
Valorisation du marc de pomme en vinaigre

Auteur : Agag, Nawal

Promoteur(s) : Sindic, Marianne

Faculté : Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

Diplôme : Master en bioingénieur : chimie et bioindustries, à finalité spécialisée

Année académique : 2022-2023

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/18168>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.



Valorisation du marc de pomme en vinaigre

Nawal AGAG

Travail de fin d'études présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master Bioingénieur en
Chimie et Bio-Industries

Année académique 2022-2023

Promoteurs : Prof. Marianne Sindic, Prof. Ingrid Collombel

Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique de Gembloux Agro-Bio Tech.

Le présent document n'engage que son auteur



Valorisation du marc de pomme en vinaigre

Nawal AGAG

Travail de fin d'études présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master Bioingénieur en
Chimie et Bio-Industries

Année académique 2022-2023

Promoteurs : Prof. Marianne Sindic, Prof. Ingrid Collombel

i. Remerciements

Ce travail a été réalisé au Cirad (centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement) de Montpellier au sein du bâtiment 16 et de l'Unité Mixte de Recherche (UMR qualisud). Le projet AWP a été soutenu par l'institut Agro Montpellier.

Je tenais particulièrement à remercier Mme Ingrid Collombel de m'avoir donné la chance de pouvoir réaliser mon mémoire au sein du Cirad. Malgré les erreurs et les difficultés que j'ai pu rencontrer, elle a toujours su m'aider et être disponible à tout moment. Passionnée par son travail, elle a su me transmettre cela et j'en suis infiniment reconnaissante.

Je tiens à remercier Mme Marianne Sindic pour son aide lorsque j'avais des questions et son implication dans mon travail en demandant après mon travail et ma personne.

Je remercie également les membres de l'équipe de travail : Ingrid Collombel, Joël Grabulos, Jean-Christophe Meile et Vincent Chochois. Ils ont toujours été à l'écoute lorsque je rencontrais des petits soucis. Ils sont toujours restés souriants et bienveillants à mon égard.

Je remercie toutes les personnes qui m'ont aidées à réaliser mes manipulations : Léa Ollier et Romain Domingo qui m'ont aidée dans la joie et la bonne humeur, Marc Lebrun qui n'a jamais hésité à prendre énormément de temps pour m'expliquer les manipulations et les résultats, Gilles Morel qui trouvait toujours du temps pour m'aider à réaliser mes manipulations.

Un grand merci à l'équipe du 1^e étage, Kevin Bethune, Laëtitia Gardès et Isabelle Metayer qui ont toujours été présents pour moi et qui n'ont jamais hésité à répondre à chacune de mes requêtes. Je remercie les filles de l'Atelier du fruit qui ont toujours été sympathiques et adorables avec moi.

Je remercie Samira Sahli de m'avoir accompagnée lors de la 2^e partie de mes manipulations. En plus d'avoir été un binôme de choc, c'est devenu une bonne amie. Je la remercie pour sa patience, sa bienveillance et son dévouement.

Je remercie l'ensemble du personnel ayant travaillé avec moi au Cirad, elles ont contribué à mon travail de loin ou de près en partageant de la bonne humeur, en m'aidant et en faisant du Cirad, un environnement de travail sain.

Enfin, je tiens à remercier ma famille qui a toujours été présente. Je les remercie de m'avoir accompagnée jusqu'au bout, particulièrement ma maman Ghalia Mezine qui a toujours pris en compte mon hypersensibilité. Elle a toujours eu les bons mots quand j'étais découragée et au plus bas, elle m'a toujours relevée et je lui dois toutes mes réussites. Aucun mot ne pourrait décrire ma gratitude envers elle. Je remercie mon beau-père Daniel Lambert ainsi que ma sœur Lynda Agag pour toutes les choses innumérables qu'ils ont pu faire pour moi lors de mes années d'étude.

ii. SYNOPSIS-FRANÇAIS

Dans un contexte de perte post-transformation, le marc de pomme (MP) de la variété *Golden delicious* récupéré lors de l'extraction de jus peut être valorisé en vinaigre. Le but étant de produire du vinaigre à partir de ce sous-produit via un processus de double fermentation (alcoolique et acétique).

Le suivi de la fermentation s'est focalisé sur deux aspects différents : l'aspect physico-chimique et microbiologique. Du marc et du jus de pomme ont été utilisés pour l'élaboration de vinaigre de manière spontanée et contrôlée (ajout de sucres et d'un inoculum). Durant 21 à 45 jours pour certaines modalités, des prélèvements ont été réalisés afin de suivre l'évolution des sucres et acides organiques, des pectines et de la flore microbienne d'intérêt (levures, bactéries acétiques et lactiques). Ces souches ont, ensuite, été isolées et identifiées.

A l'issue de ce travail, du vinaigre de pomme (5g/L d'acide acétique minimal) n'a pas été obtenu mais plusieurs pistes mènent à penser que c'est sur la bonne voie. Les résultats ont montré des concentrations plus hautes lorsqu'un inoculum de levures et de bactéries acétiques ainsi que du sucres sont ajoutés.

Les souches endogènes du MP avec un potentiel de production optimale ont été identifiées et caractérisées. Celles ayant le potentiel de production d'éthanol le plus haut peuvent être utilisées comme starters lors de prochaines fermentations.

Mots clés : fermentation spontanée, pomme, jus de pomme, marc de pomme, cidre de pomme, vinaigre de pomme, *Golden delicious*

iii. ABSTRACT – ENGLISH

In a context of post-processing waste, the apple pomace (AP) of the Golden Delicious variety recovered during juice extraction can be recycled as vinegar. The aim is to produce vinegar from this by-product via a double fermentation process (alcoholic and acetic).

Fermentation monitoring focused on two different aspects: physico-chemical and microbiological. Apple pomace and juice were used to produce vinegar, both in a spontaneous and controlled manner (addition of sugars and inoculum). Samples were analyzed for 21 to 45 days to monitor the evolution of sugars and organic acids, pectins and the microbial populations of interest (yeasts, acetic and lactic bacteria). These strains were then isolated and identified.

