx 1 - \text{ANI}$. The pangenome, core-

genome, Clusters of Orthologous Groups (COG), and the metabolic pathway (MicroCyc) were also investigated with the interface of MicroScope. The statistic distribution of the protein encoding genes of the selected genome within the COG (Clusters of Orthologous Groups) was computed using the automatic results obtained with the COGNiTOR software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>). The analysis of pan-genome, core-genome and variable genome are based on the MicroScope gene families (MICFAM) which are computed with the SiLiX software (80% aa identity / 80% align. coverage) (Miele *et al.*, 2011)).

2.5. Determination of the diversity of the operon *pdu*

Sequences encoding the transcriptional regulator of the *pdu* operon were extracted from MicroScope platform and were performed by MUSCLE according to the MEGA7 software (Kumar *et al.*, 2016). *Lactobacillus diolivorans* UCMA16955 and *Lactobacillus brevis* UCMA20661 were used as reference strains of *Lactobacillus* species for the analysis of the type of operon *pdu* with the 8 *L. collinoides*. A Neighbor-Joining phylogenetic tree was displayed (bootstrapped × 1000 replicates).

3. Results and discussion

3.1. General genomic features of *Lactobacillus collinoides*

3.1.1. Genome Sequence Metrics

The genome length, % G + C molar content, the CDS, rRNA and tRNA genes number for the 8 newly sequenced *Lactobacillus collinoides* genomes are detailed in Table 2. All the genomes drafted in this study have more than 100 contigs and a N50 below ranging from 46,4991 to 454,277, reflecting the complexity of the genomes. Indeed, the presences of short reads of repeat regions and mobile elements affects the *de novo* assembly of prokaryote genomes (Schmid *et al.*, 2018). No 16S RNA contamination was found by ContEst software. *Lactobacillus* genomes size can range from 2.4 to 3.9 Mbp. Genome sizes of *Lactobacillus collinoides* is quite similar among the 8 isolates, with 3.62-3.79 Mbp. The G+C content was around 46% and does not vary among *Lactobacillus collinoides* genomes. No integron clusters was found in all strains of *L. collinoides*. For *L. collinoides*, tRNA content varied from 43 to 50 tRNA. A high number and diverse tRNA can maximize the growth rates of bacteria in rich media by optimizing the kinetic efficiency of translation thus giving an advantage in a stressful environment such as cider (Emilsson *et al.*, 1990).

Table 2. General genome features of the 8 genomes of *Lactobacillus collinoides*

Strains	Genome length (pb)	Completeness (%)	Contamination (%)	N50 (pb)	G+C (mol%)	Contig nb	CDS nb	% Protein coding density	tRNA genes	rRNA genes	Integron cluster
<i>Lactobacillus collinoides</i> LMG18850	3741905	99.375	3.28125	51411	46.01	369	3605	80.84	46	3	0
<i>Lactobacillus collinoides</i> UCMA15355	3796774	99.375	3.28125	86566	45.84	156	3756	82.12	45	2	0
<i>Lactobacillus collinoides</i> UCMA15777	3721923	99.375	3.28125	100771	45.92	171	3790	81.9	47	3	0
<i>Lactobacillus collinoides</i> UCMA16566	3643894	99.375	3.28125	135859	46.06	88	3407	81.68	50	2	0
<i>Lactobacillus collinoides</i> UCMA19813	3669330	99.375	3.28125	87149	46.07	145	3401	80.68	42	1	0
<i>Lactobacillus collinoides</i> UCMA20009	3701746	99.375	3.28125	87150	46.01	162	3461	80.75	42	2	0
<i>Lactobacillus collinoides</i> UCMA20072	3740409	99.375	3.28125	76112	45.99	169	3718	81.53	47	2	0
<i>Lactobacillus collinoides</i> UCMA20075	3624679	99.375	3.28125	85855	46.06	124	3407	81.56	43	0	0

3.1.2. Genome Stability

In food application, the analysis of the genomic stability is important to determine a possible horizontal transfer of pathogenic genes. The investigation of the presence of prophages and plasmids in *L. collinoides* is interesting because of their possible involvement in horizontal genes transfer. Prophage regions were analysed and are listed in Table 3. All *L. collinoides* strains investigated enclosed intact regions for at least one phage. Moreover, strains *Lactobacillus collinoides* LMG18850, UCMA15355, UCMA19813, UCMA20009, UCMA20072, UCMA16566, contained “incomplete” and “questionable” regions. Presence of prophage in the genomes of *L. collinoides* highlights the probable mobilization of genetic factors including pathogenic genes. Prophages are genetic elements are frequently present in lactic acid bacteria, especially in *Lactobacillus* species (Chaïb *et al.*, 2019; Marcó *et al.*, 2012; Rodrigo-Torres *et al.*, 2019; Ventura *et al.*, 2003). The presence of prophage in *L. collinoides* strains can be a problem in cider environment and has to be checked with additional works. The Illumina HiSeq sequencing and the *de novo* assembly do not allow to determine the presence of plasmid in all strains. However, plasmids are known to be present in many *Lactobacillus* species (Feyereisen *et al.*, 2020; Heiss *et al.*, 2015; Terán *et al.*, 2020). PlasmidFinder could not find any plasmid sequence, even if the MicroScope platform predicted plasmid initiation replication protein genes in *L. collinoides* strains UCMA15777 (*rep28*, *repA*, *repB*), UCMA20009, UCMA20075, UCMA20072. The *rep* gene is involved in plasmid replication and *Lactobacillus* plasmids are usually replicated with the rolling-circle method (Jalilsood *et al.*, 2014).

The immunity against phages or the incorporation of foreign DNA can be achieved with the presence of CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated) defense systems (Barrangou *et al.*, 2007; Mojica *et al.*, 2009). In our work, CRISPR genes were found in all genomes except for the genome of *Lactobacillus collinoides* UCMA15777. The research of CRISPR sequences in *Lactobacillus collinoides* genomes resulted in 9 to 17 CRISPR regions per genome (data not shown). In all CRISPR regions, one to five regions had *cas* genes. For the type of *cas* genes, these CRISPR regions are of class 2 type IIC and type IE. These Cas systems provide an adaptive immunity to the bacteria against the incorporation of invader DNA sequences into their genome (Shmakov *et al.*, 2015; Westra *et al.*, 2013).

Table 3. List of predicted prophage regions of eight *L. collinoides* strains, as shown in Summary tab of PHASTER webserver. *Regions are classified into three categories indicated with colors depending on completeness: intact (green), blue (questionable), and red (incomplete).*

Strains	Region	Region Length	Completeness	Score	Number of total proteins	Most Common Phage (number of hits)	GC %
<i>Lactobacillus collinoides</i> LMG18850 ^T	1	24.2Kb	intact	140	29	PHAGE_Lactob_Lc_Nu_NC_007501(9)	39.69%
	2	34.4Kb	intact	150	38	PHAGE_Lactob_Sha1_NC_019489(14)	42.30%
	3	19.7Kb	incomplete	30	19	PHAGE_Lactob_Lj965_NC_005355(4)	43.26%
	4	24.8Kb	intact	100	27	PHAGE_Deep_s_D6E_NC_019544(8)	40.76%
<i>Lactobacillus collinoides</i> UCMA15355	1	14.7Kb	intact	110	18	PHAGE_Lactob_Lc_Nu_NC_007501(9)	39.24%
	2	14Kb	incomplete	40	17	PHAGE_Lactob_Sha1_NC_019489(5)	42.31%
	3	24.8Kb	questionable	80	29	PHAGE_Lactob_LBR48_NC_027990(20)	45.51%
	4	16.6Kb	incomplete	60	18	PHAGE_Lactob_LBR48_NC_027990(15)	45.91%
	5	19.7Kb	incomplete	30	16	PHAGE_Lactob_Lj965_NC_005355(2)	44.28%
<i>Lactobacillus collinoides</i> UCMA15777	1	54Kb	intact	140	66	PHAGE_Lactob_LBR48_NC_027990(11)	41.66%
<i>Lactobacillus collinoides</i> UCMA16566	1	14.6Kb	intact	110	20	PHAGE_Lactob_Lc_Nu_NC_007501(9)	39.36%
	2	15.3Kb	questionable	80	22	PHAGE_EnterovB_EfaS_AL2_NC_042127(3)	40.96%
	3	42.5Kb	intact	130	55	PHAGE_Lactob_LBR48_NC_027990(23)	43.75%
	4	30.8Kb	intact	150	37	PHAGE_Lactob_Sha1_NC_019489(14)	41.54%
<i>Lactobacillus collinoides</i> UCMA19813	1	26.5Kb	intact	150	33	PHAGE_Lactob_Sha1_NC_019489(13)	42.54%
	2	30.5Kb	incomplete	40	31	PHAGE_Lactob_phig1e_NC_004305(5)	43.71%
	3	27.8Kb	intact	100	31	PHAGE_Deep_s_D6E_NC_019544(8)	40.49%
<i>Lactobacillus collinoides</i> UCMA20009	1	26.5Kb	intact	150	33	PHAGE_Lactob_Sha1_NC_019489(13)	42.55%
	2	30.5Kb	incomplete	40	32	PHAGE_Lactob_phig1e_NC_004305(5)	43.75%
	3	27.8Kb	intact	100	31	PHAGE_Deep_s_D6E_NC_019544(8)	40.49%
<i>Lactobacillus collinoides</i> UCMA20072	1	24.2Kb	intact	150	39	PHAGE_Lactob_Sha1_NC_019489(11)	40.81%
	2	19.7Kb	incomplete	30	16	PHAGE_Lactob_Lj965_NC_005355(4)	43.49%
	3	27.8Kb	intact	100	31	PHAGE_Deep_s_D6E_NC_019544(8)	40.47%
<i>Lactobacillus collinoides</i> UCMA20075	1	29.4Kb	intact	150	46	PHAGE_Lactob_Sha1_NC_019489(15)	41.44%

	Intact (score > 90)
	Questionable (score 70-90)
	Incomplete (score < 70)

Region:The number assigned to the region.

Region Length:The length of the sequence of that region (in bp).

Completeness:A prediction of whether the region contains a intact or incomplete prophage based on the above criteria.

Score:The score of the region based on the above criteria.

#Total Proteins:The number of ORFs present in the region.

Region Position:The start and end positions of the region on the bacterial chromosome.

Most Common Phage:The phage(s) with the highest number of proteins most similar to those in the region.

GC %:The percentage of GC nucleotides of the region.

3.1.3. Comparative analysis of orthologous genes within *Lactobacillus collinoides*: Pan-genome, core-genome and variable genome

The pan-genome, core-genome, variable genome and strain specific genome are displayed in Table 4. The Figure 1 presents the pan and core-genome evolution and show that the number of genomes added (8 genomes) is sufficient to analyse them. Pan-genome analysis of the 8 *Lactobacillus collinoides* strains resulted in 5003 MICFAM orthologous gene families, containing a total of 28545 protein-coding genes. Of these clusters, 2858 MICFAM (23228 genes, 81%) are shared by the core genome, reflecting a low intraspecies genomic variability.

Table 4. Number of core, accessory, and strain specific genes in *L. collinoides* strains.

Organism	Pan CDS	Core CDS	Var CDS	Strain specific CDS	Core CDS (%)	Var CDS (%)	Strain specific CDS (%)
<i>Lactobacillus collinoides</i> LMG18850 ^T	3605	2903	702	186	80.53	19.47	5.16
<i>Lactobacillus collinoides</i> UCMA15355	3756	2894	862	237	77.05	22.95	6.31
<i>Lactobacillus collinoides</i> UCMA15777	3790	2912	878	239	76.83	23.17	6.31
<i>Lactobacillus collinoides</i> UCMA16566	3407	2881	526	52	84.56	15.44	1.53
<i>Lactobacillus collinoides</i> UCMA19813	3401	2901	500	17	85.27	14.74	0.50
<i>Lactobacillus collinoides</i> UCMA20009	3461	2909	552	50	84.05	15.95	1.45
<i>Lactobacillus collinoides</i> UCMA20072	3718	2937	781	164	78.98	21.02	4.41
<i>Lactobacillus collinoides</i> UCMA20075	3407	2891	513	172	84.94	15.06	5.05
Total	28545	23228	5314	1117	-	-	-

The variable genome contains 2145 MICFAM (5314 genes, 19 %). The percentage of strain specific CDS varied between 0.5 % (UCMA19813) to 6.3 % (UCMA15777), composed mainly by unknown function proteins. Although the core genome was enriched in genes of known function, 1729 of the 23225 core gene clusters (7.6%) were annotated as “uncharacterised protein” and “putative protein”. Interestingly, differences in accessory genes coding for malolactic enzymes, malate permease, fumarate reductase and *pdu* operon between *L. collinoides* strains were found. Thus, different metabolic potential regarding malolactic fermentation could be observed between the strains. The COG class “unknown function” in the

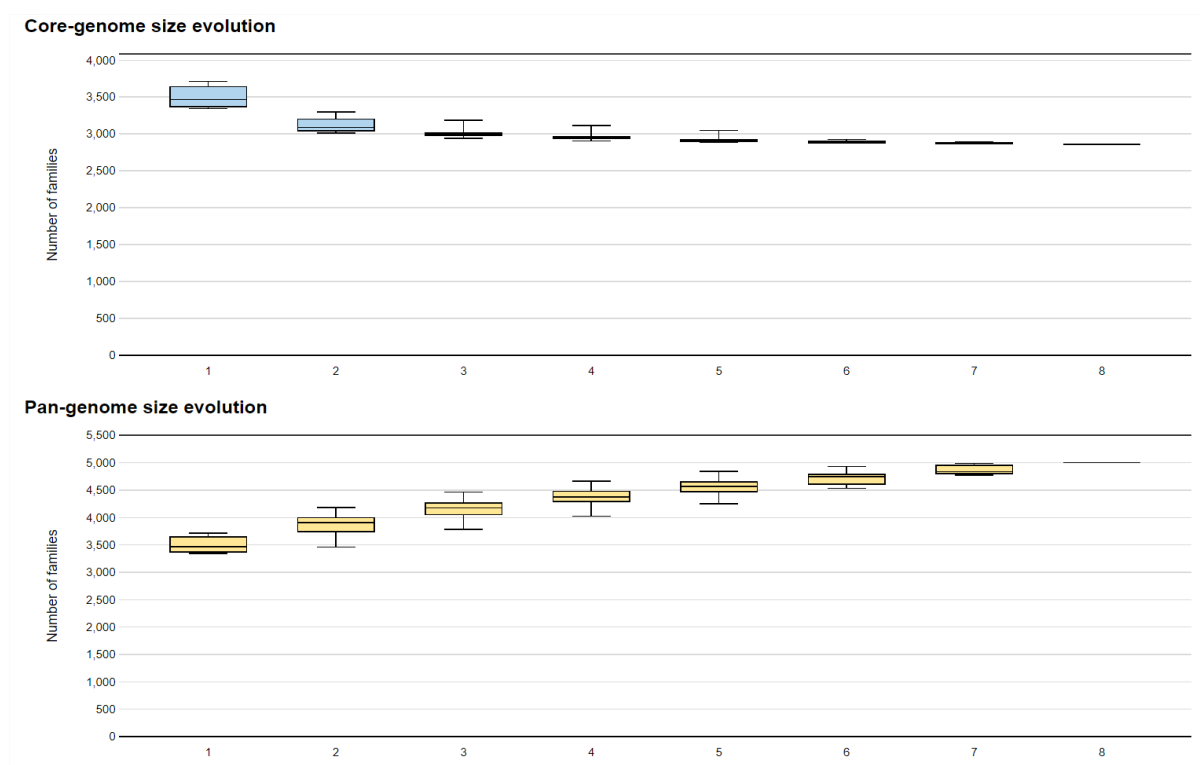


Figure 1. Pan-genome and core genome size evolution *L. collinoides*. Accumulated number of families in the pan-genome and the core-genome are plotted against the number of added genomes

specific genome strain was overrepresented among unique genes, indicating that significant effort will be required to unravel the putative functions carried out by the unique genes.

This comparative genomics study suggests a range of phenotypic variability between strains conferred by the accessory genome and the presence of strain-specific genes (unique) on each genome. In order to further investigate the functionality and diversity encoded by the core and accessory genomes, a histogram representing Cluster of Orthologous Group (COG) predictions for each *L. collinoides* strains was employed (Figure 2). The genome content of the 8 *L. collinoides* strains was classified into function groups. Functional prediction revealed a similar representation of COG categories within *Lactobacillus collinoides* strains. 41 % were predicted to be involved in metabolism functions, 18.8 % for information storage and processing functions and 14.47 % for cellular processes and signalling functions. More than 20 % of the genes were assigned to COG groups with unknown function. In general, COG groups were relatively the same between *Lactobacillus collinoides* strains, suggesting high similarities.

3.1.4. Resistance and production of antimicrobials

Antibiotic resistance and antimicrobials production

Analysis of the antibiotic resistance factors by CARD and the production of antimicrobials by BAGEL4 using contigs or proteins led to the same results: none of the *L. collinoides* strains contained antibiotic resistance and antimicrobials production factors. The antimicrobial activity of *L. collinoides* linked to the production of 3-hydroxypropionaldehyde (known as reuterin) against foodborne pathogens was demonstrated in many studies. The antimicrobial properties of reuterin was demonstrated towards fungal organisms such as *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Pichia sp.*, *Kluyveromyces sp.*, *Aspergillus flavus* and *Penicillium sp.* (Axelsson *et al.*, 2009; Martín *et al.*, 2005; Tanaka *et al.*, 2009). The antimicrobial properties of reuterin have been exploited in the food industry. Studies on the control of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 by the use of reuterin were conducted on meat and dairy products (El-Ziney *et al.*, 1998). Asare *et al.* (2020) also showed the bactericidal effect of reuterin against *Campylobacter* in chicken meat samples.

Superoxide radicals degradation / oxygen tolerance

Lactobacillus collinoides is known for its capacity to deal with stressful conditions in cider and studies have shown its tolerance to stress such as heat, acid and ethanol treatments (De Angelis *et al.*, 2004; Laplace *et al.*, 1999). Oxidative stress refers to the production of reactive oxygen species (ROS) leading to harmful effects on the fitness of LAB. The potential of stress tolerance of *L. collinoides* to superoxide radicals was evaluated within the eight *L. collinoides* strains through their genomes analysis. Only *L. collinoides* UCMA15777 genome contained a superoxide dismutase gene (EC: 1.15.1.1). *Lactobacillus sp.* are aero-tolerant micro-organism and present different mechanisms for oxygen conversion but their ability to cope with oxidative stress varies among the *Lactobacillus collinoides* strains (De Angelis *et al.*, 2004). It is widely known that the shift from anaerobic growth to respiratory conditions offers physiological advantages and affects the pattern of metabolite production in several *Lactobacillus* species. The enzymatic activity of the superoxide dismutase has to be tested for the strain UCMA15777.

