

# EVOLUTIONS QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES FLORES MICROBIENNES DE MOÛTS DE POMMES A CIDRE AU COURS DE LA FERMENTATION : RELATIONS AVEC LE TERROIR ET LA COMPOSITION PHYSICO-CHIMIQUE DES FRUITS.

A. Jacquet\*, J.M. Laplace\*\*, I. Travers\*, Y. Auffray\*\*, J.P. Simon\*\*\*

\* : UA INRA 950 de physiologie et Biochimie Végétales. IRBA. Université de Caen, 14032 Caen cedex France.

\*\* : Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement, IRBA, Université de Caen 14032 Caen cedex France.

\*\*\* : ARAC, Lycée agricole du Robillard 14170 Lieury France.

## Introduction

En France, la filière A.O.C. cidricole emploie de plus en plus de levures initialement sélectionnées pour les fermentations des vins. Le risque d'une uniformisation organoleptique ou d'un marquage fort des produits, souvent évoqué en œnologie (Bourguignon, 1992) risque de se produire au détriment de la nécessaire originalité des cidres d'appellation. La connaissance de la microflore indigène associée aux terroirs, en vue de son utilisation exclusive dans les processus fermentaires, est donc un enjeu important (Frezier et Dubourdieu, 1992 ; Legras et al, 1996). Afin d'étudier la composition des pommes et suivre son incidence, aux points de vue qualitatif et quantitatif, sur la flore microbienne des moûts obtenus à partir de ces fruits, trois vergers représentatifs des principaux terroirs de l'AOC Pays d'Auge (Normandie) ont été sélectionnés.

## Matériels et méthodes

### *Parcelles expérimentales*

Les parcelles suivies se situent sur les formations pédologiques développées sur les limons du quaternaire en situation de plateau (LI), les formations résiduelles d'argiles à silex (AS) du tertiaire en situation de chanfrein de plateau et l'argile verte du cénomanien en situation de pente (AV). Ces trois terroirs représentent environ 50 % des surfaces de la zone AOC pays d'Auge (Normandie, France). La variété, Binet rouge, et le mode de conduite, haute-tige, sont identiques pour chacune des parcelles et les autres conditions de production sont analogues.

### *Dynamique de chute et récolte*

Chaque semaine de manière à établir les cinétiques de chute, les fruits au sol sont ramassés et pesés puis stockés à proximité des arbres. La récolte est effectuée au stade d'environ 90 % de chute.

### *Obtention des moûts*

20 kg de pommes, triées (élimination des fruits pourris) et sommairement lavées sont râpés grossièrement. Le moût est obtenu par pressurage de la pulpe dans une presse à paquets. Entre chaque lot, l'ensemble du matériel est lavé à l'aide d'un antiseptique puis abondamment rincé à l'eau claire. Les moûts sont stockés à 10°C dans des bombonnes de 10 litres sous gaz inerte (CO<sub>2</sub>, 20 mbar). Aucune défécation ni soutirage ne sont effectués durant la fermentation. L'ensemble de cette procédure a été réalisée deux fois pour chaque parcelle, les résultats présentés sont la moyenne des deux lots.

### *Milieux et conditions de culture*

Les milieux et les conditions de culture utilisés ont été précédemment décrits par Laplace et al.

(1998).

### *Identification des microorganismes*

Les levures ont été identifiées à l'aide de galeries API20 (API-system, Biomérieux, France) et de tests complémentaires (sporulation, formation de pseudo-mycélium). L'identification des bactéries lactiques a été réalisée en utilisant des galeries API50CH.

### *Prélèvement des échantillons*

Au cours de la fermentation les échantillons sont prélevés de manière aseptique en fiole stérile après purge de quelques millilitres de moût. Le robinet de prélèvement se situe à 10 cm du fond des bombonnes.

### *Méthodes analytiques*

Les sucres (glucose, fructose, saccharose) ont été dosés dans les moûts par CLHP selon, le protocole décrit par Morvan-Bertrand et al. (1999), en utilisant le mannitol comme étalon interne ou par réfractométrie sur jus lors de la récolte. L'acide malique a été dosé par kit enzymatique (Roche Diagnostic). La régression de l'amidon a été notée visuellement dans une échelle de 1 à 10 (Lau, 1988). La fermeté de l'épiderme et du parenchyme est mesurée à l'aide d'un duromètre shore A (Mytutoyo).