At the end of this work, apple vinegar (5g/L minimum of acetic acid) was not obtained, but several leads suggest that this is on the right direction. Results showed higher concentrations when an inoculum of yeast and acetic bacteria plus sugars were added.

Endogenous MP strains with optimal production potential were identified and characterized. Those with the highest ethanol production potential can be used as starters for future fermentations.

Keywords: spontaneous fermentation, apple, apple juice, apple pomace, apple cider, apple vinegar, Golden delicious

iv. TABLES DES MATIERES

i. Remerciements	VI
ii. SYNOPSIS-FRANÇAIS	VII
iii. ABSTRACT – ENGLISH	VIII
iv. TABLES DES MATIERES	IX
v. LISTE DES FIGURES	XI
i. LISTE DES TABLES	XII
i. LISTE DES EQUATIONS	XIII
1. Introduction générale	1
1.1. Contexte	1
1.2. Objectifs	2
1.3. Stratégie expérimentale	2
2. Etat de l'art	4
2.1. Composition biochimique de la pomme et du marc de pomme	7
2.1.1. Glucides et fibres	7
2.1.2. Protéines et lipides	8
2.1.3. Acides organiques	8
2.1.4. Minéraux et oligo-éléments	8
2.1.5. Vitamines et provitamines	8
2.1.6. Profil aromatique	9
2.2. Microbiote de la pomme	9
2.3. Composition biochimique du jus de pomme	10
2.3.1. Glucides et fibres	10
2.3.2. Polyphénols et composés volatils.....	10
2.3.3. Éléments-traces.....	11
2.4. Microbiote du jus	11
2.5. Composition biochimique du cidre	11
2.5.1. Glucides et fibres	12
2.5.2. Acides organiques	12
2.5.3. Éléments-traces.....	12
2.5.4. Profil aromatique	12
2.6. Microbiote du cidre	13
2.7. Composition biochimique du vinaigre de pomme	14
2.7.1. Glucides et minéraux.....	14
2.7.2. Acides organiques	14
2.7.3. Profil aromatique	14
2.8. Microbiote du vinaigre de pomme	15
3. Matériel et méthode	16
3.1. Matériel végétal	16

3.1.1.	Les pommes.....	16
3.1.2.	Extraction du jus.....	16
3.1.3.	La matière sèche	17
3.1.4.	Préparation des "vinaigres".....	17
3.2.	Analyses	19
3.2.1.	Microbiologie	19
3.2.2.	Screening des levures.....	20
3.2.3.	Biologie moléculaire.....	21
3.2.4.	Biochimie.....	23
3.2.5.	Analyse statistique	25
4.	Résultats et discussion	26
4.1.	Caractérisation de la matière première.....	26
4.2.	Evolution de la flore microbienne	27
	Dénombrement	27
	Les levures	29
	Les bactéries	32
4.3.	Biochimie.....	33
	Dosage de la patuline	33
	Dosage des pectines	33
	Profil aromatique.....	33
	Dosage des glucides et des acides organiques	34
5.	Conclusion et perspectives	38
6.	Contribution personnelle de l'étudiante	40
7.	Bibliographie	41
8.	Annexe	46

v. LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Stratégie expérimentale mise en place dans le cadre de cette étude	4
Figure 2 : Diagramme circulaire de la production mondiale de pommes en 2017 selon la FAO	4
Figure 3 : Diagramme circulaire du marché du vinaigre en 2021	5
Figure 4 : Diagramme de fabrication du vinaigre de pomme	6
Figure 5 : pommes Golden Delicious utilisées lors de cette étude ; à gauche pour la fermentation 1 (six mois post-récolte) et à droite pour la fermentation 2 (neuf mois post-récolte).....	17
Figure 6 : appareils utilisés pour le pressage du jus, à gauche le broyeur et à droite la presse	17
Figure 7 : illustration des cinq modalités de préparation de vinaigres en fin de fermentation 1 (jour 21)	18
Figure 8 : illustration des quatre modalités de préparation de vinaigres en début de fermentation (jour 0)	19
Figure 9 : Illustration des précultures effectuées et des deux préparations de vinaigres en début de fermentation (jour 0).....	20
Figure 10 : appareil de dosage des pectines "SKALAR"	24
Figure 11 : proportion des espèces de levures dans les modalités 1 à 5 en milieu (jour 10) et fin de fermentation (jour 21)	31
Figure 12 : courbe de croissance des différentes espèces de levures au selon la densité optique.....	32
Figure 13 : teneur en acide galacturonique dans les marcs récupérés à la fin de fermentation 1	34
Figure 14 : concentration en acétoïne dans les modalités 3 et 5	35
Figure 15 : évolution des sucres et des acides organiques des modalités de la fermentation 1	36
Figure 16 : évolution des sucres et des acides organiques des modalités de la fermentation 2	37
Figure 17 : évolution des sucres et des acides organiques des modalités de la fermentation 3	38

i. LISTE DES TABLES

Tableau 1 : mélange réactionnel introduit dans les plaques PCR.....	22
Tableau 2 : caractérisation de la matière première utilisée en fermentation 1 (F1) et 2 (F2) ; / : non analysé ou aberrants.....	27
Tableau 3 : Dénombrement en log UFC/ml pour les préparations de vinaigre des modalités 1 à 5.....	28
Tableau 4 : dénombrement en log UFC/ml pour les préparations de vinaigre des modalités 6 à 9.....	29
Tableau 5 : levures isolées en début (jour 0), milieu (jour 10) et fin de fermentation 1 (jour 21).....	30
Tableau 6 : bactéries lactiques et acétiques majoritaires isolées lors de la fermentation 1 ..	33
Tableau 7 : concentration en acide acétique attendue et obtenue en fin de fermentation dans chacune des modalités 1 à 5.....	36

i. LISTE DES EQUATIONS

Équation 1 : la fermentation alcoolique réalisée par les levures.....	6
Équation 2 : la fermentation acétique réalisée par les bactéries acétiques.	6
Équation 3 : corrélation entre la concentration et le volume.....	21

1. Introduction générale

1.1. Contexte

La pomme (*Malus domestica Borkh.*), de la famille des *Rosaceae*, est l'un des fruits les plus produits et consommés dans le monde après les agrumes, le raisin et la banane. Selon la FAO (Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture), 64 millions de tonnes de pommes sont récoltées annuellement dans le monde, dont 2 millions en France. Dans l'Union Européenne 15kg de pommes et 8kg de pommes transformées sont consommées annuellement par habitant.