Nb CDS

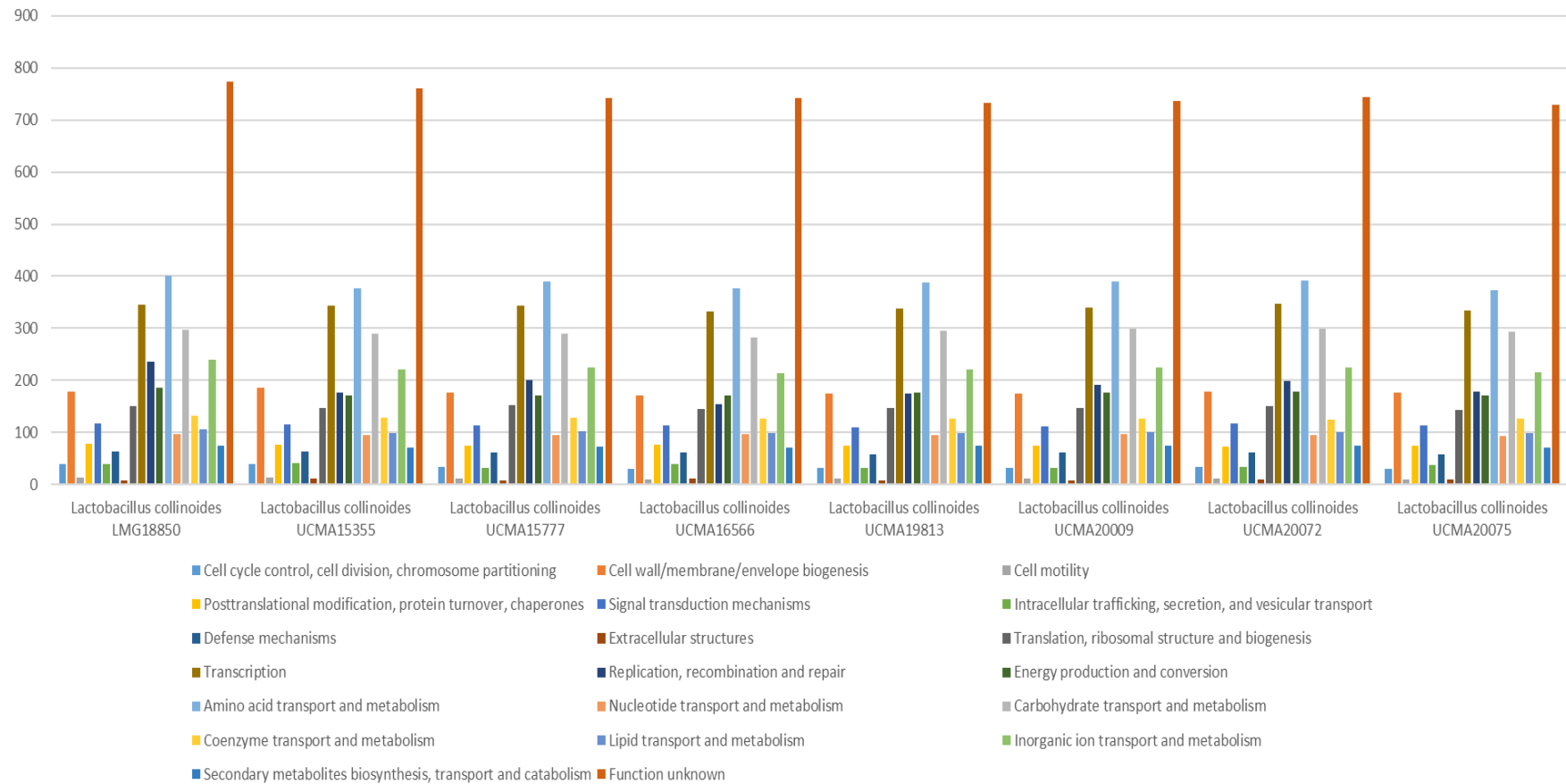


Figure 2. Cluster of Orthologous Groups (COG) classification of *L. collinoides*. Histograms represent COG predictions for each of the following 8 *L. collinoides* isolates: *L. collinoides* LMG18850, *L. collinoides* UCMA15355, *L. collinoides* UCMA15777, *L. collinoides* UCMA16566, *L. collinoides* UCMA19813, *L. collinoides* UCMA20009, *L. collinoides* UCMA20072, *L. collinoides* UCMA20075.

3.2. Catabolism of carbon sources present in cider

Catabolism of fructose, glucose, sucrose, sorbitol

During the fermentation of ciders, sugars (glucose, fructose, sucrose) are consumed by LAB and yeasts. At the end of the fermentation, some fructose is still present. Since the degradation of glycerol is favoured by a low sugar environment, it is interesting to follow the genes involved in these carbohydrates metabolism. For fructose metabolism, fructokinase gene was predicted in all *Lactobacillus collinoides* strains whereas the glucose degradation pathway remains incomplete for all strains. The glucokinase (EC:2.7.1.2), gluconolactonase (EC:3.1.1.17), glucose-1-phosphatase (EC:3.1.3.10), phosphoglucomutase (EC:5.4.2.2) were predicted in all strains but the quinoprotein glucose dehydrogenase (EC:1.1.5.2) was not found. The sucrose glucohydrolase (EC:3.2.1.10) was also predicted in all strains. For the other sugars, the comparative analysis of metabolic pathways by MicroCyc is presented in Table 5. The genomes of the eight *Lactobacillus collinoides* show similarities of metabolic pathways for the utilization of (1,4)- β -xylan, cellulose, chitobiose, galactose, L- arabinose, lactose, maltose, melibiose, ribose, trehalose and xylose. Complete pathways for the degradation of galactose, L-arabinose, lactose, maltose, melibiose, ribose, threolose and xylose were observed for all strains of *L. collinoides*, suggesting a high range of sugar metabolism and a high advantage in diverse habitat. In contrast, the pathway for the degradation of (1,4)- β -xylan and cellulose remains incomplete. These results show the high potential of the degradation of carbohydrate by *L. collinoides* but the utilization of these sugars remains to be tested. The genomes of the eight *Lactobacillus collinoides* show differences of metabolic pathways for the L-arabinan degradation and the pathway IV of the degradation of trehalose. The L-arabinan degradation was incomplete, with only the α -N-arabinofuranosidase (EC:3.2.1.55) identified in *L. collinoides* UCMA 15355, UCMA16566. However, only 50 % of this pathway were observed suggesting that the strains of *L. collinoides* could not use L-arabinan for their development. The genomes of 3 of the 8 *Lactobacillus collinoides* strains encode the 3 enzymes of the pathway IV for trehalose degradation. The α,α -trehalose phosphorylase (EC:2.4.1.64) was not identified within *L. collinoides* LMG18850, UCMA19813, UCMA20009, UCMA20072, UCMA20075. The lactose, maltose, xylose, melibiose or galactose degradation pathways were complete, suggesting a high range of sugar metabolism and a high advantage in various habitats. In addition, carbohydrate transport and metabolism related genes were similar between the strains and represent about 8-9 % of the total of the genome but no specific genes were encountered as exclusive for one of the strains of *L. collinoides*.

Table 5. MicroCyc pathways of carbohydrates degradation in *L. collinoides*. The pathway completions were displayed in red (complete pathway) and orange (incomplete pathway).

Carbohydrates Degradation	Reactions nb	<i>Lactobacillus collinoides</i> LMG18850	<i>Lactobacillus collinoides</i> UCMA15355	<i>Lactobacillus collinoides</i> UCMA15777	<i>Lactobacillus collinoides</i> UCMA16566	<i>Lactobacillus collinoides</i> UCMA19813	<i>Lactobacillus collinoides</i> UCMA20009	<i>Lactobacillus collinoides</i> UCMA20072	<i>Lactobacillus collinoides</i> UCMA20075
(1,4)- β -xylan degradation	2	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
cellulose degradation I (cellulosome)	8	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13
chitobiose degradation	2	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
galactose degradation I (Leloir pathway)	5	1	1	1	1	1	1	1	1
glucose and glucose-1-phosphate degradation	5	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60
L-arabinan degradation	2	0	0.50	0	0.50	0	0	0	0
L-arabinose degradation I	3	1	1	1	1	1	1	1	1
lactose degradation III	1	1	1	1	1	1	1	1	1
maltose degradation	2	1	1	1	1	1	1	1	1
melibiose degradation	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ribose degradation	2	1	1	1	1	1	1	1	1
trehalose degradation III	2	1	1	1	1	1	1	1	1
trehalose degradation IV	3	0.67	1	1	1	0.67	0.67	0.67	0.67
xylose degradation I	2	1	1	1	1	1	1	1	1
xylose degradation IV	17	1	1	1	1	1	1	1	1

Nitrogen metabolism: amino acid degradation and biosynthesis

Nitrogen plays an important role in the biosynthesis of proteins, including enzymes, and is an essential component of bacterial growth and development. Nitrogen is often a limiting source in musts and therefore plays a key role in fermentation kinetics. Among the amino acids, five of them (asparagine, glutamine, aspartic acid, glutamic acid and serine) represent 86 to 95% of the total amino acids of the must. In addition, amino acids are precursors of aromatic compounds in cider. The influence of nitrogen compounds in fermented products on the production of aromas was widely studied (Gamero *et al.*, 2013; Lytra *et al.*, 2020; Madrera *et al.*, 2008).

The amino acid degradation pathways are displayed in Table 6. The complete pathways degradation of arginine, asparagine, aspartate, citrulline, serine, cysteine, threonine, glutamine and glutamate were identified in all strains of *Lactobacillus collinoides* but no identification was found for aspartic acid degradation pathway. These results suggest that the utilization of these amino acids can promote the growth of the eight *L. collinoides*. All amino acids cannot be used by the strains *L. collinoides*, since the metabolic pathways for the degradation of 2-ketoglutarate, α -keto acid, homocysteine, glycine, isoleucine, tryptophan and valine were incomplete.

Most metabolic pathways for amino acid biosynthesis are complete, except for phenylalanine, cysteine, histidine, lysine, methionine and tyrosine (Table 7). The metabolic pathway for the biosynthesis of serine in *L. collinoides* LMG18850 was incomplete compared to other strains. In the same way, the biosynthesis of cysteine was possible only for the strains *L. collinoides* UCMA15355, UCMA15777, UCMA19813, UCMA20072, UCMA20075. Thus, this amino acid could be essential for the development of *L. collinoides* LMG18850, UCMA16566 and UCMA20009. These results show that the amino acids such as cysteine, histidine, lysine, methionine, serine and tyrosine can be a limited source for these strains. For the phenylalanine biosynthesis, 2 enzymes out of 3 (phenylalanine transaminase (EC: 2.6.1.57), prephenate dehydratase (EC: 4.2.1.51) were identified but not the chorismate mutase (EC: 5.4.99.5). Amino acids are selectively assimilated by yeasts, improving the start of alcoholic fermentation. After a large consumption of amino acids, yeasts release amino acids (glutamic acid and valine) essential to the development of the LAB.

Table 6. MicroCyc pathways of amino acids degradation in *L. collinoides*. The pathway completions were displayed in red (complete pathway) and orange (incomplete pathway).

Amino Acids Degradation	Reactions nb	<i>Lactobacillus collinoides</i> LMG18850	<i>Lactobacillus collinoides</i> UCMA15355	<i>Lactobacillus collinoides</i> UCMA15777	<i>Lactobacillus collinoides</i> UCMA16566	<i>Lactobacillus collinoides</i> UCMA19813	<i>Lactobacillus collinoides</i> UCMA20009	<i>Lactobacillus collinoides</i> UCMA20072	<i>Lactobacillus collinoides</i> UCMA20075
2-ketoglutarate dehydrogenase complex	3	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33
arginine degradation V	3	1	1	1	1	1	1	1	1
asparagine degradation I	1	1	1	1	1	1	1	1	1
aspartate degradation I	1	1	1	1	1	1	1	1	1
branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex	3	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33
citrulline degradation	2	1	1	1	1	1	1	1	1
cysteine biosynthesis/homocysteine degradation	2	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
D-serine degradation	1	1	1	1	1	1	1	1	1
glutamate degradation II	2	1	1	1	1	1	1	1	1
glutamate degradation IX (via 4-aminobutyrate)	3	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67
glutamate degradation V (via hydroxyglutarate)	7	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14
glutamine degradation I	1	1	1	1	1	1	1	1	1
glutamine degradation II	1	1	1	1	1	1	1	1	1
glycine cleavage complex	3	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33
isoleucine degradation I	6	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
L-cysteine degradation II	1	1	1	1	1	1	1	1	1
threonine degradation I	4	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
threonine degradation II	2	0.50	0	0	0	0	0	0	0
threonine degradation III (to methylglyoxal)	2	0.50	0	0	0	0	0	0	0
threonine degradation IV	2	1	1	1	1	1	1	1	1
tryptophan degradation IV (via indole-3-lactate)	2	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
valine degradation I	8	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
valine degradation II	3	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67

The degradation of amino acids can lead to biogenic amines production and imparts an unpleasant aroma in cider. Histamine and tyramine are the main amines formed by the LAB strains according to Garai *et al.* (2007). The authors showed the potential of *Lactobacillus diolivorans* to produce intensively histamine, while *Lactobacillus collinoides* seemed to produce tyramine. In our analysis, no histidine decarboxylase (production of histamine via histidine), and tyrosine decarboxylase (production of tyramine via tyrosine) were identified. This corroborates the fact that this ability to produce biogenic amines is strain-dependant. Arginine is also an amino acid present in cider and its metabolism is particularly important because it leads to energy production via ATP synthesis. However, the degradation of arginine can lead to the formation of another biogenic amine, the putrescine (Guerrini *et al.*, 2003). Putrescine has been described to be produced mainly by LAB performing malolactic conversion such as *O. oeni* or *L. hilgardii* either via the arginine deiminase or agmatine deiminase pathways (Arena *et al.*, 2001; Guerrini *et al.*, 2003; Marcobal *et al.*, 2006; Nannelli *et al.*, 2008). Arginine is catabolised via three enzymes: arginine deiminase, ornithine transcarbamoylase and carbamate kinase, encoded respectively by *arcA*, *arcB*, *arcC*. Within the eight genomes of *Lactobacillus collinoides* strains, these three enzymes were identified. The analysis of the nitrogen metabolism in *L. collinoides* led to a better understanding of nitrogen metabolism and highlights possible limitation of some amino acids in the context of apple fermentation. It should be further investigated to be able to modulate the metabolism of these strains for the synthesis of aroma compounds and biogenic amines in cider.

Catabolism related to fermentation

The main organic acids identified in cider are malic acid (representing up to 90 % of the acids present), lactic acid, quinic acid, succinic acid or citric acid. The malolactic enzyme (EC: 4.1.1.101) and the L-lactate dehydrogenase (EC: 1.1.1.27) were identified in all strains. However, genes associated to the malolactic fermentation were different within *L. collinoides* strains UCMA20009 and UCMA19813 (variable genome). The complete heterolactic fermentation pathway (18 reactions) was identified within all the strains. The analysis of the different acid fermentation pathways identified the acetaldehyde dehydrogenase (EC: 1.2.1.10), acetate kinase (EC: 2.7.2.1), aconitate hydratase (EC: 4.2.1.3), alcohol-dehydrogenase (EC: 1.1.1.1), citrate-synthase (EC: 2.3.3.1), D-lactate dehydrogenase (EC: 1.1.1.28), fumarate hydratase (EC: 4.2.1.2), isocitrate dehydrogenase (EC: 1.1.1.42) enzymes

Table 7. MicroCyc pathways of amino acids biosynthesis in *L. collinoides*. The pathway completions were displayed in red (complete pathway) and orange (incomplete pathway).

Amino Acids Biosynthesis	Reactions nb	<i>Lactobacillus collinoides</i> LMG18850	<i>Lactobacillus collinoides</i> UCMA15355	<i>Lactobacillus collinoides</i> UCMA15777	<i>Lactobacillus collinoides</i> UCMA16566	<i>Lactobacillus collinoides</i> UCMA19813	<i>Lactobacillus collinoides</i> UCMA20009	<i>Lactobacillus collinoides</i> UCMA20072	<i>Lactobacillus collinoides</i> UCMA20075
alanine biosynthesis I	3	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67
alanine biosynthesis III	1	1	1	1	1	1	1	1	1
arginine biosynthesis I	9	1	1	1	1	1	1	1	1
arginine biosynthesis II (acetyl cycle)	9	1	1	1	1	1	1	1	1
asparagine biosynthesis I	1	1	1	1	1	1	1	1	1
asparagine biosynthesis II	1	1	1	1	1	1	1	1	1
cysteine biosynthesis I	2	0.50	1	1	0.50	1	0.50	1	1
cysteine biosynthesis/homocysteine degradation	2	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
glutamate biosynthesis I	1	1	1	1	1	1	1	1	1
glutamate biosynthesis III	1	1	1	1	1	1	1	1	1
glutamate degradation II	2	1	1	1	1	1	1	1	1
glutamine biosynthesis I	1	1	1	1	1	1	1	1	1
glycine biosynthesis I	1	1	1	1	1	1	1	1	1
glycine biosynthesis II	1	1	1	1	1	1	1	1	1
glycine biosynthesis IV	1	1	1	1	1	1	1	1	1
histidine biosynthesis	10	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
homocysteine biosynthesis	2	1	1	1	1	1	1	1	1
homoserine biosynthesis	3	1	1	1	1	1	1	1	1
isoleucine biosynthesis I (from threonine)	5	1	1	1	1	1	1	1	1
L-glutamine biosynthesis II (tRNA-dependent)	2	1	1	1	1	1	1	1	1
leucine biosynthesis	5	1	1	1	1	1	1	1	1
lysine biosynthesis II	10	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
lysine biosynthesis VI	7	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86
methionine biosynthesis I	5	0.20	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
ornithine biosynthesis	5	1	1	1	1	1	1	1	1
phenylalanine biosynthesis I	3	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67
proline biosynthesis I	3	1	1	1	1	1	1	1	1
S-adenosyl-L-methionine cycle I	5	0.60	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
serine biosynthesis	3	0.67	1	1	1	1	1	1	1
threonine biosynthesis from homoserine	2	1	1	1	1	1	1	1	1
tryptophan biosynthesis	6	1	1	1	1	1	1	1	1
tyrosine biosynthesis I	3	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67
valine biosynthesis	4	1	1	1	1	1	1	1	1

in all strains. In the same way, the pyruvate fermentation to lactate and acetate pathways were complete in all strains. Studies have also shown the full extent of *L. collinoides* ability to use other organic acids, such as chlorogenic, caffeic, shikimic, cinnamic and p-coumaric (Carr *et al.*, 1957; Whiting *et al.*, 1959). In our work, the strains possess almost all the genes to establish the metabolic pathways related to the heterolactic fermentation of cider (production of organic acids).

3.3. Comparative analysis of *pdu* operon and degradation of glycerol

Glycerol is one of the products of alcoholic fermentation. Its degradation remains a problem for the quality of cider. Many studies were carried out to investigate the conditions of glycerol assimilation by *Lactobacillus collinoides* (Claisse *et al.*, 2000, Sauvageot *et al.*, 2000). This species can not grow with glycerol as sole carbon source and sugars such as fructose and glucose are necessary for the degradation of glycerol in cider (Sauvageot *et al.*, 2000, Garai-Ibabe *et al.*, 2008). In spoiled cider, the glycerol conversion into 3-hydroxypropionaldehyde by *L. collinoides* is undesirable for sensorial quality. Thus, a more in-depth visualization of the *pdu* operon in the eight genomes of *L. collinoides*, one genome of *L. diolivorans* and *L. brevis* could allow us to highlight the genomic potential of the glycerol degradation.