## **Résultats**

### *Dynamiques de chutes des fruits et productivité*

Le début de la chute des fruits a été observé début septembre (figure 1). Celle-ci a été progressive jusqu'à la mi-octobre où une accélération est ensuite constatée. L'influence du terroir sur cette dynamique se manifeste par une plus grande précocité sur argile verte (figure 1) et une tardiveté marquée pour les pommiers sur limons. La productivité moyenne des pommiers, exprimée en kg de pommes par mètre cube de feuillage, est inférieure de 30 % sur les sols de limons.

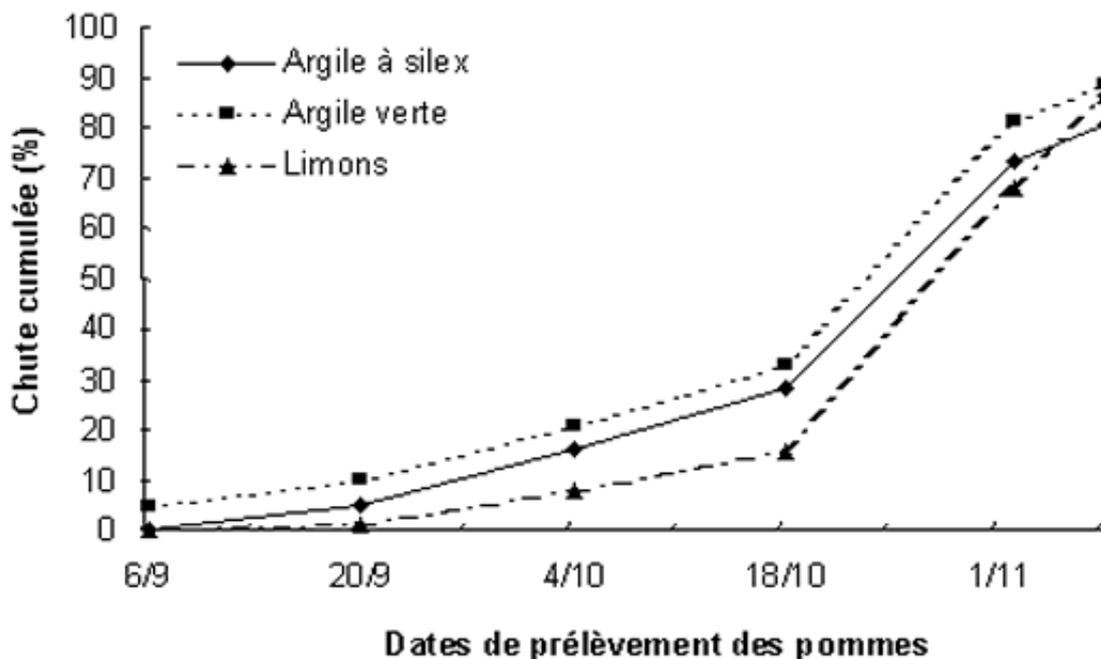


Figure 1 : Dynamiques de chute des pommes selon le terroir de production en fonction du temps.

#### *Caractéristique des pommes à la récolte*

Les teneurs en sucres des jus montrent un effet du terroir qui se manifeste globalement par des teneurs plus faibles dans les jus des pommes obtenues sur limons comparativement aux deux autres formations pédologiques (tableau I). L'amidon accumulé au cours de la croissance des fruits est presque totalement hydrolysé au cours de la maturation, passant de 250 mg/g MS (6 septembre) à moins de 18 mg/g de MS à la récolte (8 novembre) (tableau I). A ce stade, la maturité physiologique la plus avancée s'observe sur limons avec la plus faible teneur en amidon (6.5mg/g MS) associée à l'indice régression le plus élevé (tableau I). Les pommes obtenues sur argile verte présentent les teneurs en matière sèche les plus élevées et les fermetés (épiderme et parenchyme) les plus faibles.

#### *Caractéristique et évolution des moûts*

Les teneurs initiales en sucres des moûts et leur évolution en fonction du temps sont représentées sur la figure 2. Quels que soient les moûts les teneurs initiales en sucres totaux sont proches et les profils de consommation sont relativement homogène. Sur le plan quantitatif le fructose est le sucre le plus abondant, suivi du saccharose puis du glucose dont les teneurs initiales présentent les plus grandes disparités en fonction des terroirs. Pour le saccharose et le fructose les vitesses maximales de consommation, calculées entre J0 et J32, sont observées sur le moût AV, tandis que le glucose est le plus rapidement transformé dans le moût LI. Les concentrations en acide L-malique, comprise à J0 entre 4.4 et 5.4g/l, dans les moûts AV et AS respectivement, décroissent rapidement jusqu'à J32, puis restent relativement stables (figure 3).