Comestible dans son entièreté (sauf les graines) tout au long de la journée, ce fruit est apprécié pour ses qualités organoleptiques, nutritionnelles, économiques et culturelles. La pomme est également prisée pour sa disponibilité toute l'année sous différentes formes (fruits frais et secs, jus, cidre...), pour ses avantages sur la santé (impact positif sur le métabolisme des lipides, sur la fonction vasculaire, sur l'inflammation et la gestion du poids)¹. La pomme est une source d'antioxydants et de fibres réduisant les risques de maladies cardiovasculaires, de cancer et d'asthme².

Les pommes sont principalement transformées en jus (60%), cidre, confiture, compote, thé, vin ou en pommes sèches². Le marc de pomme (MP) est le sous-produit de la production de jus. Composé de pulpe, peau, tige et pépins, il représente le résidu solide après l'extraction du jus (soit 25% du poids de la pomme). Grâce aux nombreux ingrédients nutritifs restants (les phénols, fibres alimentaires, vitamines, minéraux...), le MP présente également de nombreux bienfaits pour la santé tels que des propriétés antioxydantes, cardioprotectrices, antidiabétiques, antilipémiques et améliorent la fonction du tractus gastro-intestinal (GIT)³. La peau contiendrait encore plus de composés bénéfiques pour la santé⁴. Le MP peut être séché et broyé afin d'être valorisé dans d'autres secteurs tels que la bioraffinerie ou l'alimentation animale. Cependant, pour cause de présence de cellulose, il reste difficile à digérer par les animaux⁵.

Dans ce contexte de perte post-transformation, le marc de pomme peut être valorisé en vinaigre. Le processus d'obtention du vinaigre est la double fermentation (alcoolique puis acétique) par des levures et des bactéries acétiques. La fermentation est un processus naturel utilisé depuis des milliers d'années, bien avant la réelle compréhension des réactions biochimiques mises en jeu. Un tiers du régime alimentaire des pays du sud est obtenu par fermentation.

La consommation du vinaigre aurait un impact positif sur la santé en réduisant le stress oxydatif et le risque d'obésité, en permettant le contrôle du taux de cholestérol et du diabète et en ayant une activité antifongique. Cela permettrait également la régulation de la glycémie et de la pression sanguine ainsi qu'une bonne digestion et absorption du calcium. Plus spécifiquement, le vinaigre de pomme favoriserait la perte de poids avec ses propriétés laxatives, l'abaissement de la glycémie chez les personnes atteintes de diabète de type 2 ainsi que la réduction de risques de maladies cardiovasculaires⁶.

1.2. Objectifs

Afin de répondre à un défi environnemental et économique, diverses techniques d'analyses ont été testées au cours de cette étude dans le but d'obtenir du vinaigre de pommes de qualité à partir de marc de pommes *Golden delicious*.

Le vinaigre de pomme est obtenu à la suite d'une double fermentation, alcoolique et acétique⁷. Selon la législation, la dénomination "vinaigre" est réservée au « produit obtenu exclusivement par le procédé biologique de la double fermentation, alcoolique et acétique, de denrées et boissons d'origine agricole ou de leurs dilutions aqueuses ». La teneur maximale d'alcool est de 0,5% et la teneur minimale d'acide acétique est de 5% (Décret n° 88-1207 du 30 décembre 1988 relatif aux vinaigres).

L'objectif principal de ce travail est d'obtenir du vinaigre à partir du marc de pomme qui répond aux normes mises en place par la législation. Pour ce faire, il faudra atteindre une concentration minimale de 50g/L d'acide acétique et une concentration maximale de 0,5% d'alcool dans le produit fini.

Avant toute chose, il est essentiel de caractériser la matière première selon les propriétés qui nous intéressent : le taux de matière sèche, de pectines, de sucres, d'acides organiques et de contamination (patuline) ; le profil aromatique ainsi que la concentration, l'identification, le suivi de croissance et de production des souches microbiennes d'intérêt.

Il est impératif de contrôler la contamination possible des pommes en s'assurant que les mycotoxines telles que la patuline (dont la dose journalière maximale tolérable est de 0,4 µg/kg de poids corporel/jour⁸) ne soit pas présente.

Suite à cela, le premier objectif est d'optimiser le système de fermentation selon différents paramètres (récipient, agitation, ajout ou non de jus et quantité de marc utilisée).

Ensuite, ce travail se focalise sur la flore endogène cultivable qui pourra potentiellement être utilisée comme inoculum lors de nouvelles fermentations. Pour ce faire, l'évolution de la croissance des souches endogènes d'intérêt (levures, bactéries acétiques et lactiques) doit être suivie durant la fermentation. Par la suite, celles-ci doivent être identifiées et leur potentiels de croissance et de production, évalués.

La consommation des sucres et la production d'éthanol et d'acide acétique par la flore endogène mais aussi par des flores commerciales doit être suivi ainsi que le profil aromatiques des produits finis.

1.3. Stratégie expérimentale

Dans le cadre du projet AWP, un stage a été réalisé au préalable lors de l'année 2022 (par Soukaina Darsi). Cette étude devait initialement être réalisée sur des pommes marocaines mais suite à des problèmes logistiques, elle a été menée sur des variétés *Golden Delicious* et *Red delicious* du Super U (Montpellier, France). Des fermentations spontanées à 30°C ont été réalisées avec du jus uniquement et un mélange de jus et marc de pomme (*figure 1*). Cela a

permis de déterminer que le marc de pomme de la *Golden Delicious* contenait plus de sucres fermentescibles (fructose et saccharose).

Dans le cadre de ce travail, un déplacement au Maroc a été réalisé afin de se procurer la matière première initialement souhaitée mais suite à de nouveaux problèmes logistiques, il a été préférable de choisir un producteur local de *Golden Delicious*.