The analysis of the variable genome shows a diversity on *pdu* operon between *L. collinoides* LMG18850, UCMA20009, UCMA19813, UCMA20072 and *L. collinoides* UCMA20075, UCMA15355, UCMA16566, UCMA15777. The *pdu* operons of *L. diolivorans* UCMA16955 and *L. brevis* UCMA20661 were affiliated to the type of operon *pdu* I. No syntenies were found between these two groups for the transcriptional regulator of the *pdu* operon (Figure 3). Additionally, the sequences coding for *pduA*, *pduB*, *pduC*, *pduD* and *pduE* differ between these two groups but have the same annotations. The putative transcriptional regulator upstream the operon was identified as *pocR* gene for *L. collinoides* LMG18850, UCMA20009, UCMA19813, UCMA20072, *L. diolivorans* UCMA16955 and *L. brevis* UCMA20661 but was identified as an AraC family transcriptional regulator, with 37.5 % of identities with *Lactobacillus reuteri* MM4-1A. In addition, the alignment and phylogenetic tree based on the transcriptional regulator gene is divided into two groups for the *L. collinoides* (Figure 4). The sequences coding for the transcriptional regulator of *L. diolivorans* UCMA16955 and *L. brevis* UCMA20661 were grouped with those of *L. collinoides* with the type I of the operon *pdu*. This potential AraC family transcriptional regulator has a typical conserved DNA-binding domain

with two helix-turn-helix patterns at the C terminus (data not shown). Even if the sequences of the transcriptional regulator of the *pdu* operon differ, the PocR is also a transcriptional regulator from the AraC family (Sauvageot *et al.*, 2000). This diversity into the *pdu* operon may explain differences in the expression of the glycerol deshydratase gene and the ability of the strains to degrade glycerol in cider. The phenotypic traits on the glycerol degradation by the *L. collinoides* strains have to be investigated for a better understanding of the implication of *L. collinoides* in cider quality.

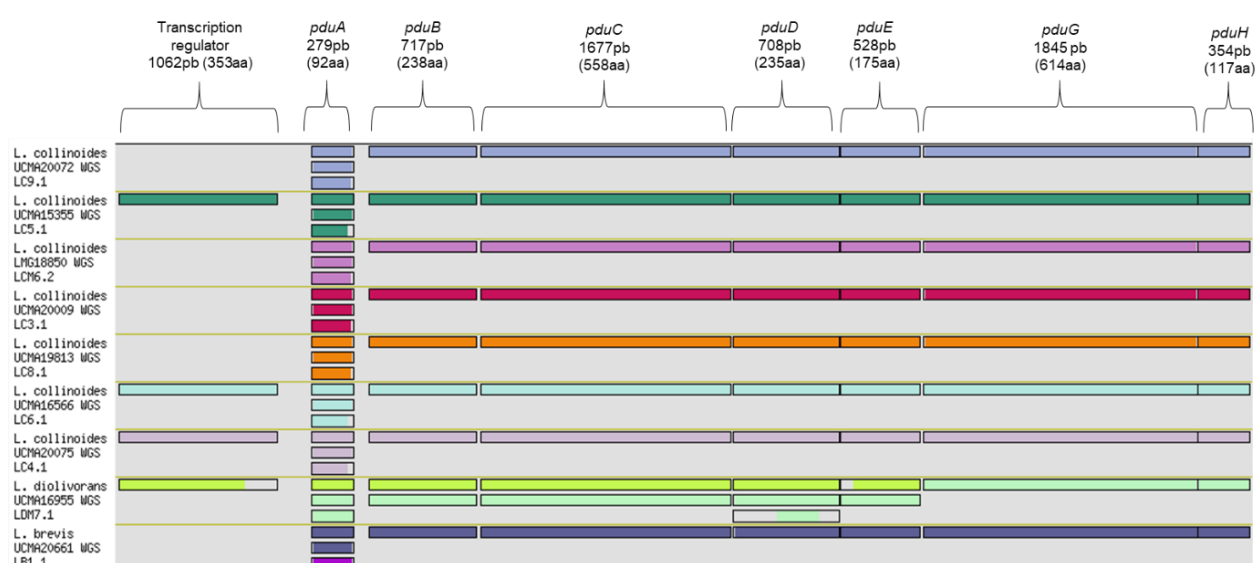


Figure 3. Visualization of the syntenies on *pdu* operon in *L. collinoides* strains with *L. collinoides* UCMA 15777 (type II of operon *pdu*). *Syntenies were observed on the transcription regulator with L. collinoides UCMA 15355, UCMA16566 and UCMA 20075. No synteny was found with L. collinoides UCMA19813, UCMA20009 and LMG18850 (type I of operon pdu).*

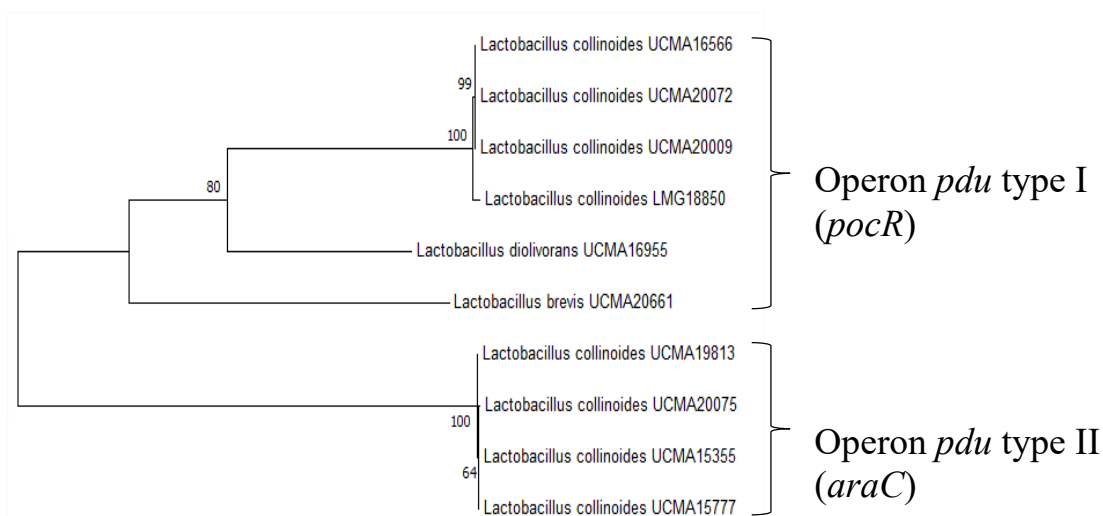


Figure 4. Molecular phylogenetic analysis by Maximum Likelihood method (bootstrapped $\times 1000$ replicates) of sequences encoding the transcriptional regulator of the *pdu* operon extracted from MicroScope platform. Alignment was performed by MUSCLE according to the MEGA7 software (Kumar *et al.*, 2016).

4. Conclusion

The availability of complete genomes of *Lactobacillus collinoides* and *Lactobacillus* sp. in cider is highly relevant to study the composition of metagenomes in more detail, beyond 16S rRNA analysis (De Filippis *et al.*, 2014; Ellegaard *et al.*, 2016). This whole genome analysis demonstrated that complete genome analysis can help to define conditions of competitive advantage of *L. collinoides* strains in cider. The comparative analysis of genomes (pan-genome, core genome, accessory genome and strain-specific genome) showed that 81% of the genes are shared by the core genome, reflecting low intra-specific genomic variability. No particular pathogenic factors were predicted for all strains. The study of genome stability, prophage regions, plasmid replication genes and CRISPR and cas genes suggested a probable intrinsic genetic variability of the species. The eight strains harboured the entire metabolic pathways of the catabolism related to the fermentation and to the glycerol degradation, in accordance with their phenotypic characteristics. Analysis of the metabolic pathways of nitrogen identified amino acids that would be essential to its development. Some of the amino acids may be limiting in cider and their implication on *L. collinoides* growth would be interesting to study. Genes belonging to the variable genome between the eight strains were related to malolactic enzymes, malate permease, fumarate reductase and the *pdu* operon. Thus, the potential of the

malolactic fermentation can be different between these strains and remains to be investigated. Variable genome showed a diversity of the *pdu* operon within *L. collinoides*, suggesting that a modulation of the degradation of glycerol is possible. Finally, the complete genome information of these strains coupled with phenotypic analysis will allow us to find solution to reduce the impact of *Lactobacillus collinoides* in cider spoilage.

References

- Arena, M.E. et al. (2001).** Biogenic amine production by *Lactobacillus*. *Journal of Applied Microbiology* 5.
- Arndt, D., Grant, J.R., Marcu, A., Sajed, T., Pon, A., Liang, Y., and Wishart, D.S. (2016).** PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res* 44, W16–W21.
- Arthurs, C.E., and Lloyd, D. (1999).** Kinetics, stereospecificity, and expression of the malolactic enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3360–3363.
- Asare, P.T., Zurfluh, K., Greppi, A., Lynch, D., Schwab, C., Stephan, R., and Lacroix, C. (2020).** Reuterin demonstrates potent antimicrobial activity against a broad panel of human and poultry meat *Campylobacter spp.* isolates. *Microorganisms* 8, 78.
- Axelsson, L.T., Chung, T.C., Dobrogosz, W.J., and Lindgren, S.E. (1989).** Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology in Health and Disease* 2, 131–136.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A., and Horvath, P. (2007).** CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315, 1709–1712.
- Bobik, T.A., Xu, Y., Jeter, R.M., Otto, K.E., and Roth, J.R. (1997).** Propanediol utilization genes (*pdu*) of *Salmonella typhimurium*: three genes for the propanediol dehydratase. *Journal of Bacteriology* 179, 6633–6639.
- Carr, J.G. et al. (1957).** Occurrence and activity of some lactic acid bacteria from apple juices, ciders and perries. *Journal of the Institute of Brewing* 63, 436–440.
- Carr, J.G., and Davies, P.A. (1972).** The ecology and classification of strains of *Lactobacillus collinoides* nov. spec.: a bacterium commonly found in fermenting apple juice. *Journal of Applied Bacteriology* 35, 463–471.
- Chaïb, A., Philippe, C., Jaomanjaka, F., Claisse, O., Jourdes, M., Lucas, P., Cluzet, S., and Le Marrec, C. (2019).** Lysogeny in the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni* is responsible for modified colony morphology on red grape juice agar. *Appl Environ Microbiol* 85, e00997-19.
- Claisse, O., and Lonvaud-Funel, A. (2001).** Détection de bactéries lactiques produisant du 3-hydroxypropionaldéhyde (précurseur d'acroléine) à partir du glycérol par tests moléculaires. *Le Lait* 81, 173–181.
- Couvin, D., Bernheim, A., Toffano-Nioche, C., Touchon, M., Michalik, J., Néron, B., Rocha, E.P.C., Vergnaud, G., Gautheret, D., and Pourcel, C. (2018).** CRISPRCasFinder, an update of CRISPRfinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins. *Nucleic Acids Research* 46, W246–W251.
- De Angelis, M., and Gobbetti, M. (2004).** Environmental stress responses in *Lactobacillus* : A review. *Proteomics* 4, 106–122.

De Filippis, F., La Stora, A., Stellato, G., Gatti, M., and Ercolini, D. (2014). A selected core microbiome drives the early stages of three popular Italian cheese manufactures. *PLoS ONE* 9, e89680.

Eisenbach, L. et al. (2018). Comparative genomics of *Lactobacillus curvatus* enables prediction of traits relating to adaptation and strategies of assertiveness in sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 11.

Ellegaard, K.M., and Engel, P. (2016). Beyond 16S rRNA community profiling: intra-species diversity in the gut microbiota. *Front. Microbiol.* 7.

El-Ziney, M.G., Arneborg, N., Uyttendaele, M., Debevere, J., and Jakobsen, M. (1998). Characterization of growth and metabolite production of *Lactobacillus reuteri* during glucose/glycerol cofermentation in batch and continuous cultures. 4.

Emilsson, V., and Kurland, C.G. (1990). Growth rate dependence of transfer RNA abundance in *Escherichia coli*. *The EMBO Journal* 9, 4359–4366.

Feyereisen, M., Mahony, J., O’Sullivan, T., Boer, V., and Sinderen, D. (2020). Beer spoilage and low pH tolerance is linked to manganese homeostasis in selected *Lactobacillus brevis* strains. *J. Appl. Microbiol.* 129, 1309–1320.

Forage, R.G., and Foster, M.A. (1982). Glycerol fermentation in *Klebsiella pneumoniae*: functions of the coenzyme B12-dependent glycerol and diol dehydratases. *Journal of Bacteriology* 149, 413–419.

Funahashi, W., Suzuki, K., Ohtake, Y., and Yamashita, H. (1998). Two novel beer-spoilage *Lactobacillus* species isolated from breweries. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 56:2, 64-69

Gamero, A., Tronchoni, J., Querol, A., and Belloch, C. (2013). Production of aroma compounds by cryotolerant *Saccharomyces* species and hybrids at low and moderate fermentation temperatures. *J Appl Microbiol* 114, 1405–1414.

Garai, G., Dueñas, M.T., Irastorza, A., and Moreno-Arribas, M.V. (2007). Biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from cider. *Lett Appl Microbiol* 45, 473–478.

Garai-Ibabe, G., Ibarburu, I., Berregi, I., Claisse, O., Lonvaudfunel, A., Irastorza, A., and Duenas, M. (2008). Glycerol metabolism and bitterness producing lactic acid bacteria in cidermaking. *International Journal of Food Microbiology* 121, 253–261.

Guerrini, S., Bastianini, A., Blaiotta, G., Granchi, L., Moschetti, G., Coppola, S., Romano, P., and Vincenzini, M. (2003). Phenotypic and genotypic characterization of *Oenococcus oeni* strains isolated from Italian wines. *International Journal of Food Microbiology* 14.

Heiss, S., Grabherr, R., and Heini, S. (2015). Characterization of the *Lactobacillus plantarum* plasmid pCD033 and generation of the plasmid free strain *L. plantarum* 3NSH. 12.

Jalilsood, T. et al. (2014). Characterization of pR18, a novel rolling-circle replication plasmid from *Lactobacillus plantarum*. *Plasmid* 73, 1–9.

Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33, 1870–1874.

Laplace, J.M., Sauvageot, N., Hartke, A., and Auffray, Y. (1999). Characterization of *Lactobacillus collinoides* response to heat, acid and ethanol treatments. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51, 659–663.

Lee, I., Chalita, M., Ha, S.-M., Na, S.-I., Yoon, S.-H., and Chun, J. (2017). ContEst16S: an algorithm that identifies contaminated prokaryotic genomes using 16S RNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 67, 2053–2057.

Lytra, G., Miot-Sertier, C., Moine, V., Coulon, J., and Barbe, J.-C. (2020). Influence of must yeast-assimilable nitrogen content on fruity aroma variation during malolactic fermentation in red wine. *Food Research International* 135, 109294.

Macis, L., Daniel, R., and Gottschalk, G. (1998). Properties and sequence of the coenzyme B₁₂-dependent glycerol dehydratase of *Clostridium pasteurianum*. *FEMS Microbiology Letters* 164, 21–28.

Madrera, R.R., Hevia, A.G., García, N.P., and Valles, B.S. (2008). Evolution of aroma compounds in sparkling ciders. *LWT - Food Science and Technology* 41, 2064–2069.

Marcó, M.B., Moineau, S., and Quiberoni, A. (2012). Bacteriophages and dairy fermentations. *Bacteriophage* 2, 149–158.

Marcobal, A., de las Rivas, B., and Muñoz, R. (2006). Methods for the detection of bacteria producing biogenic amines on foods: a survey. *J. Verbr. Lebensm.* 1, 187–196.

Martín, R., Olivares, M., Marín, M.L., Xaus, J., Fernández, L., and Rodríguez, J.M. (2005). Characterization of a reuterin-producing *Lactobacillus coryniformis* strain isolated from a goat's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology* 104, 267–277.

Miele, V., Penel, S., and Duret, L. (2011). Ultra-fast sequence clustering from similarity networks with SiLiX. *BMC Bioinformatics* 12, 116.

Mojica, F.J.M. et al. (2009). Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology* 155, 733.

Nannelli, F., Claisse, O., Gindreau, E., De Revel, G., Lonvaud-Funel, A., and Lucas, P.M. (2008). Determination of lactic acid bacteria producing biogenic amines in wine by quantitative PCR methods: LAB producing biogenic amines in wine. *Letters in Applied Microbiology* 47, 594–599.

Nethery, M.A., Henriksen, E.D., Daughtry, K.V., Johanningsmeier, S.D., and Barrangou, R. (2019). Comparative genomics of eight *Lactobacillus buchneri* strains isolated from food spoilage. *BMC Genomics* 20, 902.

Puertas, A.I., Capozzi, V., Llamas, M.G., López, P., Lamontanara, A., Orrù, L., Russo, P., Spano, G., and Dueñas, M.T. (2016). Draft genome sequence of *Lactobacillus collinoides* CUPV237, an exopolysaccharide and riboflavin producer isolated from cider. *Genome Announc.* 4, e00506-16, /ga/4/3/e00506-16.atom.

- Rodrigo-Torres, L., Yépez, A., Aznar, R., and Arahal, D.R. (2019).** Genomic insights into five strains of *Lactobacillus plantarum* with biotechnological potential isolated from chicha, a traditional maize-based fermented beverage from northwestern argentina. *Front. Microbiol.* *10*, 2232.
- Sauvageot, N., Muller, C., Hartke, A., Auffray, Y., and Laplace, J.-M. (2002).** Characterisation of the diol dehydratase *pdu* operon of *Lactobacillus collinoides*. *FEMS Microbiology Letters* *209*, 69–74.
- Schmid, M., Frei, D., Patrignani, A., Schlapbach, R., Remus-Emsermann, M.N.P., and Ahrens, C.H. (2018).** Pushing the limits of de novo genome assembly for complex prokaryotic genomes harboring very long, near identical repeats. *Nucleic Acids Research*, 2018, Vol. 46, No. 17 8953–8965.
- Schütz, H. et al. (1984).** Anaerobic reduction of glycerol to propanediol-1.3 by *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*. *Syst. Appl. Microbiol.* *5*, 169–178.
- Seyfried, M., Daniel, R., and Gottschalk, G. (1996).** Cloning, sequencing, and overexpression of the genes encoding coenzyme B12-dependent glycerol dehydratase of *Citrobacter freundii*. *Journal of Bacteriology* *178*, 5793–5796.
- Shmakov, S. et al. (2015).** Discovery and functional characterization of diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems. *Mol. Cell* *60*, 385–397.
- Sun, Z., Harris, H.M.B., McCann, A., Guo, C., Argimón, S., Zhang, W., Yang, X., Jeffery, I.B., Cooney, J.C., Kagawa, T.F., et al. (2015).** Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. *Nat. Commun.* *6*, 8322.
- Tanaka, O., Komatsu, T., Oshibe, A., Cai, Y., Miyazaki, S., and Nakanishi, K. (2009).** Production of 3-Hydroxypropionaldehyde in silage inoculated with *Lactobacillus coryniformis* plus glycerol. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* *73*, 1494–1499.
- Terán, L.C., Cuozzo, S.A., Aristimuño Ficooseco, M.C., Fadda, S., Chaillou, S., Champomier-Vergès, M.-C., Zagorec, M., Hébert, E.M., and Raya, R.R. (2020).** Nucleotide sequence and analysis of pRC12 and pRC18, two theta-replicating plasmids harbored by *Lactobacillus curvatus* CRL 705. *PLoS ONE* *15*, e0230857.
- Toraya, T., Kuno, S., and Fukui, S. (1980).** Distribution of coenzyme B12-dependent diol dehydratase and glycerol dehydratase in selected genera of *Enterobacteriaceae* and *Propionibacteriaceae*. *Journal of Bacteriology* *141*, 1439–1442.
- Vallenet, D., Calteau, A., Dubois, M., Amours, P., Bazin, A., Beuvin, M., Burlot, L., Bussell, X., Fouteau, S., Gautreau, G., et al. (2019).** MicroScope: an integrated platform for the annotation and exploration of microbial gene functions through genomic, pangenomic and metabolic comparative analysis. *Nucleic Acids Research* gkz926.
- van Heel, A.J., de Jong, A., Song, C., Viel, J.H., Kok, J., and Kuipers, O.P. (2018).** BAGEL4: a user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins. *Nucleic Acids Research* *46*, W278–W281.