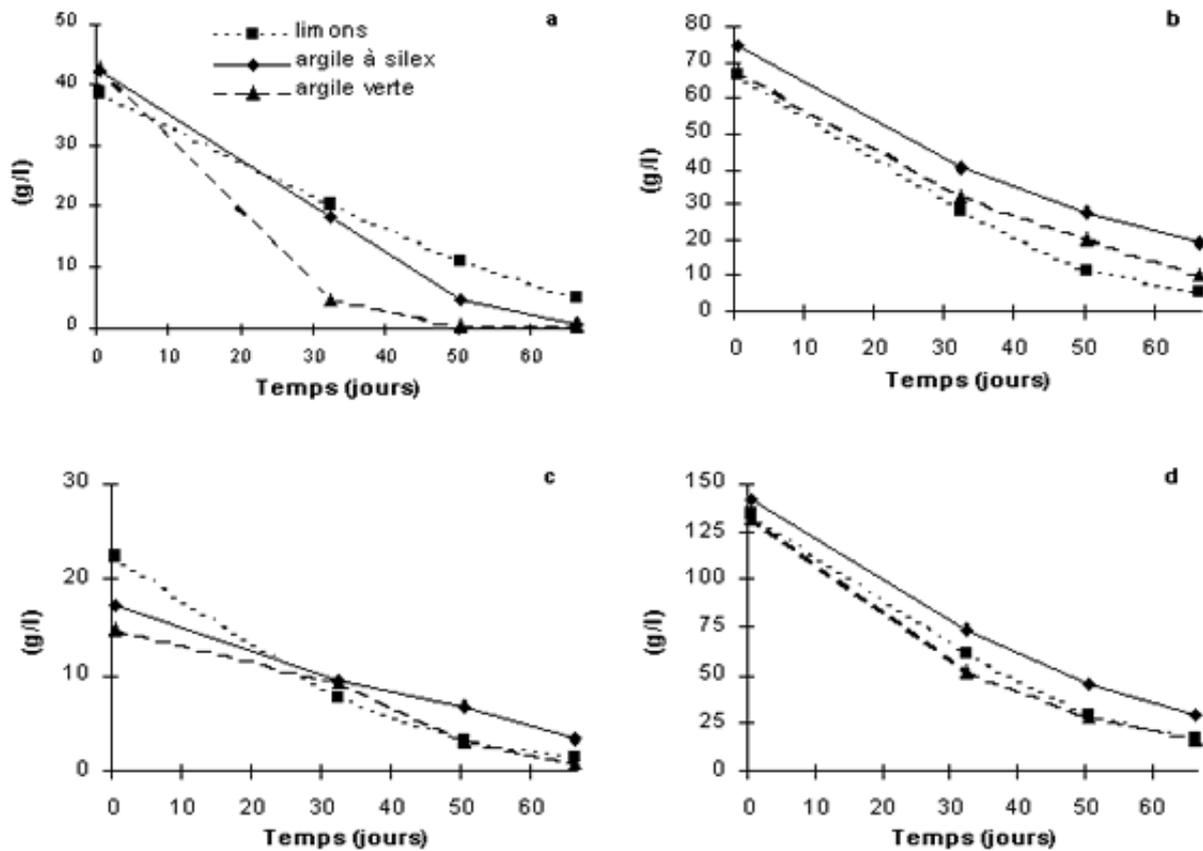


Figure 2 : Evolution des teneurs en sucres dans les différents moûts au cours du temps. a : saccharose ; b : fructose ; c : glucose ; d : sucres totaux

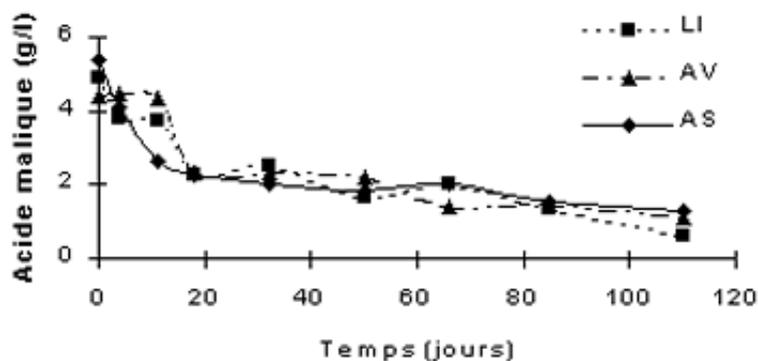


Figure 3 : Evolution de la teneur des moûts en acide malique au cours du temps

### *Développement des flores levuriennes et bactériennes*

L'évolution quantitative des populations microbiennes en fonction du temps dans les différents moûts est représentée sur la figure 4. La population de levures présente un profil d'évolution similaire dans les trois moûts. Ainsi durant les 20 premiers jours le nombre de levures demeure relativement stable