Dans le but de contrôler la production du vinaigre de manière optimale, ce travail a été réalisé à partir de la matière première jusqu'au produit fini. Pour ce faire, les pommes locales ont été récupérées suite à la rencontre de différents fournisseurs. L'extraction du jus a été réalisé au sein du Cirad (Bâtiment 15, Montpellier, France).

Une fois la matière première obtenue, la première fermentation a servi d'optimisation des différents paramètres énoncés dans les objectifs. Sur ces différentes modalités, de nombreuses analyses ont été réalisées dans le but de répondre aux objectifs.

La caractérisation du marc de pomme s'est fait à l'aide de méthodes biochimiques pour le calcul du taux de matière sèche, le dosage des pectines, des sucres, des acides organiques, de patuline et l'élaboration du profil aromatique. Les dosages ont été poursuivis lors de la fermentation et à la fin de celle-ci.

L'optimisation du système de fermentation a été réalisé lors d'une première fermentation afin d'établir les paramètres à utiliser lors des fermentations 2 et 3.

D'un point de vue microbiologique, des milieux spécifiques ont été sélectionnés et un dénombrement des souches d'intérêt a été réalisé à différents stades de la fermentation. De nombreuses souches ont été sélectionnées et identifiées par méthodes de biologie moléculaires. Pour finir, un suivi de croissance et de production d'éthanol a été réalisé sur les levures isolées.

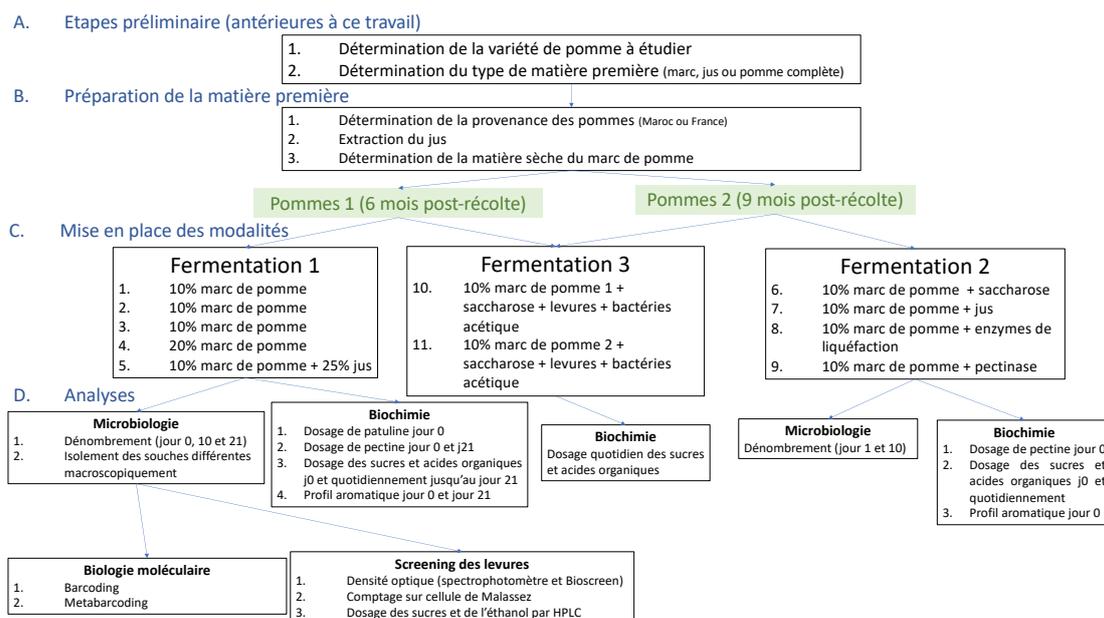


Figure 1 : Stratégie expérimentale mise en place dans le cadre de cette étude

2. Etat de l'art

La plupart des variétés de pomme sont produites dans des climats froids et humides avec un hiver froid et un printemps et un été frais avec un soleil abondant. La Chine est le leader mondial de la production de pommes avec près de la moitié de la production (*figure 2*)⁹.

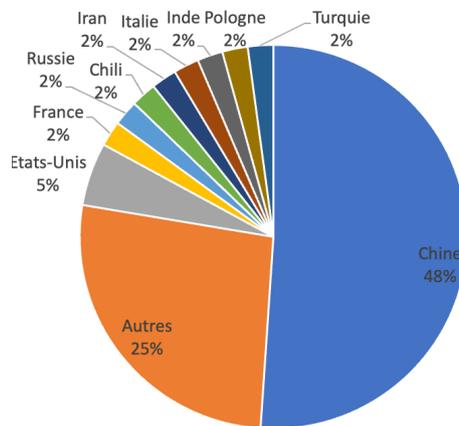


Figure 2 : Diagramme circulaire de la production mondiale de pommes en 2017 selon la FAO

La production de cette variété augmente continuellement avec les années. Les Golden sont stockées durant de longues périodes sous atmosphère modifiée¹⁰.

La composition biochimique et microbienne de la pomme varie selon le cultivar, la région de culture, le climat, les pratiques culturales, la maturité de la récolte, l'atmosphère, les conditions de stockage, l'expédition et la transformation¹¹.

Le marché mondial du vinaigre est en pleine expansion (*figure 3*). Il est de plus en plus demandé par divers groupes d'âge et est diversifié par les différents groupes de fabricants.

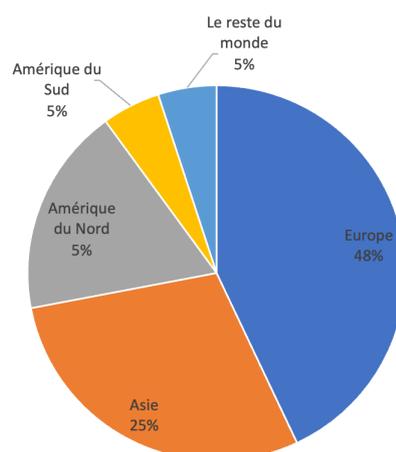


Figure 3 : Diagramme circulaire du marché du vinaigre en 2021

Le procédé de fabrication du vinaigre varie selon la matière première. Concernant le vinaigre de cidre il peut être obtenu à la suite de la double fermentation alcoolique et acétique (*figure 4*)¹².