Ventura, M., Canchaya, C., Kleerebezem, M., de Vos, W.M., Siezen, R.J., and Brüssow, H. (2003). The prophage sequences of *Lactobacillus plantarum* strain WCFS1. *Virology* 316, 245–255.

Westra, E.R., Semenova, E., Datsenko, K.A., Jackson, R.N., Wiedenheft, B., Severinov, K., and Brouns, S.J.J. (2013). Type I-E CRISPR-Cas Systems discriminate target from non-target DNA through base pairing-independent PAM recognition. *PLoS Genet* 9, e1003742.

Whiting, G.C., and Carr, J.G. (1959). Metabolism of cinnamic acid and hydroxy-cinnamic acids by *Lactobacillus pastorianus* var. *quinicus*. *Nature* 184, 1427–1428.

Conclusion et perspectives

Le cidre de distillation est une matrice complexe et son élaboration implique de nombreuses interactions microbiologiques et physico-chimiques pouvant influencer la qualité du calvados *in fine*. A ce jour, peu d'études portent sur les écosystèmes microbiens agissant lors de la fermentation des cidres de distillation. C'est pourquoi nos travaux par approche métagénomique tout au long du processus de fermentation apportent un nouvel angle dans la compréhension de la diversité et les mécanismes mis en jeu en vue d'une amélioration de la qualité sensorielle du produit. De plus, le développement de l'amertume par une production d'acroléine chez *L. collinoides* est encore méconnu. Dans les paragraphes suivants, nous reprenons les principales conclusions et perspectives en lien avec les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse.

Diversité des flores microbiennes dans la matrice cidre

Dans un premier temps, l'objectif de ce travail sur les cidres dédiés à la distillation en calvados était de caractériser les dynamiques et les compositions microbiennes tout au long du processus de fermentation. Sur la base d'une analyse de dix cuves provenant de six producteurs différents, les chapitres I et II ont pu mettre en avant trois messages clairs : le premier étant la différence de profils et de dynamiques microbiens entre les producteurs de cidres de distillation, le deuxième portant sur l'apparition de la TML et le dernier portant sur la détection de la flore d'altération par l'approche métagénomique.

En démarrant cette thèse, les principales études de la diversité du microbiote cidricole étaient limitées aux méthodes culturales. Le séquençage à haut débit et la métagénomique rendent aujourd'hui possible l'étude globale de la diversité au sein d'écosystèmes microbiens complexes tels que les cidres de distillation. La métagénomique se révèle être une méthodologie puissante pour détecter et identifier les micro-organismes présents dans la matrice cidre. Dans notre étude, l'analyse par métagénomique a permis la détection précoce de microorganismes responsables d'altérations du cidre de distillation tel que *Zymomonas mobilis*. Sur milieux de culture classiques ces micro-organismes apparaissent en effet avec un décalage de 2 à 3 semaines par rapport au point où ils sont détectés par métagénomique. L'approche par métagénomique constitue donc bien une technique efficace pour détecter et suivre les micro-organismes responsables d'altération dans les produits fermentés (Doyle *et al.*, 2017). Malgré tout, les analyses nous ont montré que l'utilisation de notre kit d'extraction d'ADN entraînait un biais, favorisant l'extraction de l'ADN des bactéries Gram- par rapport aux Gram+. Ainsi, il a été beaucoup plus facile de détecter la présence de *Zymomonas mobilis*.

Les résultats importants de cette thèse portent sur les différences de dynamique et de composition microbienne entre les producteurs de cidres de distillation. Ainsi, parmi plus de 40 genres bactériens et fongiques révélés dans les cidres de distillation par l'analyse métagénomique chaque producteur se caractérise par un écosystème microbien, aussi bien bactérien que levurien, spécifique. En effet, une plus grande proportion en flore lactique a été observée dans certaines cuves, alors que d'autres étaient encore dominées par des *Enterobacteriaceae* lors de la fermentation. De plus, la présence de différentes espèces de *Saccharomyces* et de *Dekkera* dans certaines cuves entre les producteurs (identifiées par métagénomique et par identification des isolats) nous amène à penser que la matière première utilisée et l'environnement de l'atelier de production jouent un rôle essentiel dans l'ensemencement du moût en phase d'initiation de fermentation des cidres mais aussi tout au long de l'élaboration du cidre. Même si les dynamiques des flores microbiennes se rapprochent entre les différents cidres étudiés, leurs proportions en bactéries et levures varient d'un moût à l'autre et influencent grandement les qualités organoleptiques finales.

Le second message qui découle du chapitre I émane des analyses physico-chimiques des cidres de distillation qui montrent clairement, contrairement à l'idée générale retrouvée dans le vin, que la transformation malolactique (TML) intervient en même temps que la fermentation alcoolique dans les cidres de distillation. Cette différence vient du fait que les cidres de distillation résultent d'une fermentation spontanée non maîtrisée. Dans notre étude, la conversion de l'acide malique en acide D-L-lactique s'effectue lors des 4 premières semaines après le pressage alors que la consommation des sucres fermentescibles dure jusqu'à 30 semaines. Il s'agit d'une différence majeure avec le vin, pour lequel, la fermentation alcoolique est plus rapide (12 semaines environ) et a lieu avant la TML. De nombreuses études portent sur la contribution de la TML à la complexité aromatique des vins et des cidres (Antalick *et al.*, 2012 ; de Revel *et al.*, 1999 ; Sánchez *et al.*, 2014). En comparant nos travaux à ceux consacrés à la vinification, il apparaît que l'impact de la TML sur les qualités sensorielles des cidres demeure mal connu et pourrait être beaucoup plus étudié.

L'approche par métagénomique reste toutefois limitée pour distinguer, au sein d'un écosystème microbien, la fraction de microorganismes métaboliquement actifs. S'agissant en effet d'une technique basée sur le ciblage de l'ADN, tous les microorganismes, quel que soit leur état physiologique sont pris en compte dans l'analyse. De plus, les protéines produites par ces micro-organismes jouent un rôle important dans le processus de fermentation et ne sont pas détectées par cette approche. Il serait donc important d'étudier aussi les écosystèmes microbiens

cidricoles sous l'angle de la diversité fonctionnelle des microorganismes qui les composent. La diversité fonctionnelle permet de comparer l'activité des micro-organismes et dépend des interactions et des objectifs d'analyse pris en compte. Il faut au préalable réfléchir soigneusement au choix et à l'utilisation des traits fonctionnels, qui, utilisés de façon appropriée, ont un grand potentiel pour révéler l'implication des écosystèmes sur la qualité du produit. Il serait donc pertinent de procéder à une analyse par métaprotéomique lors de la fermentation du cidre pour obtenir des informations sur les activités microbiennes à partir de la composition protéique globale de l'écosystème. La métaprotéomique reste relativement sous-utilisée en comparaison de la métagénomique et de la métatranscriptomique. Des revues récentes montrent le rôle mais aussi les avantages de l'application de celle-ci sur les produits alimentaires (Piras *et al.*, 2016 ; Yang *et al.*, 2020). Les applications de la métaprotéomique sont en effet diverses, allant de la qualité du produit (goût, saveur, propriétés nutritionnelles, traçabilité du produit) jusqu'à la sécurité alimentaire (détection de micro-organismes pathogènes, détection d'allergies, produits d'altération). Malgré tout, un grand nombre de protéines sont naturellement présentes dans le cidre, entraînant un bruit de fond qui peut être plus ou moins important et il est possible que la discrimination des protéines microbiennes à analyser soit complexe. Il serait alors intéressant de démarrer par un séquençage aléatoire du transcriptome entier (RNAseq) pour comparer les microorganismes présents des métaboliquement actifs. La récente étude de Song *et al.*, (2020) a notamment permis de décrire l'impact de l'azote assimilable sur la production de composés soufrés par *S. cerevisiae* dans le cidre par une approche RNAseq. Cette méthode pourrait être également utilisée pour étudier le métabolisme du glycérol chez *L. collinoides* dans le cidre.

Dans le cadre de notre étude, coupler nos résultats à la métaprotéomique ou à la transcriptomique permettrait de mettre en évidence la population microbienne active lors du processus de fermentation et d'expliquer les liens entre la composition microbienne et les caractéristiques physico-chimiques et aromatiques du cidre. Cette étape serait aussi un premier pas vers l'analyse des différentes interactions microbiennes qui ont lieu lors de la fermentation.

Interactions entre les flores microbiennes et la qualité aromatique du cidre

Les résultats des chapitres I et II ont montré que l'élaboration d'un cidre de distillation, résultant d'une fermentation spontanée et non maîtrisée, implique un grand nombre d'interactions bactériennes et fongiques et qu'il existe un lien étroit entre composition microbienne et profil aromatique du produit, qu'il s'agisse du cidre ou du calvados.

La TML est un sujet particulièrement important à aborder dans le cas de l'élaboration du cidre de distillation. En effet, la filière cidricole préconise une limitation de ce processus qui pourrait entraîner des défauts organoleptiques, comme par exemple la production de lactate d'éthyle. Pourtant, nos travaux ont montré que la présence de la flore lactique est étroitement corrélée avec une plus large complexité aromatique. Les corrélations observées entre la présence d'*Oenococcus oeni* et une quinzaine de composés aromatiques suggèrent que cette espèce est capable de moduler la qualité organoleptique du cidre (possiblement vers plus de fruité). Des travaux initiés par Sánchez *et al.* (2014) ont d'ailleurs montré l'influence de la TML par inoculation d'*Oenococcus oeni* sur les propriétés sensorielles de cidre de consommation via un enrichissement en arômes porteurs de notes fruitées. Li *et al.* (2020) ont également proposé une inoculation d'*Oenococcus oeni* au moment de la fermentation alcoolique et ont montré que les changements de composition aromatique étaient liés à des concentrations plus importantes en acide lactique, acide acétique, lactate d'éthyle et en certains esters d'acétate. Bien que l'impact organoleptique du lactate d'éthyle soit controversé au sein de la filière cidricole, Li *et al.* (2020) considèrent que cet arôme peut apporter des notes fruitées, bien que son seuil de détection au niveau organoleptique soit relativement élevé (environ 14 mg/L). De plus, les différentes interactions entre le lactate d'éthyle et la flore lactique (*Oenococcus* et *Lactobacillus*) laissent penser que cet arôme pourrait être utilisé comme marqueur d'une TML accomplie, ce qui est en accord avec les travaux effectués dans le vin (Kaunzinger *et al.*, 1996). Les différences entre les proportions de *Lactobacillus sp.* et *Oenococcus sp.* impliqueraient probablement des différences sur l'activité de la TML, ce qui pourrait être également aux *Pediococcus sp.*. Cependant, aucune proportion en *Pediococcus sp.* n'a été observée dans les cidres par notre approche de métagénomique. De plus, les mouts étudiés ont des valeurs de pH hautes et des taux de sucres importants contrairement aux cidres qui ont pu être observés précédemment. Ces fortes valeurs pourraient alors influencer les comportements de la flore lactique et son activité dans les cidres. La maîtrise qualitative (choix entre *Lactobacillus* ou *Oenococcus* ?) et quantitative de la flore lactique en début de fermentation ou lors de la fermentation peut-elle jouer sur le bouquet aromatique des calvados ? Si oui, quels leviers technologiques sont applicables pour les producteurs pour obtenir la meilleure qualité de calvados ?

Nos différents travaux ont pu montrer une large complexité aromatique des cidres de distillation et des micro-distillats produits. Au total, nous avons pu identifier 45 composés aromatiques différents au sein des micro-distillats, pouvant participer au fruité ou à l'agressivité

du produit final. Cependant, ces notions restent encore ambiguës et certains arômes présents ne sont pas encore décrits comme des arômes flatteurs ou non pour les eaux-de-vie. Pour les producteurs cidricoles traditionnels, le “fruité” se confond avec la puissance aromatique. Ainsi, une forte production en un arôme particulier peut être jugé “fruité”, quel que soit l’arôme perçu. Dans le cas spécifique du calvados, l’appréciation de la qualité sensorielle est d’autant plus compliquée puisque, pour les producteurs, le fruité s’oppose à un excès d’agressivité. Il apparaît que la description de certains arômes est difficile à évaluer au sein du cidre et des eaux-de-vie. En effet, des différences d’appréciation sensorielles pour un même arôme peuvent subvenir entre sa présence dans le cidre ou dans le vin. Par exemple, l’éthyle lactate est une molécule jugée négativement par la filière cidricole et le vin (Kaunzinger *et al.*, 1996), alors que les travaux de Mosciano *et al.* (1993) ont montré que cette molécule donnait des notes de caramel et d’ananas. A cela s’ajoute les différences de seuil de perception des arômes et leur possible effet masquant sur d’autres arômes. De plus, la composition aromatique peut être fortement influée par le type de distillation. En effet, certains arômes présents dans les cidres de distillation ne sont plus identifiés à la fin de la distillation, tandis que d’autres seront en bien plus grandes concentrations. Il est alors difficile d’anticiper et d’évaluer la qualité organoleptique d’une eau-de-vie fraîchement distillée à partir d’un cidre de distillation.

Enfin, nos résultats ont montré de manière surprenante peu de corrélations entre les levures (*Saccharomyces* et non-*Saccharomyces*) avec des composés aromatiques. Ainsi, *Hanseniaspora* est l’unique genre de non-*Saccharomyces* ayant été corrélé à des arômes (isobutyrate d’éthyle et acétate d’hexyle). De nombreuses études ont été menées afin de mieux comprendre l’implication des espèces non *Saccharomyces* dans la complexité aromatique (Belda *et al.*, 2015 ; Ciani *et al.*, 2010 ; Escribano-Viana *et al.*, 2018 ; Soden *et al.*, 2000 ; Wei *et al.*, 2020). De plus, la différence au sein des espèces de *Saccharomyces* entre les différents producteurs laissait supposer un impact probable sur la production de composés volatiles. Or, seule une corrélation entre *S. cerevisiae* et l’acétate d’hexyle a pu être mise en évidence alors que le genre *Saccharomyces* est connu pour contribuer grandement à la complexité aromatique des cidres et des vins (Alves *et al.*, 2015 ; Escribano-Viana *et al.*, 2018 ; Soden *et al.*, 2000 ; Sumby *et al.*, 2010). Par contre, les interactions mises en évidence entre *Dekkera/Brettanomyces sp.* et les phénols volatils lors de la phase de maturation confirment que la présence de cette levure reste un réel problème pour la qualité organoleptique des cidres et des calvados. Nos travaux ont mis en avant des interactions entre *Dekkera sp.* et la flore lactique, étant les flore dominantes du cidre de distillation en fin de fermentation alcoolique et

de maturation. Inoculer la flore lactique en début ou en fin de fermentation pourrait donner de nouvelles pistes de réflexion sur les interactions entre *Oenococcus/Lactobacillus* et les principaux genres levuriens sur la production d'arômes.

Orienter les recherches sur les spécificités microbiennes d'un produit

Nos travaux ont montré des liens entre la différence de composition et de dynamique microbiennes avec la composition aromatique final du calvados en fonction des producteurs. Ces différences suggèrent que la diversité microbienne peut être liée à une certaine typicité du cidre de distillation et du calvados. La notion de terroir a été particulièrement étudiée dans le vin et pose la question de ce qui relève des différents facteurs environnementaux (pommier, communauté microbienne du sol et de la plante, conditions environnementales saisonnières, etc.) et de la pratique du producteur (entretien du vignoble, maîtrise de la vinification, etc.) sur la qualité du vin. Des études récentes ont montré que la diversité microbienne du raisin est influencée par la sélection des cultivars, les conditions climatiques et saisonnières, les pratiques viticoles mais aussi par le processus de fermentation. En effet, le travail de Bokulich *et al.* (2013) a montré que les paramètres environnementaux spécifiques d'une région (ex : température, humidité, nutriments dans le sol) ont un impact direct sur la composition des écosystèmes microbiens du moût en phase initiale de fermentation. Pourtant, les travaux de Setati *et al.* (2012, 2015) ont même mis en évidence des variations de communautés fongiques bien plus importantes entre les vignobles d'un même terroir plutôt qu'entre des vignobles avec des techniques agricoles différentes. Jusqu'à présent, les études du microbiote du vin et de sa distribution biogéographique ont surtout mis l'accent sur la distribution spatiale de *Saccharomyces cerevisiae*, pouvant fluctuer en fonction des facteurs climatiques (Barata *et al.*, 2012). Les travaux de El Khoury *et al.* (2017) ont porté sur le génotypage et l'analyse de la distribution géographique d'une collection de souches d'*O. oeni* isolées de 235 vins provenant de 6 régions différentes. Les résultats ont montré qu'une grande diversité de ces souches a été observée dans chaque région mais que ces souches ne sont pas spécifiques d'une région.

Le rôle de l'environnement de travail des producteurs dans la formation du microbiote du cidre ainsi que dans la prolifération des micro-organismes responsables d'altérations est encore méconnu. Cependant, la diversité d'espèces de *Saccharomyces* observée au sein des différentes cuves (*S. cerevisiae*, *S. uvarum* et *S. cariocanus*) suppose que l'environnement propre au producteur peut influencer la diversité microbienne des cidres, et donc des qualités de calvados différentes. La présence de *Zymomonas mobilis* détectée exclusivement dans les

cuves du producteur C sur 2 années consécutives sous-entend que l'environnement, ou les pratiques du producteur (notamment dans le choix des variétés de pommes ou la technique de pressage) jouent un rôle prépondérant dans l'ensemencement en flore microbienne des moûts, bien que cette supposition n'a pu être vérifiée pour les cuves du producteur E.