puis on observe une multiplication rapide des levures dont le taux maximal est atteint aux environs du 40<sup>ème</sup> jour. Le moût AV présentant une teneur en levures nettement supérieure à celle des moûts AS et LI. A partir du 60<sup>ème</sup> jour, quels que soient les lots, les teneurs en levures retrouvent des niveaux comparables à ceux observés immédiatement après le pressage. Cette phase de déclin de la population levurienne n'est pas corrélée à un développement du nombre de bactéries lactiques dans le moût LI (figure 4). En revanche dans les moûts AS et AV, on observe une augmentation du nombre de bactéries lactiques à partir du 60<sup>ème</sup> jour. Cela est particulièrement vrai dans le moût AS où le nombre de bactéries lactiques atteint  $10^5$  CFU/ml. Sur le plan qualitatif (tableau II), on constate que dans les trois moûts, les levures *Rhodotorula rubra*, *Kloeckera apiculata*, sont progressivement remplacées par *Saccharomyces cerevisiae* qui est la seule souche de levure isolée à partir du 60<sup>ème</sup> jour. Concernant les bactéries lactiques, *Oenococcus oeni* est présente dans les trois moûts, quelle que soit la période de prélèvement. En revanche *Lactobacillus acidophilus* n'est plus isolée des moûts après le 50<sup>ème</sup> jour (tableau II).

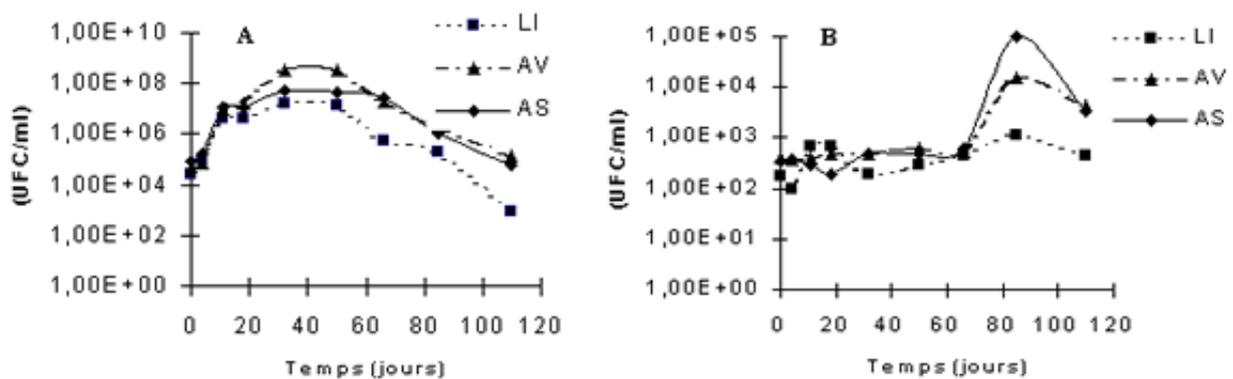


Figure 4 : Evolution quantitative des populations de levures (A) et de bactéries lactiques (B) au cours du temps dans les différents moûts.