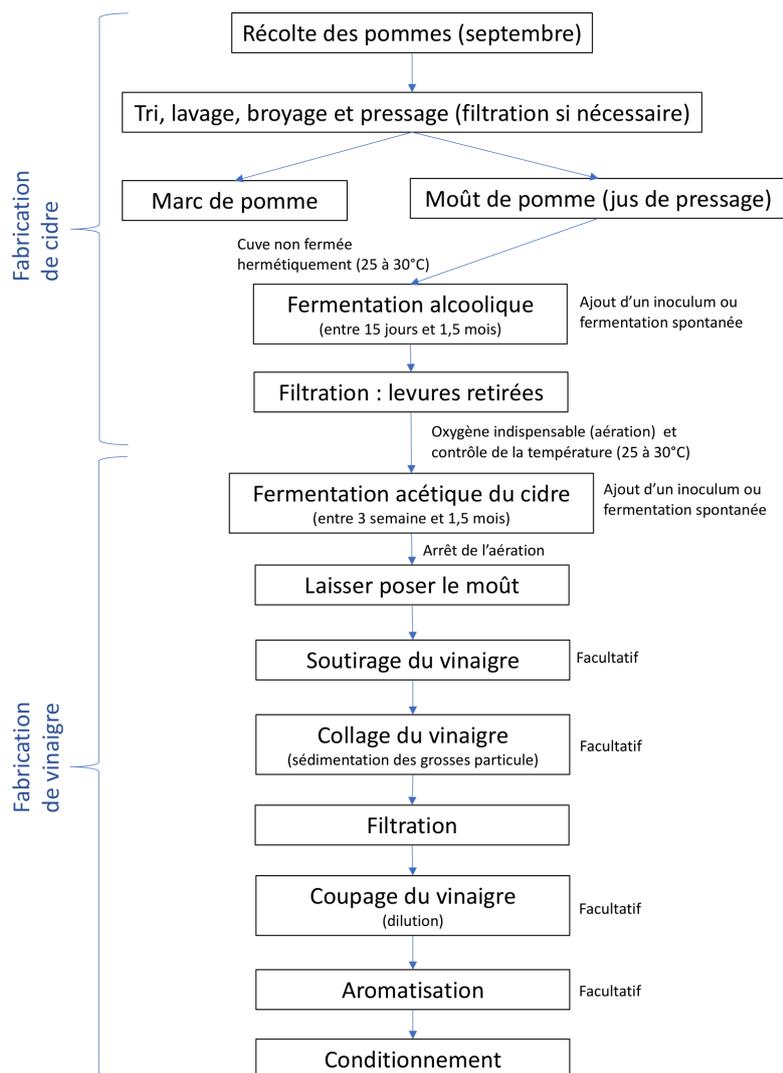


Figure 4 : Diagramme de fabrication du vinaigre de pomme

La fermentation alcoolique

La fermentation alcoolique est la production du cidre à partir de pomme. Elle est réalisée à l'aide du métabolisme central de certaines levures comme *Saccharomyces cerevisiae* qui est la levure la plus courante et la plus disponible dans le commerce. Ces levures convertissent le glucose préférentiellement en éthanol et dioxyde de carbone¹³ durant une dizaine de jours à une température optimale de 30°C¹⁴. Le rendement de production est de 0,54g d'éthanol par gramme de glucose (ou de fructose et saccharose).



Équation 1 : la fermentation alcoolique réalisée par les levures

Comme il est mentionné dans le diagramme de fabrication du vinaigre (figure 2), après la récolte des pommes en septembre ; elles sont lavées, triées, broyées et pressées. Ce qui donne du jus de pressage et du marc de pomme. Le jus est récupéré et fermenté grâce à l'aide des levures présentes ou ajoutées¹⁵ dans des cuves remplies au 2/3 maximum et non fermées

hermétiquement. Il est nécessaire de contrôler l'infestation possible du vinaigre et l'échappement du gaz carbonique. Il est également nécessaire de veiller à ce que la température (25 à 30°C) soit maintenue ¹⁶. La fermentation alcoolique peut durer 15 jours à 45 jours selon la saison et se termine lorsqu'il n'y a plus d'activité en surface.

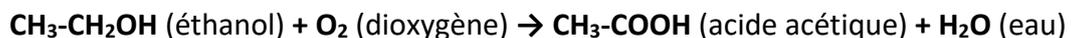
A la fin de cette fermentation, une étape de filtration est réalisée dans le but de retirer les levures devenues inactives et qui commencent à autolyser. Une séparation par centrifugation est également possible ¹³.

La fermentation acétique

La fermentation acétique implique la transformation du cidre en vinaigre. Elle dure entre 21 jours et 45 jours. Elle est réalisée à l'aide de bactéries acétiques acidophiles (de la famille des acetobacteraceae et du genre acetobacter et gluconobacter) qui oxydent l'éthanol en acide acétique. Ce sont des bactéries aérobies stricts sous forme de bâtonnets gram négatives.

Étant donné que c'est une réaction dépendante du dioxygène, il est nécessaire de procéder à une aération qui va permettre une reproduction rapide et continue ¹⁷. La fermentation est dite immergée car les bactéries sont en suspension. Il est également nécessaire de contrôler la température (entre 25 et 30°C) car les acétobacters ne sont pas tolérantes aux hautes températures et de basses températures pourrait provoquer l'arrêt de la fermentation.

Il existe 19 genres de bactéries acétiques mais les plus utilisées dans l'industrie du vinaigre sont les genres Acetobacter, Gluconobacter et les Gluconacetobacters. Les Gluconobacter donnent un goût particulier dû à la production de gluconate ¹⁸. Le rendement de production est de 1,30g d'acide acétique par gramme d'éthanol.



Équation 2 : la fermentation acétique réalisée par les bactéries acétiques.

Après 21 jours, il est recommandé d'arrêter l'aération et de laisser poser le moût de cidre afin que la fermentation s'achève lentement et que les arômes soient libérés. Les bactéries acétiques se mettent en surface et prennent une consistance gélatineuse au fil du temps.