Contrairement au vin, les cidres sont élaborés à partir d'un mélange de variétés de pommes. Les six producteurs ont utilisé des assemblages de pommes douces amères (variétés Bedan, Douce Moën, Douce Coëtigné, Binet Rouge, Bisquet, Kermerrien, Petites Amères, Taureau, Petit Jaune, Judor entre autres). Or ces pommes ont des caractéristiques physico-chimiques spécifiques, proviennent de différentes régions de Normandie, et renferment une flore particulière, ce qui rend l'analyse de la communauté microbienne complexe pour définir un effet terroir quelconque. Une approche intéressante serait de procéder à différentes élaborations de cidres selon les techniques propres à chaque producteur mais à partir d'une variété unique de pommes.

Intégrer l'écologie microbienne aux techniques d'élaboration du cidre devrait aboutir à une meilleure compréhension des mécanismes pouvant influencer la qualité du calvados. Cette approche pourrait conduire les producteurs à revoir entièrement leurs pratiques pour moduler la composition aromatique des calvados et donc leur qualité. Mettre en évidence un éventuel effet terroir dans les cidres de distillation requiert plusieurs axes de recherches complémentaires : (i) caractériser la diversité microbienne associée au pommier (feuilles, sol, pomme) et à l'environnement de travail du producteur, (ii) élucider la diversité fonctionnelle des communautés microbiennes associées ; (iii) analyser des génomes bactériens et levuriens présents sur la plante/pomme et leur impact sur la qualité du moût.

La piquêre acroléique et la présence de *L. collinoides* dans le cidre : nouvelles pistes de réflexion.

L. collinoides est une bactérie naturellement présente dans le cidre de distillation. Sa présence est potentiellement à l'origine d'une altération du cidre appelée "piquêre acroléique" qui résulte du métabolisme du glycérol. Dans notre étude, une collection de 72 *Lactobacillus* a été établie. Parmi elles sont retrouvées une grande majorité des souches de *L. collinoides*, avec seulement une souche isolée de *L. diolivorans* et *L. brevis*. Comprendre les conditions d'apparition de cette altération récurrente, source de préoccupations majeures pour la filière cidricole, implique une étude du métabolisme du glycérol chez *L. collinoides*.

Dans un premier temps, nous avons étudié les capacités de dégradation du glycérol et de production du précurseur de l'acroléine chez *L. collinoides*, *L. diolivorans* et *L. brevis*. Les analyses effectuées suite à un premier criblage par PCR ont démontré une diversité au sein de l'opéron *pdu* codant pour l'enzyme glycérol déshydratase. Un premier type (qualifié de type I) fait référence à la souche LMG18850 dont le métabolisme du glycérol a été largement étudié (Sauvageot *et al.*, 2000, 2002). Le second type (qualifié de type II) fait référence à une souche de *L. collinoides* isolée d'un cidre altéré mais dont la capacité de dégradation du glycérol n'est pas démontrée. Dans un deuxième temps, nous avons effectué une comparaison génomique de différents isolats de *L. collinoides*. La diversité génétique du gène codant pour l'enzyme glycérol déshydratase (enzyme clé du métabolisme du glycérol) au sein des souches de *L. collinoides* a également été analysée afin d'évaluer le lien potentiel entre matériel génétique et dégradation du glycérol. Nous avons initialement pensé que le type d'opéron rencontré chez une souche donnée était directement corrélé à sa capacité à dégrader ou non le glycérol comme le suggéraient les résultats de nos travaux présentés dans les divers chapitres. Cependant, des cidres dans lesquels la présence de *L. collinoides* a été observée n'ont pas développé de piqure acroléique. Bien que cette altération soit connue depuis des années, ses conditions de d'apparition demeurent encore inconnues. Même si le lien entre *L. collinoides* et la production d'acroléine est avéré, sa présence dans un cidre ne suffit donc pas à évaluer le risque de piqure acroléique. En outre, aucun lien n'a pu être établi entre le type d'opéron *pdu* et la production d'acroléine dans les cidres de distillation étudiés.

En effet, le plan expérimental du chapitre IV a montré que trois profils génétiques et métaboliques de la dégradation du glycérol se distinguent chez *L. collinoides*. Le premier profil se révèle être des *L. collinoides* possédant l'opéron de type I et sont toutes capables de dégrader le glycérol, même dans des conditions défavorables, se rapprochant de celles de la fin de fermentation alcoolique et de maturation (peu de sucres, taux d'alcool relativement élevé etc.). Les souches *L. collinoides* possédant l'opéron de type II sont incapables de dégrader le glycérol, sauf pour certaines souches mais avec des taux de consommation de glycérol beaucoup plus faible que ceux retrouvés pour les souches possédant le type I. De plus, cette dégradation n'est permise que dans des conditions hautement favorables, conditions retrouvées en début de fermentation du cidre (fort taux de sucres, d'azote et d'acide malique, pH élevé, pas d'éthanol). Le but final des travaux des chapitres IV et V est avant tout de comprendre les conditions génétiques et physico-chimiques impactant le métabolisme du glycérol lors de la fermentation du cidre par *L. collinoides*. De plus, il nous incombe de dégager des leviers technologiques

applicables pour maîtriser au mieux cette altération. Nous avons pu observer que l'acidité jouait un rôle prépondérant sur la dégradation du glycérol. En effet, un pH relativement bas (3,5) entraînait une diminution de la consommation du glycérol pour tous les profils de *L. collinoides*. Globalement, le pH se révèle être un des principaux paramètres influençant la dégradation du glycérol, ce qui est en accord avec les travaux de Garai-Ibabe *et al.* (2008).

Les études de Dueñas *et al.* (2002) et de Garai-Ibabe *et al.* (2008) ont signalé que la diminution de la teneur en glycérol était observée pendant la période de maturation. Cependant, nos résultats montrent que l'acroléine peut être produite bien avant. Les taux d'acroléine dans certaines cuves étaient beaucoup plus importants à la fin de la fermentation alcoolique plutôt qu'en fin de période de maturation. L'effet inverse a été retrouvé pour d'autres cuves. Ainsi, la production d'acroléine peut être conditionnée par plusieurs facteurs : le type d'opéron *pdu* chez *L. collinoides*, mais aussi les conditions initiales du moût (fort taux de sucres, d'azote, d'acide malique, pH élevé) et celles en fin de fermentation alcoolique pouvant favoriser la dégradation du glycérol.

Ces résultats ouvrent plusieurs perspectives. La présence des souches de *Lactobacillus* possédant l'opéron de type I dans les cidres se révèle beaucoup plus problématique dans la dégradation du glycérol et l'apparition de l'acroléine. Ainsi, la première perspective serait d'évaluer la dynamique de populations des *L. collinoides* en ciblant par analyse qPCR les gènes codant pour l'enzyme de la glycérol deshydratase (*pduC*, *pduD*, *pduE*) de type I et II lors de l'élaboration de plusieurs cidres. En analysant la présence du type I et II dans différents cidres, nous pourrions ainsi définir s'il existe un taux de population particulier ou une implication d'un des deux types permettant d'évaluer le risque de piqure acroléique. L'analyse par qPCR requiert l'utilisation d'amorces relativement courtes (150-200pb) ciblant à la fois les deux types d'opéron mais aussi de l'ADN 16S de la flore totale. Bien que nous ayons pu observer différents profils génétique et métabolique chez *L. collinoides* vis-à-vis de la consommation du glycérol, il serait tout aussi intéressant d'étudier l'expression de l'opéron *pdu* par analyse transcriptomique. En effet, les différents régulateurs transcriptionnels observés entre le type I et le type II de l'opéron pourraient en partie expliquer les différences de métabolisme du glycérol. En effet, il est possible que le régulateur transcriptionnel PocR ou celui affilié à la famille des AraC n'agisse pas de la même manière selon la densité de la population ou des conditions environnementales imposées dans le cidre.

Références bibliographiques

A

Adams, M.R., and Nicolaides, L. (1997). Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. *Food Control* 8, 227–239.

Adams, M., and Mitchell, R. (2002). Fermentation and pathogen control: a risk assessment approach. *International Journal of Food Microbiology* 79, 75–83.

Alexandre, H., Costello, P.J., Remize, F., Guzzo, J., and Guilloux-Benatier, M. (2004). *Saccharomyces cerevisiae*–*Oenococcus oeni* interactions in wine: current knowledge and perspectives. *International Journal of Food Microbiology* 93, 141–154.

Álvarez-Pérez, J.M., Campo, E., San-Juan, F., Coque, J.J.R., Ferreira, V., and Hernández-Orte, P. (2012). Sensory and chemical characterisation of the aroma of Prieto Picudo rosé wines: The differential role of autochthonous yeast strains on aroma profiles. *Food Chemistry* 133, 284–292.

Alves, Z., Melo, A., Figueiredo, A.R., Coimbra, M.A., Gomes, A.C., and Rocha, S.M. (2015). Exploring the *Saccharomyces cerevisiae* Volatile Metabolome: Indigenous versus Commercial Strains. *PLoS ONE* 10, e0143641.

Andorrà, I., Landi, S., Mas, A., Esteve-Zarzoso, B., and Guillamón, J.M. (2010). Effect of fermentation temperature on microbial population evolution using culture-independent and dependent techniques. *Food Research International* 43, 773–779.

Antalick, G., Perello, M.-C., and de Revel, G. (2012). Characterization of Fruity Aroma Modifications in Red Wines during Malolactic Fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 12371–12383.

Arfi, K., Landaud, S., and Bonnarme, P. (2006). Evidence for Distinct l-Methionine Catabolic Pathways in the Yeast *Geotrichum candidum* and the Bacterium *Brevibacterium linens*. *AEM* 72, 2155–2162.

Arqués, J.L., Fernández, J., Gaya, P., Nuñez, M., Rodríguez, E., and Medina, M. (2004). Antimicrobial activity of reuterin in combination with nisin against food-borne pathogens. *International Journal of Food Microbiology* 95, 225–229.

Asare, P.T., Zurfluh, K., Greppi, A., Lynch, D., Schwab, C., Stephan, R., and Lacroix, C. (2020). Reuterin Demonstrates Potent Antimicrobial Activity Against a Broad Panel of Human and Poultry Meat *Campylobacter* spp. Isolates. *Microorganisms* 8, 78.

Axelsson, L.T., Chung, T.C., Dobrogosz, W.J., and Lindgren, S.E. (2009). Production of a Broad Spectrum Antimicrobial Substance by. *Microbial Ecology in Health and Disease* 2, 131–136.

B

- Bae, S., Fleet, G.H., and Heard, G.M. (2006).** Lactic acid bacteria associated with wine grapes from several Australian vineyards. *J Appl Microbiol* 100, 712–727.
- Bagheri, B., Bauer, F.F., Cardinali, G., and Setati, M.E. (2020).** Ecological interactions are a primary driver of population dynamics in wine yeast microbiota during fermentation. *Sci Rep* 10, 4911.
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., and Loureiro, V. (2012).** The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology* 153, 243–259.
- Bartowsky, E.J. et al. (2005).** *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation – moving into the molecular arena. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11, 174–187.
- Bauduin, R., Le Quere, J.-M., Coton, E., and Primault, J. (2006).** Factors leading to the expression of “framboisé” in French ciders. *LWT - Food Science and Technology* 39, 966–971.
- Belda, I., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., Calderon, F., and Benito, S. (2015).** Dynamic analysis of physiological properties of *Torulaspora delbrueckii* in wine fermentations and its incidence on wine quality. *Appl Microbiol Biotechnol* 99, 1911–1922.
- Bell, S.-J., and Henschke, P.A. (2005).** Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Aust J Grape Wine Res* 11, 242–295.
- Beltran, G., Torija, M.J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J.M., Rozès, N., and Mas, A. (2002).** Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: A six year follow-up study. *Systematic and Applied Microbiology* 25, 287–293.
- Beltran, G., Rozès, N., Mas, A., and Guillamón, J.M. (2007).** Effect of low-temperature fermentation on yeast nitrogen metabolism. *World J Microbiol Biotechnol* 23, 809–815.
- Bessmeltseva, M., Viiard, E., Simm, J., Paalme, T., and Sarand, I. (2014).** Evolution of Bacterial Consortia in Spontaneously Started Rye Sourdoughs during Two Months of Daily Propagation. *PLoS ONE* 9, e95449.
- Bester, L., Cameron, M., du Toit, M., and Witthuhn, R.C. (2016).** PCR and DGGE Detection limits for wine spoilage microbes. *SAJEV* 31.
- Bian, L., Molan, A.-L., Maddox, I., and Shu, Q. (2011).** Antimicrobial activity of *Lactobacillus reuteri* DPC16 supernatants against selected food borne pathogens. *World J Microbiol Biotechnol* 27, 991–998.
- Blateyron, L., and Sablayrolles, J.M. (2001).** Stuck and Slow Fermentations in Enology: Statistical Study of Causes and Effectiveness of Combined Additions of Oxygen and Diammonium Phosphate. *J. Biosc. Bioen.* Vol. 91, No. 2, 184–189.
- Bleve, G., Grieco, F., Cozzi, G., Logrieco, A., and Visconti, A. (2006).** Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. *International Journal of Food Microbiology* 108, 204–209.

Bobik, T.A., Xu, Y., Jeter, R.M., Otto, K.E., and Roth, J.R. (1997). Propanediol utilization genes (*pdu*) of *Salmonella typhimurium*: three genes for the propanediol dehydratase. *Journal of Bacteriology* 179, 6633–6639.

Boelens Mans H., Boelens Harrie & Leo J. van Gemert (1993). *Perfumer & Flavorist*, Vol. 18, No. 6, 1-15.

Bokulich, N.A. et al. (2012). Differentiation of mixed lactic acid bacteria communities in beverage fermentations using targeted terminal restriction fragment length polymorphism. *Food Microbiology* 7.

Bokulich, N.A., and Bamforth, W. (2012). A Review of Molecular Methods for Microbial Community Profiling of Beer and Wine. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 70, pp. 150-162

Bokulich, N.A., Joseph, C.M.L., Allen, G., Benson, A.K., and Mills, D.A. (2012). Next-Generation Sequencing Reveals Significant Bacterial Diversity of Botrytized Wine. *PLOS ONE* 7, e36357.

Bokulich, N.A., Ohta, M., Richardson, P.M., and Mills, D.A. (2013). Monitoring Seasonal Changes in Winery-Resident Microbiota. *PLoS ONE* 8, e66437.

Bokulich, N.A., and Mills, D.A. (2013). Facility-specific “house” microbiome drives microbial landscapes of artisan cheesemaking plants. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 5214–5223.

Bokulich, N.A., Bergsveinson, J., Ziola, B., and Mills, D.A. (2015). Mapping microbial ecosystems and spoilage-gene flow in breweries highlights patterns of contamination and resistance. *ELife* 4, e04634.

Bokulich, N.A., Lewis, Z.T., Boundy-Mills, K., and Mills, D.A. (2016). A new perspective on microbial landscapes within food production. *Current Opinion in Biotechnology* 37, 182–189.

Bokulich, N.A., and Mills, D.A. (2018). Improved Selection of Internal Transcribed Spacer-Specific Primers Enables Quantitative, Ultra-High-Throughput Profiling of Fungal Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 8.

Bore, J.M. and Fleckinger, J. (1997). “Pommiers à cidre - Variétés de France”.

Botta, C., and Cocolin, L. (2012). Microbial dynamics and biodiversity in table olive fermentation: culture-dependent and -independent approaches. *Frontiers in Microbiology* 3.

Buron, N., Guichard, H., Coton, E., Ledauphin, J., and Barillier, D. (2011a). Evidence of 4-ethylcatechol as one of the main phenolic off-flavour markers in French ciders. *Food Chemistry* 125, 542–548.

Buron, N., Coton, M., Desmarais, C., Ledauphin, J., Guichard, H., Barillier, D., and Coton, E. (2011b). Screening of representative cider yeasts and bacteria for volatile phenol-production ability. *Food Microbiology* 28, 1243–1251.

Buron, N., Coton, M., Legendre, P., Ledauphin, J., Kientz-Bouchart, V., Guichard, H., Barillier, D., and Coton, E. (2012). Implications of *Lactobacillus collinoides* and *Brettanomyces/Dekkera anomala* in phenolic off-flavour defects of ciders. *International Journal of Food Microbiology* 153, 159–165.

C

Cabranes, C., Mangas, J.J., and Blanco, D. (1997). Selection and biochemical characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* strains isolated from spanish cider. *Journal of the Institute of Brewing* 103, 165–169.

Cai, H., Zhang, T., Zhang, Q., Luo, J., Cai, C., and Mao, J. (2018). Microbial diversity and chemical analysis of the starters used in traditional Chinese sweet rice wine. *Food Microbiology* 73, 319–326.

Campanaro, S., Treu, L., Vendramin, V., Bovo, B., Giacomini, A., and Corich, V. (2014). Metagenomic analysis of the microbial community in fermented grape marc reveals that *Lactobacillus fabifermentans* is one of the dominant species: insights into its genome structure. *Appl Microbiol Biotechnol* 98, 6015–6037.

Carr, J.G. et al. (1957). Occurrence and activity of some lactic acid bacteria from apple juices, ciders and perries. *Journal of the Institute of Brewing* 63, 436–440.

Carr, J.G., and Davies, P.A. (1970). Homofermentative Lactobacilli of Ciders including *Lactobacillus mali* nov. spec. *Journal of Applied Bacteriology* 33, 768–774.

Carr, J.G., and Davies, P.A. (1972). The Ecology and Classification of Strains of *Lactobacillus collinoides* nov. spec.: A Bacterium Commonly Found in Fermenting Apple Juice. *Journal of Applied Bacteriology* 35, 463–471.

Chakravorty, S., Bhattacharya, S., Chatzinotas, A., Chakraborty, W., Bhattacharya, D., and Gachhui, R. (2016). Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *International Journal of Food Microbiology* 10.

Chen, Y. S., Yanagida, F., and Hsu, J. S. (2006). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from suan-tsai (fermented mustard), a traditional fermented food in Taiwan. *J. Appl. Microbiol.* 101, 125–130. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.02900.x .

Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., and Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non- *Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Research* 10, 123–133.

Claisse, O., and Lonvaud-Funel, A. (2000). Assimilation of glycerol by a strain of *Lactobacillus collinoides* isolated from cider. *Food Microbiology* 17, 513–519.

Claisse, O., and Lonvaud-Funel, A. (2001). Détection de bactéries lactiques produisant du 3-hydroxypropionaldéhyde (précurseur d'acroléine) à partir du glycérol par tests moléculaires. *Le Lait* 81, 173–181.

Cleusix, V., Lacroix, C., Vollenweider, S., Duboux, M., and Le Blay, G. (2007). Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria. *BMC Microbiol* 7, 101.

Cocolin, L., Manzano, M., Aggio, D., Cantoni, C., and Comi, G. (2001). A novel polymerase chain reaction (PCR) Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for the identification of *Micrococcaceae* strains involved in meat fermentations. Its application to naturally fermented Italian sausages. *Meat Science* 6.

Cocolin, L., Dolci, P., Rantsiou, K., Urso, R., Cantoni, C., and Comi, G. (2009). Lactic acid bacteria ecology of three traditional fermented sausages produced in the North of Italy as determined by molecular methods. *Meat Science* 8.