## Discussion

Cette étude a montré une incidence du terroir sur la précocité des fruits et sur leur teneur en sucres. La tardiveté des pommes obtenues sur limons est traduite par une plus grande fermeté des tissus et un retard de chute. Ces pommes se caractérisent également par un potentiel en sucres fermentescibles plus faible que celui des fruits obtenus sur les deux autres terroirs. Ces différences pourraient en partie être attribuées à la vigueur nettement plus importante des arbres sur limons. Le lien inversement proportionnel entre vigueur et précocité/qualité ayant déjà été rapporté par Gautier (1993). Les disparités dans les potentiels en sucres fermentescibles (amidon et sucres solubles) observées dans les pommes dix jours avant brassage se répercutent sur les teneurs en sucres solubles des moûts. Quelle que soit l'origine des moûts, les mêmes genres de levures et de bactéries lactiques ont été isolés, à l'exception cependant de la levure *Candida famata* présente exclusivement dans le moût LI. L'homogénéité de la flore lactique résulte de son absence sur les pommes. Les bactéries lactiques sont donc apportées dans le moût au moment du pressage par le matériel et l'environnement de la cave. Des analyses qualitatives, faites préalablement à la récolte sur fruits cueillis et chutés, ont montré que seules des levures étaient présentes sur les pommes. Ces résultats sont corroborés par des observations antérieures (Laplace et al., 1998). Si, au moment du pressage peu de différences - tant qualitatives que quantitatives - existent en fonction du terroir, en revanche au cours de la fermentation, des disparités quantitatives importantes apparaissent. Les levures se développent préférentiellement dans le moût AV, tandis que la croissance des bactéries lactiques est favorisée dans le moût AS. Ces dynamiques d'évolution des flores, différentes en fonction de l'origine des moûts, sont à mettre en relation avec les

compositions de ces moûts. Ainsi, à partir d'une même variété de pommes à cidre cultivée de manière analogue mais sur des terroirs différents, les produits finis auront des qualités organoleptiques distinctes. Ces dernières sont en effet dépendantes du développement des microorganismes fermentaires.

## Remerciements

Les auteurs souhaitent remercier Jean-Christophe Dechatre pour son assistance technique. Ce travail a fait l'objet d'un soutien financier de la part du conseil régional de Basse-Normandie.

Tableau I : Caractéristiques physico-chimiques des pommes à la récolte

Terroirs	Poids des pommes (g)	fermeté épiderme (UA*)	Fermeté du parenchyme (UA)	Indice de régression de l'amidon	Teneur en amidon (mg /g MS)	Teneur en matière sèche (%)	Indice réfractométrique (° Brix)	pH
Argile à silex	51,7	40	9	9	17,4	17,9	15,7	4,14
Argile verte	45,2	38	6	9	14,8	18,9	15,6	4,00
Limons	33,9	43	10	9	6,9	17,3	14,5	3,93

UA : unité arbitraire

Tableau II : Evolution qualitative des populations de levures et de bactéries dans les moûts LI, AS et AV.

Périodes	Moût LI		Moût AS		Moût AV	
	Levures	Bactéries	Levures	Bactéries	Levures	Bactéries
J0 à J18	<i>Rhodotorula rubra</i> <i>Kloeckera apiculata</i> <i>Candida famata</i>	<i>Oenococcus oeni</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Rhodotorula rubra</i> <i>Kloeckera apiculata</i>	<i>Oenococcus oeni</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Rhodotorula rubra</i> <i>Kloeckera apiculata</i>	<i>Oenococcus oeni</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i>
J18 à J 50	<i>Rhodotorula rubra</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Oenococcus oeni</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Rhodotorula rubra</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Oenococcus oeni</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Rhodotorula rubra</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Oenococcus oeni</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i>
J50 à J85	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Oenococcus oeni</i> <i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Oenococcus oeni</i> <i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Oenococcus oeni</i> <i>Lactobacillus brevis</i>

## Références bibliographiques

Bourguignon C., 1992. Vers une approche microbiologique du terroir et de la typicité. Rev. Oenol., 64, 36-36.

Frezier V., Dubourdieu D., 1992. Ecology of yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* during

spontaneous fermentation in a Bordeaux Winery. *Am. J. Enol. Vitic.*, 43, 375-380.

Gautier M., 1993. L'arbre fruitier. La culture fruitière, vol 1, Ed Lavoisier Tec et Doc, agriculture d'aujourd'hui, pp436-437.

Laplace J.M., Apéry S., Frère J., Auffray Y., 1998. Incidence of indigenous microbial flora from utensils and surroundings air in traditional french cider making. *J. Inst. Brew.* 104, 71-74.

Lau O.L., 1988. harvest indices for apple and pears. *Horticultural reviews*, 13, 407-432.

Legras J-L., Meyer E., Legname E., Schaeffer A., 1996. Etude de la flore levurienne de différents terroirs alsaciens. In actes du premier colloque international sur les terroirs viticoles, 17-18 juillet 1996, Angers, France, 469-473.

Morvan-Bertrand A., Boucaud J., Prud'homme M.P., 1999. Influence of initial levels of carbohydrates, fructans and soluble proteins on regrowth of *Lolium perenne* L.cv. Bravo following defoliation. *J Exp Botany*, 50 (341), 1817-1826.