Le soutirage est l'étape où une certaine quantité du vinaigre est retirée afin de ne pas altérer le vinaigre mère. Le vinaigre peut être directement filtré à l'aide de filtre presse à plateaux par exemple ou passer par une étape de collage. Il s'agit de l'étape de floculation et sédimentation des particules en suspension afin de diminuer la turbulence du liquide. L'étape du coupage consiste à diluer le vinaigre à fort degré afin de répondre aux demandes des clients par exemple. L'aromatisation est réalisée naturellement ou par ajout d'arômes. Enfin, le conditionnement peut être précédé d'une étape de pasteurisation avec un échangeur à chaleur (à 60°C). Le vinaigre refroidit naturellement dans les bouteilles et est stocké à température ambiante ¹³.

2.1. Composition biochimique de la pomme et du marc de pomme

Composée de 85,6% d'eau, la pomme est source de monosaccharides, minéraux, fibres, composés bioactifs comme l'acide ascorbique (vitamine C) et de composés phénoliques.

Le marc de pomme est composé d'environ 75% de chair, 21% de peau, 3% de pépins et 1% de tiges ¹⁹.

2.1.1. Glucides et fibres

La pomme est constituée de 13,8% de glucides dont des polysaccharides et des monosaccharides ²⁰. Concernant la variété française *Golden Delicious*, les glucides représentent 85,8% de la matière sèche (MS). Parmi eux, les monosaccharides (62,5% de la MS) sont principalement du fructose et du glucose. Le fructose se trouve en plus grande quantité que le glucose, que ce soit dans la pomme fraîche que dans le MP ²¹.

Certains monosaccharides se trouvent à l'état de traces dans la *Golden Delicious* ; l'arabinose (109mg/100g de pomme), le rhamnose (12mg/100g de pomme), le fucose (8,5mg/100g de pomme), le galactose (71,5mg/100g de pomme), le mannose (21mg/100g de pomme) et le xylose (57mg/100g de pomme) ²². Pour ce qui est du MP, il est composé de 5,5% de sucres ²³.

Les principaux polysaccharides de la pomme sont le saccharose (disaccharide à 13,2% de la MS), l'amidon à faible quantité (à 0,3% de la MS) et les fibres telles que la cellulose (3,7% de la MS), l'hémicellulose (7,4% de la MS) et la pectine ²⁴. La teneur en cellulose dans le marc de pomme est relativement élevée (16%) par rapport à d'autres fruits comme la poire ²⁵.

La pectine est constituée de résidus d'acide galacturonique liés par des liaisons α -1-4-glycosidiques. La fraction de pectines au sein des *Golden delicious* présente une teneur en acide galacturonique de 65% ²⁶. Les chaînes latérales la pectine peuvent contenir des monosaccharides tels que le xylose, l'arabinose, le glucose, le fructose, le mannose ou le galactose ²⁷. La quantité de pectine dans le marc de pomme peut aller de 2,5 à 33,2% ²⁸. La variété *Golden delicious* fait partie des variétés contenant le moins de pectines, 0,5% dans la pomme entière et 3,03% dans la MS (Karakasova et al., 2009).

La lignine, de la famille des macromolécules polyphénoliques, se retrouve à 34 à 39% du poids des peaux de pomme, un peu moins dans le marc de pomme ²⁵.

Le sorbitol est présent en petite quantité par rapport aux monosaccharides dans le fruit mais en plus grande quantité dans les pelures et a un rôle important dans le métabolisme ²⁹. Il se retrouve à environ 0,6% dans le MP ²¹.

Le MP est riche en fibres alimentaires (42,5%). Il est constitué de pectines solubles, β -glucanes, gommages de galactomananes et lignine insoluble, cellulose et hémicelluloses.

2.1.2. Protéines et lipides

Les protéines au sein de la Golden Delicious se retrouvent en faible concentration mais en plus grande quantité que les lipides (1,6% de la MS)³⁰.

Les lipides dans les pommes se retrouvent à l'état de traces (0,1 à 0,5% de la pomme) avec 47% de phospholipides, 17% de glycolipides, 15% de stérols, 5% de triacylglycérols, 2% de stérols esters et 1% de sulfolipides²². D'autres lipides sont également présents comme les acides gras saturés (monoinsaturés et polyinsaturés) ainsi que des oméga 3 et 6. Dans le MP, les lipides se retrouvent à environ 2,3% et les protéines à 4,3%²¹.

2.1.3. Acides organiques

L'acide malique représente 90% des acides de la pomme. Les acides et les glucides permettent la qualité sensorielle du fruit²⁹. Les 10% restants sont constitués d'acides citrique, succinique, citramalique, shikimique, glycérique, glyoxylique, isocitrique, glycolique, lactique et galacturonique²². La variété *Golden Delicious* contient environ 3,8 g/kg d'acide malique et environ 0,3 g/kg d'acide citrique³¹.

2.1.4. Minéraux et oligo-éléments

Les minéraux sont des nutriments inorganiques nécessaires dans le régime alimentaire humain³². Le potassium est le cation le plus important (840 mg/100g de la MS) tandis que le phosphore est l'anion le plus important (73 mg/100g de MS). D'autres minéraux comme le sodium (7,9mg/100g de MS), le calcium (38 mg/100g de MS), le magnésium (5mg/100g de MS) et le fer (1,6mg/100g de MS) sont présents à des plus petites concentrations. Les minéraux présents à des concentrations inférieures à 1mg/100g de MS sont le zinc (0,65mg/100g de MS), l'aluminium (0,43mg/100g de MS), le cuivre (0,35mg/100g de MS) et le manganèse (0,3mg/100g de MS)³³.

Dans le MP, les minéraux et oligoéléments les plus présents sont l'azote (600mg/100g), le potassium (500mg/100g), le calcium (50mg/100g), le sodium (37mg/100g), le magnésium (40mg/100g), le cuivre (0,5g/100g) et le zinc (0,4g/100g)²¹.