Cocolin, L., Campolongo, S., Alessandria, V., Dolci, P., and Rantsiou, K. (2011). Culture independent analyses and wine fermentation: an overview of achievements 10 years after first application. *Ann Microbiol* 61, 17–23.

Cocolin, L., Alessandria, V., Dolci, P., Gorra, R., and Rantsiou, K. (2013a). Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 167, 29–43.

Cocolin, L., Alessandria, V., Botta, C., Gorra, R., De Filippis, F., Ercolini, D., and Rantsiou, K. (2013b). NaOH-Debittering Induces Changes in Bacterial Ecology during Table Olives Fermentation. *PLoS ONE* 8, e69074.

Combina, M., Mercado, L., Borgo, P., Elia, A., Jofre, V., Ganga, A., Martinez, C., and Catania, C. (2005). Yeasts associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina. *J Appl Microbiol* 98, 1055–1061.

Comitini, F., Capece, A., Ciani, M., and Romano, P. (2017). New insights on the use of wine yeasts. *Current Opinion in Food Science* 13, 44–49.

Coton, M., Laplace, J.M., Auffray, Y., and Coton, E. (2005). Duplex PCR method for rapid detection of *Zymomonas mobilis* in cider. *Journal of the Institute of Brewing* 111, 299–303.

Coton, E., Coton, M., Levert, D., Casaregola, S., and Sohier, D. (2006a). Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 108, 130–135.

Coton, M., Laplace, J.M., Auffray, Y., and Coton, E. (2006b). “Framboisé” spoilage in French ciders: *Zymomonas mobilis* implication and characterization. *LWT - Food Science and Technology* 39, 972–979.

Coton, M., Romano, A., Spano, G., Ziegler, K., Vetrana, C., Desmarais, C., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P., and Coton, E. (2010). Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria in wine and cider. *Food Microbiology* 27, 1078–1085.

Couto, J.A., Campos, F.M., Figueiredo, A.R., How, T.A., (2006). Ability of lactic acid bacteria to produce volatile phenols. *American Journal of Enology and Viticulture* 57, 166–171.

Cousin, F., Le Guellec, R., Schlusshuber, M., Dalmasso, M., Laplace, JM., and Cretenet, M. (2017). Microorganisms in Fermented Apple Beverages: Current Knowledge and Future Directions. *Microorganisms* 5, 39.

Cubaiu, L., Abbas, H., Dobson, A., Budroni, M., and Migheli, Q. (2012). A *Saccharomyces cerevisiae* wine strain inhibits growth and decreases ochratoxin a biosynthesis by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus*. *Toxins* 4, 1468–1481.

D

David, V., Terrat, S., Herzine, K., Claisse, O., Rousseaux, S., Tourdot-Maréchal, R., Masneuf-Pomarede, I., Ranjard, L., and Alexandre, H. (2014). High-throughput sequencing of amplicons for monitoring yeast biodiversity in must and during alcoholic fermentation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 41, 811–821.

De Filippis, F., La Stora, A., Stellato, G., Gatti, M., and Ercolini, D. (2014). A selected core microbiome drives the early stages of three popular Italian cheese manufactures. *PLoS ONE* 9, e89680.

De Filippis, F., Genovese, A., Ferranti, P., Gilbert, J.A., and Ercolini, D. (2016). Metatranscriptomics reveals temperature-driven functional changes in microbiome impacting cheese maturation rate. *Sci Rep* 6, 21871.

De Filippis, F., La Stora, A., and Blaiotta, G. (2017). Monitoring the mycobiota during Greco di Tufo and Aglianico wine fermentation by 18S rRNA gene sequencing. *Food Microbiology* 63, 117–122.

De Pasquale, I., Calasso, M., Mancini, L., Ercolini, D., La Stora, A., De Angelis, M., Di Cagno, R., and Gobbetti, M. (2014). Causal relationship between microbial ecology dynamics and proteolysis during manufacture and ripening of Protected Designation of Origin (PDO) Cheese Canestrato Pugliese. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 4085–4094.

De Pasquale, I., Di Cagno, R., Buchin, S., De Angelis, M., and Gobbetti, M. (2016). Spatial distribution of the metabolically active microbiota within Italian PDO Ewes' Milk Cheeses. *PLoS ONE* 11, e0153213.

De Roos, J., and De Vuyst, L. (2018). Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. *Current Opinion in Biotechnology* 49, 115–119.

De Roos, J., and De Vuyst, L. (2019). Microbial acidification, alcoholization, and aroma production during spontaneous lambic beer production. *J. Sci. Food Agric.* 99, 25–38.

Desneux, J., and Pourcher, A.-M. (2014). Comparison of DNA extraction kits and modification of DNA elution procedure for the quantitation of subdominant bacteria from piggy effluents with real-time PCR. *MicrobiologyOpen* 3, 437–445.

Drilleau, J. F. et al. (1991). Les bactéries lactiques dans le cidre. *Actes du colloque Lactique 1991, Bactéries Lactiques*:275-291.

Dobson, A., O’Sullivan, O., Cotter, P.D., Ross, P., and Hill, C. (2011). High-throughput sequence-based analysis of the bacterial composition of kefir and an associated kefir grain: Microbial composition of kefir grain. *FEMS Microbiology Letters* 320, 56–62.

Doyle, C.J., O’Toole, P.W., and Cotter, P.D. (2017). Metagenome-based surveillance and diagnostic approaches to studying the microbial ecology of food production and processing environments: Metagenome-based surveillance and diagnostic approaches. *Environmental Microbiology* 19, 4382–4391.

Dueñas, M., Irastorza, A., Munduate, A., Santos, J.I., Berregi, I., del Campo, G., (2002). Influence of enzymatic clarification with a pectin methylesterase on cider fermentation. *Journal of the Institute of Brewing* 108, 243–247.

E

Egli, C.M., Edinger, W.D., Mittrakul, C.M., and Henick-Kling, T. (1998). Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. *Journal of Applied Microbiology* 85, 779–789.

El Khoury, M., Campbell-Sills, H., Salin, F., Guichoux, E., Claisse, O., and Lucas, P.M. (2017). Biogeography of *Oenococcus oeni* Reveals Distinctive but Nonspecific Populations in Wine-Producing Regions. *Appl Environ Microbiol* 83, e02322-16, e02322-16.

Elyas, Y.Y.A., Yousif, N.M.E., and Mohamed Ahmed, I.A. (2015). Screening of lactic acid bacteria from sudanese fermented foods for bacteriocin production. *JMBFS* 04, 373–378.

El-Ziney, M.G., Arneborg, N., Uyttendaele, M., Debevere, J., and Jakobsen, M. (1998). Characterization of growth and metabolite production of *Lactobacillus reuteri* during glucose/glycerol cofermentation in batch and continuous cultures. *Biotech. Letters*, Vol 20, No 10, pp. 913–916.

Ercolini, D. et al. (2004). PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods* 18.

Ercolini, D., De Filippis, F., La Stora, A., and Iacono, M. (2012). “Remake” by High-Throughput Sequencing of the microbiota involved in the production of water buffalo mozzarella cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 8142–8145.

Ercolini, D. et al. (2013). High-Throughput Sequencing and metagenomics: moving forward in the culture-independent analysis of food microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 3148–3155.

Ercolini, D., Russo, F., Torrieri, E., Masi, P., and Villani, F. (2018a). Changes in the spoilage-related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 9.

Ercolini, D., Ferrocino, I., Nasi, A., Ndagijimana, M., Vernocchi, P., Stora, A.L., Laghi, L., Mauriello, G., Guerzoni, M.E., and Villani, F. (2018b). Monitoring of microbial metabolites and bacterial diversity in beef stored under different packaging conditions *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 10.

Escribano-Viana, R., González-Arenzana, L., Portu, J., Garijo, P., López-Alfaro, I., López, R., Santamaría, P., and Gutiérrez, A.R. (2018). Wine aroma evolution throughout alcoholic fermentation sequentially inoculated with non-*Saccharomyces*/*Saccharomyces* yeasts. *Food Research International* 112, 17–24.

F

Fleet, G. et al. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology* 86, 11–22.

Forage, R.G., and Foster, M.A. (1982). Glycerol fermentation in *Klebsiella pneumoniae*: functions of the coenzyme B12-dependent glycerol and diol dehydratases. *Journal of Bacteriology* 149, 413–419.

de Fouchécour, F., Sánchez-Castañeda, A.-K., Saulou-Bérion, C., and Spinnler, H.É. (2018). Process engineering for microbial production of 3-hydroxypropionic acid. *Biotechnology Advances* 36, 1207–1222.

Freer, S.N. et al. (2002). Acetic acid production by *Dekkera/Brettanomyces* yeasts. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 18: 271–275, 2002.

G

G-Alegria, E., Lopez, I., Ruiz, J.I., Saenz, J., Fernandez, E., Zarazaga, M., Dizy, M., Torres, C., and Ruiz-Larrea, F. (2004). High tolerance of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol. *FEMS Microbiology Letters* 230, 53–61.

Gamero, A., Tronchoni, J., Querol, A., and Belloch, C. (2013). Production of aroma compounds by cryotolerant *Saccharomyces* species and hybrids at low and moderate fermentation temperatures. *J Appl Microbiol* 114, 1405–1414.

Garai, G., Dueñas, M.T., Irastorza, A., and Moreno-Arribas, M.V. (2007). Biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from cider. *Lett Appl Microbiol* 45, 473–478.

Garai-Ibabe, G., Ibarburu, I., Berregi, I., Claisse, O., Lonvaud-funel, A., Irastorza, A., and Duenas, M. (2008). Glycerol metabolism and bitterness producing lactic acid bacteria in cidermaking. *International Journal of Food Microbiology* 121, 253–261.

Giannattasio, S., Guaragnella, N., Corte-Real, M., Passarella, S., and Marra, E. (2005). Acid stress adaptation protects *Saccharomyces cerevisiae* from acetic acid-induced programmed cell death. *Gene* 354, 93–98.

Gilbert, J.A., van der Lelie, D., and Zarraonaindia, I. (2013). Microbial terroir for wine grapes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 5–6.

Glenn, D.M., Bassett, C., and Dowd, S.E. (2015). Effect of pest management system on ‘Empire’ apple leaf phyllosphere populations. *Scientia Horticulturae* 183, 58–65.

Golubev, W.I. et al. (2006). Antagonistic interactions among yeasts. In *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, G. Péter, and C. Rosa, eds. (Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag), pp. 197–219.

Gómez-Torres, N., Ávila, M., Gaya, P., and Garde, S. (2014). Prevention of late blowing defect by reuterin produced in cheese by a *Lactobacillus reuteri* adjunct. *Food Microbiology* 42, 82–88.

Gonzáles, M.J. et al. (2019). Bioconversion of crude glycerol into reuterin by lactobacilli isolated from silage. *JMBFS* 9, 174–178.

Gorni, C., Allemand, D., Rossi, D., and Mariani, P. (2015). Microbiome profiling in fresh-cut products. *Trends in Food Science & Technology* 46, 295–301.

Graça, A., Santo, D., Esteves, E., Nunes, C., Abadias, M., and Quintas, C. (2015). Evaluation of microbial quality and yeast diversity in fresh-cut apple. *Food Microbiology* 51, 179–185.

Grattepanche, F., Lacroix, C., Audet, P., and Lapointe, G. (2005). Quantification by real-time PCR of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* in milk fermented by a mixed culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 66, 414–421.

Gray, S.R., Rawsthorne, H., Dirks, B., and Phister, T.G. (2011). Detection and enumeration of *Dekkera anomala* in beer, cola, and cider using real-time PCR. *Letters in Applied Microbiology* 8.

Guerzoni, M.E., Ferruzzi, M., Gardini, F., and Lanciotti, R. (1999). Combined effects of ethanol, high homogenization pressure, and temperature on cell fatty acid composition in *Saccharomyces cerevisiae*. 45, 6.

Guichard, H., Lemesle, S., Ledauphin, J., Barillier, D., and Picoche, B. (2003). Chemical and sensorial aroma characterization of freshly distilled calvados. 1. evaluation of quality and defects on the basis of key odorants by olfactometry and sensory analysis. *J. Agric. Food Chem.* 51, 424–432.

Guichard, H., Poupard, P., Legoahec, L., Millet, M., Bauduin, R., and Le Quéré, J.-M. (2019). *Brettanomyces anomalus*, a double drawback for cider aroma. *LWT* 102, 214–222.

H

Hammes, W.P., and Tichaczek, P.S. (1994). The potential of lactic acid bacteria for the production of safe and wholesome food. *Z Lebensm Unters Forch* 198, 193–201.

Hatoum, R., Labrie, S., and Fliss, I. (2012). Antimicrobial and Probiotic Properties of Yeasts: From Fundamental to Novel Applications. *Front. Microbio.* 3.

He, G., Liu, T., Sadiq, F.A., Gu, J., and Zhang, G. (2017). Insights into the microbial diversity and community dynamics of Chinese traditional fermented foods from using high-throughput sequencing approaches. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B* 18, 289–302.

Herrero, M., García, L.A., and Díaz, M. (2006). Volatile compounds in cider: inoculation time and fermentation temperature effects. *Journal of the Institute of Brewing* 112, 210–214.

Hierro, N., Esteve-Zarzoso, B., Gonzalez, A., Mas, A., and Guillamon, J.M. (2006). Real-Time Quantitative PCR (QPCR) and Reverse Transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 7148–7155.

Illegghems, K., De Vuyst, L., Papalexandratou, Z., and Weckx, S. (2012). Phylogenetic analysis of a spontaneous cocoa bean fermentation metagenome reveals new insights into its bacterial and fungal community diversity. *PLoS ONE* 7, e38040.

I

Ingledeu, W.M. et al. (1979). Effect of bacterial contaminants on beer. A Review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 37, 145–150.

J

Jespersen, L., and Jakobsen, M. (1996). Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. *International Journal of Food Microbiology* 33, 139–155.

Jolly, N.P., Varela, C., and Pretorius, I.S. (2014). Not your ordinary yeast: non-yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Research* 14, 215–237.

Jung, I.S., and Lovitt, R.W. (2010). A comparative study of an intensive malolactic transformation of cider using *Lactobacillus brevis* and *Oenococcus oeni* in a membrane bioreactor. *J Ind Microbiol Biotechnol* 37, 727–740.

Jung, J.Y., Lee, S.H., Kim, J.M., Park, M.S., Bae, J.-W., Hahn, Y., Madsen, E.L., and Jeon, C.O. (2011). Metagenomic analysis of kimchi, a traditional korean fermented food. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 2264–2274.

Juste, A., Thomma, B., and Lievens, B. (2008). Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiology* 25, 745–761.

K

Kanter, J.-P., Benito, S., Brezina, S., Beisert, B., Fritsch, S., Patz, C.-D., and Rauhut, D. (2020). The impact of hybrid yeasts on the aroma profile of cool climate Riesling wines. *Food Chemistry: X* 5, 100072.

Kapetanakou, A.E., Kollias, J.N., Drosinos, E.H., and Skandamis, P.N. (2012). Inhibition of *A. carbonarius* growth and reduction of ochratoxin A by bacteria and yeast composites of technological importance in culture media and beverages. *International Journal of Food Microbiology* 152, 91–99.

Kaunzinger, A., Wüst, M., Gröbmiller, H., Burow, S., Hemmrich, U., Dietrich, A., Beck, T., Hener, U., Mosandl, A., and Rapp, A. (1996). Enantiomer distribution of ethyl lactate : a new criterion for quality assurance of wine. *Z Lebensm Unters Forch* 203, 499–500.

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. *Journal of Food Protection* 67, 2240–2247.

Kergourlay, G., Taminiau, B., Daube, G., and Vergès, M.-C.C. (2015). Metagenomic insights into the dynamics of microbial communities in food. *International Journal of Food Microbiology* 9.

Kiyohara, M., Koyanagi, T., Matsui, H., Yamamoto, K., Take, H., Katsuyama, Y., Tsuji, A., Miyamae, H., Kondo, T., Nakamura, S., et al. (2012). Changes in microbiota population during fermentation of *narezushi* as revealed by pyrosequencing analysis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 76, 48–52.

Knauth, S., Schmidt, H., and Tippkötter, R. (2013). Comparison of commercial kits for the extraction of DNA from paddy soils. *Letters in Applied Microbiology* 56, 222–228.

König, H., and Fröhlich, J. (2009). “Lactic acid bacteria,” in *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, eds H. König, G. Uden, and J. Fröhlich (Verlag Berlin Heidelberg: Springer), 3–30.

Koyanagi, T., Kiyohara, M., Matsui, H., Yamamoto, K., Kondo, T., Katayama, T., and Kumagai, H. (2011). Pyrosequencing survey of the microbial diversity of *narezushi*, an archetype of modern Japanese sushi. *Letters in Applied Microbiology* 6.

Kurtzman, C.P. et al. (2005). New species and new combinations in the yeast genera *Kregervanrija* gen. nov., *Saturnispora* and *Candida*. *FEMS Yeast Research* 6, 288–297.

L

Landaud, S., Helinck, S., and Bonnarme, P. (2008). Formation of volatile sulfur compounds and metabolism of methionine and other sulfur compounds in fermented food. *Appl Microbiol Biotechnol* 77, 1191–1205.

Laplace, J.M., Sauvageot, N., Hartke, A., and Auffray, Y. (1999). Characterization of *Lactobacillus collinoides* response to heat, acid and ethanol treatments. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51, 659–663.

- Laureys, D., and De Vuyst, L. (2014).** Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water kefir fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* *80*, 2564–2572.
- Laureys, D., Aerts, M., Vandamme, P., and De Vuyst, L. (2018).** Oxygen and diverse nutrients influence the water kefir fermentation process. *Food Microbiology* *73*, 351–361.
- Lazarevic, V., Gaïa, N., Girard, M., François, P., and Schrenzel, J. (2013).** Comparison of DNA Extraction Methods in Analysis of Salivary Bacterial Communities. *PLoS ONE* *8*, e67699.
- Le Dréan, G., Mounier, J., Vasseur, V., Arzur, D., Habrylo, O., and Barbier, G. (2010).** Quantification of *Penicillium camemberti* and *P. roqueforti* mycelium by real-time PCR to assess their growth dynamics during ripening cheese. *International Journal of Food Microbiology* *138*, 100–107.
- Le Quéré, J.-M., Husson, F., Renard, C.M.G.C., and Primault, J. (2006).** French cider characterization by sensory, technological and chemical evaluations. *LWT - Food Science and Technology* *39*, 1033–1044.
- Ledauphin, J., Le Milbeau, C., Barillier, D., and Hennequin, D. (2010).** Differences in the Volatile Compositions of French Labeled Brandies (Armagnac, Calvados, Cognac, and Mirabelle) Using GC-MS and PLS-DA. *J. Agric. Food Chem.* *58*, 7782–7793.
- Lee, H., Yoon, H., Ji, Y., Kim, H., Park, H., Lee, J., Shin, H., and Holzapfel, W. (2011).** Functional properties of *Lactobacillus* strains isolated from kimchi. *International Journal of Food Microbiology* *145*, 155–161.
- Li, E., and Mira de Orduña, R. (2017).** Acetaldehyde kinetics of enological yeast during alcoholic fermentation in grape must. *J Ind Microbiol Biotechnol* *44*, 229–236.
- Li, C.X., Zhao, X.H., Zuo, W.F., Zhang, T.L., Zhang, Z.Y., and Chen, X.S. (2020).** The effects of simultaneous and sequential inoculation of yeast and autochthonous *Oenococcus oeni* on the chemical composition of red-fleshed apple cider. *LWT* *124*, 109184.
- 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*, 744–753.
- Lindgren, S.E., and Dobrogosz, W.J. (1990).** Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Letters* *87*, 149–164.
- Lindlbauer, K.A., Marx, H., and Sauer, M. (2017).** 3-Hydroxypropionaldehyde production from crude glycerol by *Lactobacillus diolivorans* with enhanced glycerol uptake. *Biotechnol Biofuels* *10*, 295.
- Liu, W., Zheng, Y., Kwok, L.-Y., Sun, Z., Zhang, J., Guo, Z., Hou, Q., Menhe, B., and Zhang, H. (2015).** High-throughput sequencing for the detection of the bacterial and fungal diversity in Mongolian naturally fermented cow's milk in Russia. *12*.
- Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H., and Forney, L.J. (1997).** Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* *63*, 4516–4522.

Lombardi, S.J., Pannella, G., Iorizzo, M., Testa, B., Succi, M., Tremonte, P., Sorrentino, E., Di Renzo, M., Strollo, D., and Coppola, R. (2020). Inoculum strategies and performances of malolactic starter *Lactobacillus plantarum* m10: impact on chemical and sensorial characteristics of fiano wine. *Microorganisms* 8, 516.

Lonvaud-Funel, A. W.N. Konings, O.P. Kuipers, and J.H.J.H. In 't Veld, eds. (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 317-331.

Lonvaud-Funel, A. et al. (2002). Lactic acid bacteria in winemaking: influence on sensorial and hygienic quality. *Progress in Industrial Microbiology*, vol. 36, Elsevier Science, Amsterdam, pp. 231-262

M

Madrera, R.R., Gomis, D.B., and Alonso, J.J.M. (2003). Influence of distillation system, oak wood type, and aging time on volatile compounds of cider brandy. *J. Agric. Food Chem.* 51, 5709–5714.

Maicas, S., Gil, J.-V., Pardo, I., and Ferrer, S. (1999). Improvement of volatile composition of wines by controlled addition of malolactic bacteria. *Food Research International* 32, 491–496.

Marco, M.L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C.J., Cotter, P.D., Foligné, B., Gänzle, M., Kort, R., Pasin, G., Pihlanto, A., et al. (2017). Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Current Opinion in Biotechnology* 44, 94–102.

Marsh, T.L. et al. (1999). Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): An emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Current Opinion in Microbiology* 2, 323–327.

Marsh, A.J., O'Sullivan, O., Hill, C., Ross, R.P., and Cotter, P.D. (2014). Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. *Food Microbiology* 38, 171–178.

Martin, K.J., and Rygiewicz, P.T. (2005). Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology* 11.

Marzano, M., Fosso, B., Manzari, C., Grieco, F., Intranuovo, M., Cozzi, G., Mulè, G., Scioscia, G., Valiente, G., Tullo, A., et al. (2016). Complexity and dynamics of the winemaking bacterial communities in berries, musts, and wines from apulian grape Cultivars through Time and Space. *PLOS ONE* 11, e0157383.

Masco, L., Vanhoutte, T., Temmerman, R., Swings, J., and Huys, G. (2007). Evaluation of real-time PCR targeting the 16S rRNA and *recA* genes for the enumeration of bifidobacteria in probiotic products. *International Journal of Food Microbiology* 113, 351–357.

Masneuf-Pomarède, I., Mansour, C., Murat, M.-L., Tominaga, T., and Dubourdieu, D. (2006). Influence of fermentation temperature on volatile thiols concentrations in Sauvignon blanc wines. *International Journal of Food Microbiology* 108, 385–390.

- Meilgaard, M.C., et al. (1975).** Flavor chemistry of beer. I. Flavor interaction between principal volatiles. *Technical Quarterly, Master Brewers Association of America*, (1975). 12(2): p. 107-117.
- Meilgaard, M.C., et al. (1975).** Flavor chemistry of beer. II. Flavor and threshold of 239 aroma volatiles. *Technical Quarterly, Master Brewers Association of America*. 12(3): p. 151-168.
- Mendes-Ferreira, A., Barbosa, C., Lage, P., and Mendes-Faia, A. (2011).** The impact of nitrogen on yeast fermentation and wine quality. *Ciência Téc. Vitiv.* 26, 17–32.
- Mendoza, L.M., de Nadra, M.C.M., and Farías, M.E. (2010).** Antagonistic interaction between yeasts and lactic acid bacteria of oenological relevance. *Food Research International* 43, 1990–1998.
- Mestres, M., Busto, O., and Guasch, J. (2000).** Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma. *Journal of Chromatography A* 881, 569–581.
- Milanović, V., Osimani, A., Garofalo, C., De Filippis, F., Ercolini, D., Cardinali, F., Taccari, M., Aquilanti, L., and Clementi, F. (2018).** Profiling white wine seed vinegar bacterial diversity through viable counting, metagenomic sequencing and PCR-DGGE. *International Journal of Food Microbiology* 286, 66–74.
- Minervini, F., Lattanzi, A., De Angelis, M., Celano, G., and Gobbetti, M. (2015).** House microbiotas as sources of lactic acid bacteria and yeasts in traditional Italian sourdoughs. *Food Microbiology* 52, 66–76.
- Morakul, S., Mouret, J.-R., Nicolle, P., Trelea, I.C., Sablayrolles, J.-M., and Athes, V. (2011).** Modelling of the gas–liquid partitioning of aroma compounds during wine alcoholic fermentation and prediction of aroma losses. *Process Biochemistry* 46, 1125–1131.
- Morales, P., Rojas, V., Quirós, M., and Gonzalez, R. (2015).** The impact of oxygen on the final alcohol content of wine fermented by a mixed starter culture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99, 3993–4003.
- Morgan, H.H., du Toit, M., and Setati, M.E. (2017).** The grapevine and wine microbiome: insights from High-Throughput amplicon Sequencing. *Frontiers in Microbiology* 8.
- Morgan, S.C., Tantikachornkiat, M., Scholl, C.M., Benson, N.L., Cliff, M.A., and Durall, D.M. (2019).** The effect of sulfur dioxide addition at crush on the fungal and bacterial communities and the sensory attributes of Pinot gris wines. *International Journal of Food Microbiology* 290, 1–14.
- Morrison-Whittle, P., Lee, S.A., Fedrizzi, B., and Goddard, M.R. (2018).** Co-evolution as tool for diversifying flavor and aroma profiles of wines. *Frontiers in Microbiology* 9.
- Morrissey, W.F., Davenport, B., Querol, A., and Dobson, A.D.W. (2004).** The role of indigenous yeasts in traditional Irish cider fermentations. *J Appl Microbiol* 97, 647–655.
- Mosciano G., Fasano M., Cassidy J., Connelly K., Mazeiko P., Montenegro A., Michalski J. and Sadural S. (1993).** Organoleptic characteristics of flavor materials. *Perfumer-Flavorist* 18: 51.

Mouret, J.R., Camarasa, C., Angenieux, M., Aguera, E., Perez, M., Farines, V., and Sablayrolles, J.M. (2014). Kinetic analysis and gas–liquid balances of the production of fermentative aromas during winemaking fermentations: Effect of assimilable nitrogen and temperature. *Food Research International* 62, 1–10.

Mufandaedza, J., Viljoen, B.C., Feresu, S.B., and Gadaga, T.H. (2006). Antimicrobial properties of lactic acid bacteria and yeast-LAB cultures isolated from traditional fermented milk against pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* strains. *International Journal of Food Microbiology* 108, 147–152.

N

Nalbantoglu, U., Cakar, A., Dogan, H., Abaci, N., Ustek, D., Sayood, K., and Can, H. (2014). Metagenomic analysis of the microbial community in kefir grains. *Food Microbiology* 41, 42–51.

Nam, Y.-D., Park, S., and Lim, S.-I. (2012a). Microbial composition of the korean traditional food “kochujang” analyzed by a massive sequencing technique. *Journal of Food Science* 77, M250–M256.

Nam, Y.-D., Yi, S.-H., and Lim, S.-I. (2012b). Bacterial diversity of cheonggukjang, a traditional Korean fermented food, analyzed by barcoded pyrosequencing. *Food Control* 8.

Nie, Z., Zheng, Y., Wang, M., Han, Y., Wang, Y., Luo, J., and Niu, D. (2013). Exploring microbial succession and diversity during solid-state fermentation of Tianjin duliu mature vinegar. *Bioresource Technology* 148, 325–333.

Nissen, P., Nielsen, D., and Arneborg, N. (2003). Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism. *Yeast* 20, 331–341.

O

Oliveira, A.P.D. de, Costa, M.M. da, Nogueira, D.M., and Dias, F.S. (2020). Characterisation of *Staphylococcus aureus* strains from milk and goat cheese and evaluation of their inhibition by gallic acid, nisin and velame of the Brazilian caatinga. *Int J Dairy Technol* 73, 345–356.

O’Sullivan, D.J., Cotter, P.D., O’Sullivan, O., Giblin, L., McSweeney, P.L.H., and Sheehan, J.J. (2015). Temporal and spatial differences in microbial composition during the manufacture of a continental-type cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 2525–2533.

Ottesen, A.R., White, J.R., Skaltsas, D.N., Newell, M.J., and Walsh, C.S. (2009). Impact of Organic and Conventional Management on the Phyllosphere Microbial Ecology of an Apple Crop. *Journal of Food Protection* 72, 2321–2325.

P

- Parente, E., Guidone, A., Matera, A., De Filippis, F., Mauriello, G., and Ricciardi, A. (2016).** Microbial community dynamics in thermophilic undefined milk starter cultures. *International Journal of Food Microbiology* 217, 59–67.
- Parente, E., De Filippis, F., Ercolini, D., Ricciardi, A., and Zotta, T. (2019).** Advancing integration of data on food microbiome studies: FoodMicrobionet 3.1, a major upgrade of the FoodMicrobionet database. *International Journal of Food Microbiology* 305, 108249.
- Park, E.-J., Chang, H.-W., Kim, K.-H., Nam, Y.-D., Roh, S.W., and Bae, J.-W. (2010).** Application of quantitative real-time PCR for enumeration of total bacterial, archaeal, and yeast populations in kimchi. *The Journal of Microbiology* 47, 682–685.
- Park, J.-M., Shin, J.-H., Gu, J.-G., Yoon, S.-J., Song, J.-C., Jeon, W.-M., Suh, H.-J., Chang, U.-J., Yang, C.-Y., and Kim, J.-M. (2011).** Effect of antioxidant activity in kimchi during a short-term and over-ripening fermentation period. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 112, 356–359.
- Park, E.-J., Chun, J., Cha, C.-J., Park, W.-S., Jeon, C.O., and Bae, J.-W. (2012).** Bacterial community analysis during fermentation of ten representative kinds of kimchi with barcoded pyrosequencing. *Food Microbiology* 30, 197–204.
- Passmore, S.M., and Carr, J.G. (1975).** The Ecology of the acetic acid bacteria with particular reference to cider manufacture. *Journal of Applied Bacteriology* 38, 151–158.
- Pei, A.Y., Oberdorf, W.E., Nossa, C.W., Agarwal, A., Chokshi, P., Gerz, E.A., Jin, Z., Lee, P., Yang, L., Poles, M., et al. (2010).** Diversity of 16S rRNA genes within individual prokaryotic genomes. *AEM* 76, 3886–3897.
- Peng, B., Li, F., Cui, L., and Guo, Y. (2015).** Effects of fermentation temperature on key aroma compounds and sensory properties of apple wine: effects of temperature on apple wine. *Journal of Food Science* 80, S2937–S2943.
- Perez-Gonzalez, J.A., Gonzalez, R., Querol, A., Sendra, J., and RAMON, D. (1993).** Construction of a recombinant wine yeast strain expressing β -(1,4)-endoglucanase and its use in microvinification processes. *Appl. Environ. Microbiol.*, Sept. 1993, p. 2801-2806, 59, 6.
- Petrosino, J.F., Highlander, S., Luna, R.A., Gibbs, R.A., and Versalovic, J. (2009).** Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clinical Chemistry* 55, 856–866.
- Piao, H., Hawley, E., Kopf, S., DeScenzo, R., Sealock, S., Henick-Kling, T., and Hess, M. (2015).** Insights into the bacterial community and its temporal succession during the fermentation of wine grapes. *Frontiers in Microbiology* 6.
- Pinto, A.C. et al. (2015).** Wine fermentation microbiome: a landscape from different Portuguese wine appellations. *Frontiers in Microbiology* 6, 13.
- Piras, C., Roncada, P., Rodrigues, P.M., Bonizzi, L., and Soggiu, A. (2016).** Proteomics in food: Quality, safety, microbes, and allergens. *Proteomics* 16, 799–815.

Pires, E.J., Teixeira, J.A., Brányik, T., and Vicente, A.A. (2014). Yeast: the soul of beer's aroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* 98, 1937–1949.

Ponsone, M.L., Nally, M.C., Chiotta, M.L., Combina, M., Köhl, J., and Chulze, S.N. (2016). Evaluation of the effectiveness of potential biocontrol yeasts against black sur rot and ochratoxin A occurring under greenhouse and field grape production conditions. *Biological Control* 103, 78–85.

Portillo, M. del C., and Mas, A. (2016). Analysis of microbial diversity and dynamics during wine fermentation of Grenache grape variety by high-throughput barcoding sequencing. *LWT - Food Science and Technology* 72, 317–321.

Postollec, F., Falentin, H., Pavan, S., Combrisson, J., and Sohier, D. (2011). Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food Microbiology* 28, 848–861.

Psifidi, A., Dovas, C.I., Bramis, G., Lazou, T., Russel, C.L., Arsenos, G., and Banos, G. (2015). Comparison of eleven methods for genomic dna extraction suitable for large-scale whole-genome genotyping and long-term DNA banking using blood samples. *PLOS ONE* 10, e0115960.

Puertas, A.I., Arahall, D.R., Ibarburu, I., Elizaquível, P., Aznar, R., and Dueñas, M.T. (2014). *Lactobacillus sicerae* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from Spanish natural cider. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64, 2949–2955.

Puertas, A.I., Capozzi, V., Llamas, M.G., López, P., Lamontanara, A., Orrù, L., Russo, P., Spano, G., and Dueñas, M.T. (2016). Draft Genome Sequence of *Lactobacillus collinoides* CUPV237, an Exopolysaccharide and Riboflavin Producer Isolated from Cider. *Genome Announc.* 4, e00506-16, /ga/4/3/e00506-16.atom.

Q

Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., and Cotter, P.D. (2012). High-Throughput Sequencing for detection of subpopulations of bacteria not previously associated with artisanal cheeses. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 5717–5723.

R

Rasch, M. et al. (2002). The influence of temperature, salt and pH on the inhibitory effect of reuterin on *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology* 72, 225–231.

Rebecchi, A., Pisacane, V., Miragoli, F., Polka, J., Falasconi, I., Morelli, L., and Puglisi, E. (2015). High-throughput assessment of bacterial ecology in hog, cow and ovine casings used in sausages production. *International Journal of Food Microbiology* 212, 49–59.

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.

Rita, R.-D., Zanda, K., Daina, K., and Dalija, S. (2011). Composition of aroma compounds in fermented apple juice: effect of apple variety, fermentation temperature and inoculated yeast concentration. *Procedia Food Science* 1, 1709–1716.

Rivaldi, J.D., Sousa Silva, M.L.C., Duarte, L.C., Ferreira, A.E.N., Cordeiro, C., de Almeida Felipe, M. das G., de Ponces Freire, A., and de Mancilha, I.M. (2013). Metabolism of biodiesel-derived glycerol in probiotic *Lactobacillus* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 1735–1743.

Rodríguez Madrera, R., Suárez Valles, B., García Hevia, A., García Fernández, O., Fernández Tascón, N., and Mangas Alonso, J.J. (2006). Production and composition of cider spirits distilled in “Alquitara.” *J. Agric. Food Chem.* 54, 9992–9997.

Rosend, J., Kuldjårv, R., Rosenvald, S., and Paalme, T. (2019). The effects of apple variety, ripening stage, and yeast strain on the volatile composition of apple cider. *Heliyon* 5, e01953.

Rubin, B.E.R., Gibbons, S.M., Kennedy, S., Hampton-Marcell, J., Owens, S., and Gilbert, J.A. (2013). Investigating the impact of storage conditions on microbial community composition in soil samples. *PLoS ONE* 8, e70460.

S

Sablayrolles, J.-M., Dubois, C., Manginot, C., Roustan, J.-L., and Barre, P. (1996). Effectiveness of combined ammoniacal nitrogen and oxygen additions for completion of sluggish and stuck wine fermentations. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 82, 377–381.

Saerens, S.M.G., Delvaux, F.R., Verstrepen, K.J., and Thevelein, J.M. (2010). Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*: Production and biological function of volatile esters in yeast. *Microbial Biotechnology* 3, 165–177.

Salih, A.G., Quéré, J.-M.L., Drilleau, J.-F., and Fernandez, J.M. (1990). Lactic acid bacteria and malolactic fermentation in the manufacture of spanish cider. *Journal of the Institute of Brewing* 96, 369–372.

Salmon, J.-M. (2008). Evolution du pH pendant la fermentation alcoolique de moûts de raisins : modélisation et interprétation métabolique. Thèse.

Salveti, E., Harris, H.M.B., Felis, G.E., and O’Toole, P.W. (2018). Comparative Genomics of the Genus *Lactobacillus* Reveals Robust Phylogroups That Provide the Basis for Reclassification. *Appl Environ Microbiol* 84, e00993-18, /aem/84/17/e00993-18.atom.