2.1.5. Vitamines et provitamines

La vitamine C ou acide ascorbique, essentielle à la synthèse du collagène, est recommandée par l'OMS à 120mg/jour pour une personne. Cette vitamine, présente de 3 à 35 mg/100g de la pomme, est importante pour des dents, des os en bonne santé et contribue à la division cellulaire normale et la carence en vitamine C peut provoquer la scorbut³². D'autres vitamines et précurseurs comme la B12, la D et les tocophérols (vitamine E), la vitamine A et provitamine A, les caroténoïdes provitaminiques, la Beta-carotène, la Beta-cryptoxanthine, la thiamine, la riboflavine, la niacine, l'acide pantothénique (vitamine B5), la vitamine B6, la vitamine K, la lutéine et zéaxanthine se retrouvent à l'état de traces³³.

2.1.6. Profil aromatique

Les teneurs en composés volatils dans les pommes varient selon des facteurs internes (production d'éthylène et respiration) et externes (climat, sol, fertilisation, traitements pré- et post-récolte)³⁴. Plus de 300 composés volatils ont été répertoriés dans les pommes³⁵. Dans la variété Golden Delicious, les esters butyl acétate et hexyl acétate représentent 60% des composés aromatiques, ce qui contribue à sa qualité organoleptique. Les alcools présents dans cette variété sont l'éthanol, le 1-propanol, le 2-méthyl-1-propanol, le 1-butanol, le 4-méthyl-2-pentanol, le 2-méthyl-1-butanol et le 1-hexanol. Le butanol et l'hexanol contribuent à la sensation de sucré³⁶.

Les polyphénols les plus représentés dans la pomme sont les flavonoïdes tels que les flavonols, les flavanols, les quercétin glycosides, les catéchines et les procyanidines. Les molécules les plus retrouvées sont les épicatechines, catéchines (et leurs stéréo-isomères), et la procyanidine, l'acide chlorogénique (et ses isomères), la quercétine-3-O-galactoside (ainsi que ses mono-glycosides et di-glycosides 4), le xyloglucoside de phlorétine et phloridzine, la cyanidine-3-galactoside (et autres cyanidines glycosides). Celles-ci sont toutes de puissants antioxydants retrouvés, en grande partie, dans le MP (majoritairement dans la peau et les pépins)³⁷.

Les composés polyphénoliques retrouvés dans le MP sont catéchines, procyanidines, phloridzine, glycosides de phlorétine, acides caféique et chlorogénique, quercétine et glycosides de cyanidine²¹.

La maturation de la pomme implique des changements physiologiques et structurels comme le ramollissement du fruit, la respiration cellulaire climatérique, l'hydrolyse de l'amidon, l'augmentation des sucres, la dégradation de la chlorophylle, les modifications de la membrane, la synthèse de protéines et des arômes³⁸. Cette augmentation de substrat permet l'augmentation de la quantité globale de volatils dans la *Golden Delicious*³⁹.

La perception de l'arôme de la pomme est le résultat du mélange complexe des molécules volatiles : l'acétate de butyle, l'acétate de 2-méthylbutyle, l'acétate d'hexyle et l'hexanoate d'hexyle⁴⁰. Le butan-1-ol, le butanoate d'éthyle et le 2-méthylbutanoate d'éthyle présentent l'arôme sucré et fruité de la pomme.

2.2. Microbiote de la pomme

La flore endogène à la pomme est très étendue. Lorsque le microbiote est lié à son organisme, ils peuvent être considérés comme un méta-organisme⁴¹, il est aussi lié au génotype de la pomme⁴². La composition de celui-ci varie selon la portion de la pomme (pelure, blessure, extrémité du calice et extrémité de la tige), selon le type de culture (conventionnel ou bio)⁴³ et d'autres paramètres comme la saison, la durée et la technologie de stockage⁴⁴. La communauté bactérienne est plus diversifiée dans l'extrémité de la tige que dans la peau et l'extrémité du calice. En revanche la communauté fongique est plus diversifiée dans l'extrémité du calice puis dans l'extrémité de la tige et enfin dans la peau. Les conditions de transformation dans les usines peuvent également impacter les communautés microbiennes de la pomme

Le microbiome bactérien sur la peau de la pomme consiste en les genres *Cronobacter*, *Sphingomonas*, *Methylobacterium* et *Hymenobacter* qui sont les plus abondants ⁴⁴. Pour ce qui du phylum bactérien, il est présent en grande quantité dans l'extrémité de la tige et est constitué des *Acidobacteria*, *Armatimonadetes*, *Planctomycetes*, *TM7* et *Thermi*. Quant aux familles et genres *Microbacteriaceae*, *Pseudomonas* et *Enterobacteriaceae*, ils se retrouvent en grande quantité dans l'extrémité du calice ⁴⁵. Certaines espèces peuvent être citées ; *Enterobacter cloacae*, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella choleraesuis*, *Serratia marcescens*, *Vibrio cholerae* et *Hafnia alvei* (Yu et al., 2004).

Le microbiome de la pomme se résume aux quatre genres *Cladosporium*, *Aureobasidium*, *Didymella* et *Vishniacozyma*. D'autres genres de levures ont été répertoriés sur des pommes achetées en supermarché (*Malassezia*, *Candida* et *Trichosporon*) qui sont associés à des troubles dermatiques chez l'homme ⁴³. La présence des familles de *Pseudomonadaceae* et de *Diplodasceae* est associée à la persistance de *Listeria monocytogenes* dans la pomme ⁴⁶. Le phylum fongique les plus abondants sont les *ascomycètes* (où *Penicillium* est retrouvé) et *basidiomycètes*. La levure *Pseudomonas vulgaris* et la moisissure *Penicillium expansum* ont également été détectées dans la pomme (Zhong et al., 2018). C'est la moisissure responsable de la production de la mycotoxine (la patuline ; C₇H₆O₄) provoquant une toxicité aigüe chez l'homme selon la FAO. Les genres de levures *Aureobasidium*, *Metschnikowia* et *Rhodotorula* montre une présence mineure de champignons pathogènes tels que *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*. D'autres familles et genres (*Pleosporaceae*, *Sarocladium*, *Pseudomicrostroma* et *Paraconiothyrium*) ont été répertoriés dans l'extrémité de la tige ⁴⁵.