- Sánchez, A., Rodríguez, R., Coton, M., Coton, E., Herrero, M., García, L.A., and Díaz, M. (2010).** Population dynamics of lactic acid bacteria during spontaneous malolactic fermentation in industrial cider. *Food Research International* 43, 2101–2107.
- Sánchez, A., Coton, M., Coton, E., Herrero, M., García, L.A., and Díaz, M. (2012).** Prevalent lactic acid bacteria in cider cellars and efficiency of *Oenococcus oeni* strains. *Food Microbiology* 32, 32–37.
- Sánchez, A., de Revel, G., Antalick, G., Herrero, M., García, L.A., and Díaz, M. (2014).** Influence of controlled inoculation of malolactic fermentation on the sensory properties of industrial cider. *J Ind Microbiol Biotechnol* 41, 853–867.
- Saranraj, P., Naidu, M.A., and Sivasakthivelan, P. (2010).** Lactic Acid Bacteria and its antimicrobial properties: a review. 4, 10.
- Sauvageot, N., Gouffi, K., Laplace, J.-M., and Auffray, Y. (2000).** Glycerol metabolism in *Lactobacillus collinoides*: production of 3-hydroxypropionaldehyde, a precursor of acrolein. *International Journal of Food Microbiology* 55, 167–170.
- Sauvageot, N., Muller, C., Hartke, A., Auffray, Y., and Laplace, J.-M. (2002).** Characterisation of the diol dehydratase *pdu* operon of *Lactobacillus collinoides*. *FEMS Microbiology Letters* 209, 69–74.
- Schaefer, L., Auchtung, T.A., Hermans, K.E., Whitehead, D., Borhan, B., and Britton, R.A. (2010).** The antimicrobial compound reuterin (3-hydroxypropionaldehyde) induces oxidative stress via interaction with thiol groups. *Microbiology* 156, 1589–1599.
- Shah, N. P., da Cruz, A. G., and Faria, J. D. A. F. (2013).** Probiotics and probiotic foods: technology, stability and benefits to human health. New York, NY: Nova Science Publishers
- Schrezenmeir, J., and de Vrese, M. (2001).** Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73, 361s–364s.
- Schütz, H. et al. (1984).** Anaerobic reduction of glycerol to propanediol-1.3 by *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*. *System. Appl. Microbiol.* 5, 169–178.
- Serjak, W.C., Day, W.H., Lanen, J.M.V., and Boruff, C.S. (1953).** Acrolein production by bacteria found in distillery grain mashes. *Appl Microbiol* 2:14–20.
- Setati, M.E., Jacobson, D., Andong, U.-C., and Bauer, F. (2012).** The Vineyard Yeast Microbiome, a Mixed Model Microbial Map. *PLOS ONE* 7, 11.
- Setati, M.E., Jacobson, D., and Bauer, F.F. (2015).** Sequence-based analysis of the *vitis vinifera* l. cv cabernet sauvignon grape must mycobiome in three south african vineyards employing distinct agronomic systems. *Frontiers in Microbiology* 6.
- Seyfried, M., Daniel, R., and Gottschalk, G. (1996).** Cloning, sequencing, and overexpression of the genes encoding coenzyme B12-dependent glycerol dehydratase of *Citrobacter freundii*. *Journal of Bacteriology* 178, 5793–5796.
- Shade, A., McManus, P.S., and Handelsman, J. (2013).** Unexpected diversity during community succession in the apple flower microbiome. *MBio* 4, e00602-12.

Simon, J-P., Dechatre, J-C., Gilles Y., (2006). Contribution à l'étude des déviations aromatiques d'origine fermentaire dans les cidres de Normandie. Rapport de l'ARAC.

Smid, E.J., and Hugenholtz, J. (2010). Functional Genomics for Food Fermentation Processes. *Annual Review of Food Science and Technology* 1, 497–519.

Smiley, K.L. & Sobolov, M. (1962) A cobamide-requiring glycerol dehydrase from by an acrolein-forming *Lactobacillus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 97, 538-543.

Sobolov *et al.* (1960) Metabolism of glycerol by an carolein-forming *Lactobacillus* J. *Bacteriol.* 79, 261-266.

Soden, A., Francis, I.L., Oakey, H., and Henschke, P.A. (2000). Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. *Aust J Grape Wine Res* 6, 21–30.

Song, Y., Gibney, P., Cheng, L., Liu, S., and Peck, G. (2020). Yeast assimilable nitrogen concentrations influence yeast gene expression and hydrogen sulfide production during cider fermentation. *Front. Microbiol.* 11, 1264.

Spinler, J.K., Taweechotipatr, M., Rognerud, C.L., Ou, C.N., Tumwasorn, S., and Versalovic, J. (2008). Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. *Anaerobe* 14, 166–171.

Spitaels, F., Wieme, A.D., Janssens, M., Aerts, M., Daniel, H.-M., Landschoot, A.V., Vuyst, L.D., and Vandamme, P. (2014). The microbial diversity of traditional spontaneously fermented lambic beer. *PLOS ONE* 9, 13.

Sreekumar, R., Al-Attabi, Z., Deeth, H.C., and Turner, M.S. (2009). Volatile sulfur compounds produced by probiotic bacteria in the presence of cysteine or methionine. *Letters in Applied Microbiology*.

Starke, I.C., Vahjen, W., Pieper, R., and Zentek, J. (2014). The influence of dna extraction procedure and primer set on the bacterial community analysis by pyrosequencing of barcoded 16s rna gene amplicons. *Molecular Biology International* 2014, 1–10.

Stratford M. *et al.* (2006). Food and beverage spoilage yeasts. In: Querol A, Fleet GH, eds. *The yeast handbook: yeasts in food and beverages*. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 335–79

Stribny, J., Gamero, A., Pérez-Torrado, R., and Querol, A. (2015). *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces uvarum* differ from *Saccharomyces cerevisiae* during the production of aroma-active higher alcohols and acetate esters using their amino acidic precursors. *International Journal of Food Microbiology* 205, 41–46.

Su, Y., Gamero, A., Rodríguez, M.E., Lopes, C.A., Querol, A., and Guillamón, J.M. (2019). Interspecific hybridisation among diverse *Saccharomyces* species: A combined biotechnological solution for low-temperature and nitrogen-limited wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 310, 108331.

Šučur, S., Čadež, N., and Košmerl, T. (2016). Volatile phenols in wine: control measures of *Brettanomyces/Dekkera* yeasts. *Acta Agric. Slov.* 107, 453.

Sumby, K.M., Grbin, P.R., and Jiranek, V. (2010). Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. *Food Chemistry* 121, 1–16.

Sun, Z., Liu, W., Zhang, J., Hou, Q., Kwok, L., Sun, T., and Zhang, H. (2014). Investigation of bacterial and fungal diversity in tarag using high-throughput sequencing. 97, 12.

Sun, Z., Harris, H.M.B., McCann, A., Guo, C., Argimón, S., Zhang, W., Yang, X., Jeffery, I.B., Cooney, J.C., Kagawa, T.F., et al. (2015). Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. *Nat Commun* 6, 8322.

Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A., and Pretorius, I.S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust J Grape Wine Res* 11, 139–173.

Swings, J., and De Ley, J. (1977). The biology of *Zymomonas*. *Bacteriological Reviews* 41, 1–46.

T

Takeoka, G.R., et al. (1990). Volatile constituents of apricot (*prunus-armeniaca*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1990. 38(2): p. 471-477.

Talarico, T.L., Casas, I.A., Chung, T.C., and Dobrogosz, W.J. (1988). Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32, 5.

Talarico, T.L., and Dobrogosz, W.J. (1989). Chemical Characterization of an Antimicrobial Substance Produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 6.

Tamang, J.P. et al. (2015). Naturally fermented ethnic soybean foods of India. *Journal of Ethnic Foods* 2, 8–17.

Tamang, J.P., Shin, D.-H., Jung, S.-J., and Chae, S.-W. (2016). Functional properties of microorganisms in fermented foods. *Front. Microbiol.* 7.

Tan, Y., and Siebert, K.J. (2004). Quantitative structure–activity relationship modeling of alcohol, ester, aldehyde, and ketone flavor thresholds in beer from molecular features. *J. Agric. Food Chem.* 52, 3057–3064.

Tanaka, O., Komatsu, T., Oshibe, A., Cai, Y., Miyazaki, S., and Nakanishi, K. (2009). Production of 3-Hydroxypropionaldehyde in Silage Inoculated with *Lactobacillus coryniformis* Plus Glycerol. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 73, 1494–1499.

Tančinová, D., Felšöciová, S., Rybárik, Ľ., Mašková, Z., and Cíсарová, M. (2015). Colonization of grapes berries and cider by potential producers of patulin. *Potr.* 9, 138–142.

Temudo, M.F., Muyzer, G., Kleerebezem, R., and van Loosdrecht, M.C.M. (2008). Diversity of microbial communities in open mixed culture fermentations: impact of the pH and carbon source. *Appl Microbiol Biotechnol* 80, 1121–1130.

Teoh, A.L., Heard, G., and Cox, J. (2004). Yeast ecology of Kombucha fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 95, 119–126.

Thokchom, S., and Joshi, S.R. (2012). Antibiotic resistance and probiotic properties of dominant lactic microflora from Tungrymbai, an ethnic fermented soybean food of India. *J Microbiol.* 50, 535–539.

Timmerman, H.M., Koning, C.J.M., Mulder, L., Rombouts, F.M., and Beynen, A.C. (2004). Monostrain, multistrain and multispecies probiotics—A comparison of functionality and efficacy. *International Journal of Food Microbiology* 96, 219–233.

Tobimatsu, T et al. (1995). Molecular cloning, sequencing, and expression of the genes encoding adenosylcobalamin-dependent diol dehydrase of *Klebsiella oxytoca* *J. Biol. Chem.*, 270, 7142–7148

Tobimatsu, T., Sakai, T., Hashida, Y., Mizoguchi, N., Miyoshi, S. & Toraya, T. (1997). Heterologous expression, purification, and properties of diol dehydratase, an adenosylcobalamin-dependent enzyme of *Klebsiella oxytoca*. *Arch. Biochem. Biophys.* 347, 132–140.

Torija, M. et al. (2003). Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology* 80, 47–53.

Tourliere S. et al. (1977). Commentaires sur la présence d'un certain nombre du composés accompagnat l'alcool dans les distillants spiritueux rectifiés et les eaux-de-vie Industries Alimentaires et Agricoles, 94 (1977), pp. 565–574

Trček, J., Mahnič, A., and Rupnik, M. (2016). Diversity of the microbiota involved in wine and organic apple cider submerged vinegar production as revealed by DHPLC analysis and next-generation sequencing. *International Journal of Food Microbiology* 223, 57–62.

U

Ugliano, M., Fedrizzi, B., Siebert, T., Travis, B., Magno, F., Versini, G., and Henschke, P.A. (2009). Effect of nitrogen supplementation and *Saccharomyces* species on hydrogen sulfide and other volatile sulfur compounds in shiraz fermentation and wine. *J. Agric. Food Chem.* 57, 4948–4955.

V

Valles, B., Bedrinana, R., Tascon, N., Simon, A., and Madrera, R. (2007). Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. *Food Microbiology* 24, 25–31.

Vallet, A., Lucas, P., Lonvaud-Funel, A., and de Revel, G. (2008). Pathways that produce volatile sulphur compounds from methionine in *Oenococcus oeni*. *J Appl Microbiol* 104, 1833–1840.

Voisinnet, E. et al. (1910). Formation d'acroleine dans la maladie de l'amertume des vins. Compt. rend. (Acad. Sci.), 150, 1614-1616.

W

Wang, C., García-Fernández, D., Mas, A., and Esteve-Zarzoso, B. (2015). Fungal diversity in grape must and wine fermentation assessed by massive sequencing, quantitative PCR and DGGE. *Frontiers in Microbiology* 6.

Warcollier, G. and Le Moal, A. (1932). The accidental presence of acrolein in the distilled liquor from cider. Compt. rend., 194, 1394- 1396.

Warcollier, G. and Le Moal, A. and Tavernier, J. (1934). The accidental presence of acrolein in cider, brandy and pear juice. Its formation from glycerol. Compt. rend., 198, 1546-1548.

Wei, J., Wang, S., Zhang, Y., Yuan, Y., and Yue, T. (2019). Characterization and screening of non-Saccharomyces yeasts used to produce fragrant cider. *LWT* 107, 191–198.

Wei, J., Zhang, Y., Qiu, Y., Guo, H., Ju, H., Wang, Y., Yuan, Y., and Yue, T. (2020). Chemical composition, sensorial properties, and aroma-active compounds of ciders fermented with *Hanseniaspora osmophila* and *Torulaspora quercuum* in co- and sequential fermentations. *Food Chemistry* 306, 125623.

Wei, J., Zhang, Y., Wang, Y., Ju, H., Niu, C., Song, Z., Yuan, Y., and Yue, T. (2020). Assessment of chemical composition and sensorial properties of ciders fermented with different non-Saccharomyces yeasts in pure and mixed fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 318, 108471.

Whiting, G.C., and Carr, J.G. (1959). Metabolism of cinnamic acid and hydroxy-cinnamic acids by *Lactobacillus pastorianus* var. *quinicus*. *Nature* 184, 1427–1428.

Whiting and Carr. (1957). Chlorogenic acid metabolism in cider fermentation. *Nature*, 4600, p. 1479

Whiting and Coggins (1969). Quinate Metabolism by Lactobacilli. *Biochemical Journal*, 115 (1969), pp. 60p-61p

Wicklund, T., Skottheim, E.R., and Remberg, S.F. (2020). Various factors affect product properties in apple cider production. *Int. J. Food Stud.* 9.

Woese, C. et al. (1998). The universal ancestor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 6854–6859.

X

Xie, G., Wang, L., Gao, Q., Yu, W., Hong, X., Zhao, L., and Zou, H. (2013). Microbial community structure in fermentation process of shaoxing rice wine by illumina-based

metagenomic sequencing: microbial community structure in Shaoxing rice wine fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93, 3121–3125.

Xu, Y., Zhao, G.A., and Wang, L.P. (2006). Controlled formation of volatile components in cider making using a combination of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora valbyensis* yeast species. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33, 192–196.

Y

Yang, L., Fan, W., and Xu, Y. (2020). Metaproteomics insights into traditional fermented foods and beverages. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 19, 2506–2529.

Yashiro, E., Spear, R.N., and McManus, P.S. (2011). Culture-dependent and culture-independent assessment of bacteria in the apple phyllosphere. *Journal of Applied Microbiology* 110, 1284–1296.

Ye, N.-F., Lü, F., Shao, L.-M., Godon, J.-J., and He, P.-J. (2007). Bacterial community dynamics and product distribution during pH-adjusted fermentation of vegetable wastes. *Journal of Applied Microbiology* 103, 1055–1065.

Young, T.W., and Yagiu, M. (1978). A comparison of the killer character in different yeasts and its classification. *Antonie van Leeuwenhoek* 44, 59–77.

Yun, J., Zhao, F., Zhang, W., Yan, H., Zhao, F., and Ai, D. (2019). Monitoring the microbial community succession and diversity of Liangzhou fumigated vinegar during solid-state fermentation with next-generation sequencing. *Annals of Microbiology*.

Z

Zago, M., Bonvini, B., Carminati, D., and Giraffa, G. (2009). Detection and quantification of *Enterococcus gilvus* in cheese by real-time PCR. *Systematic and Applied Microbiology* 8.

Zarraonaindia, I., Owens, S.M., Weisenhorn, P., West, K., Hampton-Marcell, J., Lax, S., Bokulich, N.A., Mills, D.A., Martin, G., Taghavi, S., et al. (2015). The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota. *MBio* 6, e02527-14.

Etude des écosystèmes microbiens cidricoles : quel impact sur la qualité organoleptique ?

Résumé. Le calvados est une eau-de-vie obtenue par distillation du cidre. Le cidre de distillation résulte d'une fermentation naturelle spontanée non maîtrisée, qui permet toutes les interactions possibles entre les différentes communautés microbiennes. En fin de fermentation alcoolique, le glycérol produit peut être dégradé et converti en 3-hydroxypropionaldéhyde (3-HPA) par *Lactobacillus collinoides* via l'enzyme glycérol déshydratase codée par l'opéron *pdu*. Lors de la distillation, la déshydratation du 3-HPA en acroléine entraîne des désordres organoleptiques connus sous le nom de piqure acroléique en développant un goût d'amertume dans les calvados. Ces travaux de thèse ont eu pour premier objectif d'apporter une réelle nouveauté dans l'étude de la diversité de dix cidres de distillation normands lors de la fermentation par une approche de métagénomique et d'établir des liens entre la composition microbienne et la qualité aromatique. Cette approche a permis de mettre en évidence plus de 40 genres bactériens et fongiques et des différences significatives ont été constatées au sein de ces populations entre les cidres des différents producteurs au cours du processus de fermentation, suggérant que les pratiques d'élaboration mènent à une typicité du cidre et donc à celle du calvados. L'étude de la composition des communautés microbiennes en lien avec la composition aromatique des cidres de distillation et celle des micro-distillats a été effectuée. Trois groupes de dynamiques et compositions microbiennes, directement liées aux producteurs, émergent conduisant à des compositions aromatiques différentes. L'analyse comparative de huit génomes de souches de *Lactobacillus collinoides* isolées à partir de cidres de distillation portant sur les métabolismes associés à la fermentation et sur la capacité des souches à métaboliser le glycérol a été effectuée. Deux types d'opéron *pdu* se profilent et cette variabilité génétique observée entre les souches de *L. collinoides* suggère des capacités différentes de dégradation du glycérol. Un plan expérimental (D-optimal) faisant varier 6 facteurs (glucose, fructose, azote, éthanol, acide malique, pH) a été élaboré pour étudier le métabolisme du glycérol chez ces souches. Trois profils génétiques et métaboliques ont pu être mis en évidence. Les souches de *L. collinoides* possédant l'opéron de type I sont toujours capables de dégrader le glycérol, contrairement à celles porteuses de l'opéron de type II. Ces travaux ouvrent des perspectives intéressantes quant à la présence et la physiologie de *L. collinoides* lors de l'élaboration du cidre et son implication dans la piqure acroléique.

Mots clés : Calvados, cidres de distillation, fermentation, flore lactique, levures, métagénomique, interactions, arômes, *L. collinoides*, glycérol, piqure acroléique.

Study of cider microbial ecosystems: what potential for organoleptic improvement?

Abstract. Calvados is a Normandy brandy made by the distillation of cider. Ciders destined for distillation result from spontaneous fermentation without any human intervention, leading to various interactions between the different microbial communities. At the end of alcoholic fermentation, glycerol produced can be degraded and converted to 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA) by *Lactobacillus collinoides* via the glycerol dehydratase enzyme encoded by the *pdu* operon. During distillation, dehydration of 3-HPA to acrolein leads to organoleptic disorders, developing a bitterness taste in calvados known as "piqure acroléique". The first objective of this thesis was to unveil the diversity of ten ciders for distillation during fermentation using a high throughput sequencing (16S, ITS1) approach and to establish links between microbial composition and aromatic quality. This approach allowed us to identify more than 40 bacterial and fungal and significant differences were found among fungal and bacterial populations between producers during the fermentation process, suggesting that the practices lead to the typicity of cider, and therefore to the typicity of calvados. The study of the microbial composition was correlated with the aromatic composition of ciders for distillation during the fermentation process and of the micro-distillates. Three groups of microbial dynamics and compositions, directly related to the producers, were observed leading to different aromatic compositions. A comparative analysis of eight genomes of *Lactobacillus collinoides* strains isolated from the ciders according to the different metabolisms associated with fermentation as well as on the ability of the strains to metabolize glycerol was performed. Two types of operon *pdu* were highlighted and this genetic variability between *L. collinoides* strains suggests different abilities for glycerol degradation. An experimental design (D-optimal) by varying 6 factors (glucose, fructose, nitrogen, ethanol, malic acid, pH) was developed to study the metabolism of glycerol in these strains. 3 genetic and metabolic profiles were identified. *L. collinoides* strains with operon type I are always able to degrade glycerol, contrarily to those harbouring the operon of type II. This work opens up interesting perspectives regarding the presence and physiology of *L. collinoides* during the development of cider and its involvement in the "piqure acroléique".

Keywords : Calvados, cider for distillation, fermentation, lactic acid bacteria, yeasts, metagenomic, interactions, aromas, *L. collinoides*, glycerol, acrolein.