2.3. Composition biochimique du jus de pomme

Les jus de fruits sont très prisés pour leur pouvoir rafraichissant, leur effet nutritionnel et stimulant, leur goût harmonieux ainsi que leur leurs bienfaits pour la santé grâce à la présence de vitamines et substances biologiquement actives comme les minéraux, fibres et composés antioxydants ⁴⁷. Les conditions de stockage, le procédé de fabrication, la variété, la région, la maturité et le climat affectent la composition du jus ⁴⁸. Les sucres, les acides et les polyphénols sont les trois composés qui affectent la fermentation du jus de pomme ²².

2.3.1. Glucides et fibres

Le jus extrait de pommes de la variété *Golden Delicious* est constitué de 12% de sucres dans l'ordre suivant : le fructose (environ 8%), le saccharose (environ 2%), le glucose (environ 2%) et le sorbitol ⁴⁸. La nature des sucres peut impacter le processus de fermentation car les monosaccharides produisent du dioxyde de carbone plus rapidement que les disaccharides. Des concentrations en glucose et en fructose peuvent impacter la croissance de la levure.

2.3.2. Polyphénols et composés volatils

Les bactéries lactiques sont responsables du changement du profil aromatique lors des fermentations. Les molécules de phloorrhizine et d'acide chlorogénique deviennent les composés phénoliques dominants. Lors des fermentations lactiques, les teneurs en acide

gallique, épicatechine et phloorrhizine augmentent tandis que celles en acide férulique et en acide ellagique diminuent ⁹.

2.3.3. Eléments-traces

Concernant les minéraux et oligo-éléments, le jus de pomme contient 0,12% de potassium, 0,007% de phosphore, 0,006% de calcium, 0,005% de magnésium et 0,0003% de fer en moyenne. Tandis que pour les vitamines, il contiendrait seulement des traces de vitamines C et A. Et enfin, Le jus de pomme contient 0,1% de protéines et des traces de lipides ⁴⁹.

Les principaux acides aminés dans le jus sont les acides aspargines, aspartiques et glutamiques avec une moindre quantité de sérine, α -alanine, l'acide γ -aminobutyrique, valine, isoleucine et methylhydroxyproline ⁵⁰. Le reste d'acides aminés présents à l'état de traces sont : l'arginine, la cystine, la glycine, l'histidine, la leucine, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la thréonine, la tryptophane et la tyrosine.

Les acides gluconiques et oxaliques sont formés à la suite des décompositions des acides par les microorganismes fongiques ⁵¹.

2.4. Microbiote du jus

Grâce à son activité de l'eau élevée (0,98-0,99), le jus de pomme est un environnement favorable à la croissance microbienne. La présence de substrat (haute teneur en sucres) stimule la croissance microbienne des bactéries lactiques, des coccis et des levures (*Saccharomyces*, *Hanseniapora*, *Torulopsis* et *Candida*) ⁵¹.

La production d'acide lactique par les bactéries lactiques permet un environnement acide favorable à la croissance de champignons de putréfaction (du genre *Penicillium*, *Aspergillus* et *Monilia*). Les bactéries lactiques sont également responsables du changement du profil aromatique lors des fermentations.

De fortes concentrations en glucose et fructose (entre 200 et 300 g/L) réduit le taux de croissance de certaines souches de levures comme *Saccharomyces Cerevisiae* ⁵² et augmente la demande de la levure en azote assimilable, ce qui peut inhiber la fermentation ⁵³.

De faibles concentrations en glucose permettent aux levures d'utiliser le sucre par respiration ou par fermentation. L'aération permet l'augmentation de la biomasse formée et une diminution de la production d'alcool et de la consommation de sucre ²².

2.5. Composition biochimique du cidre

Le cidre est une boisson légèrement alcoolisée (entre 1,2 et 8,5%) populaire dans l'industrie de la pomme dans nos régions ainsi qu'en Amérique du Nord et en Australie ⁵⁴. Dans la majorité des cas, sa production est réalisée à partir de la fermentation spontanée du jus de pomme par les levures endogènes ⁵⁵. La fermentation peut être partielle ou complète sur du jus frais ou reconstitué, avec ou sans ajout de sucre, d'eau ou d'arôme ⁵⁶.

Au cours de la fermentation spontanée, les espèces de levures produisent différents métabolites ayant un impact essentiel sur la qualité organoleptique de la boisson (Walker & Stewart, 2016). La composition biochimique du cidre dépend alors de la composition initiale du jus, du type de microorganisme impliqué et de la technologie appliquée. Deux catégories de cidre de pomme existent : le cidre standard et le cidre spécial. Le cidre standard est obtenu sans ajout de d'arômes ou d'autres fruits⁵⁶. Le pH de cette boisson est entre 3,0 et 3,8.

2.5.1. Glucides et fibres

Le cidre à partir de la variété de pomme *Golden delicious* contient environ 12,5% de sucres dont le fructose (4,5%), le saccharose (2,3%), le glucose (1,8%)⁵⁷.

Le sorbitol est présent à environ 1% et l'amidon varie selon la maturité de la pomme. Moins la pomme est mûre, plus l'amidon est présent en plus grande concentration (0,8%)^{58,59}. La pectine est présente à une concentration entre 0,1 et 1% dans le cidre.

2.5.2. Acides organiques

Le principal acide organique présent dans le cidre est l'acide malique (0,4%). Quant aux autres, ils sont présents à de très faibles concentrations : les acides quinique (1200mg/L), ascorbique (950mg/L), succinique (500mg/L), citrique (343mg/L), oxalique (200mg/L), folique (70mg/L), pyruvique (31 mg/L), tartrique (6mg/L) et fumarique (4mg/L)^{60,61}.

L'acide hexanoïque et l'acide octanoïque sont responsable de l'arôme sucré, fruité et fromagé du cidre⁵⁴.

2.5.3. Éléments-traces

Les minéraux constitutifs du cidre sont le potassium qui est l'élément majoritaire (environ 1000mg/L), ensuite, le calcium (100mg/L), le phosphore (44mg/L), le magnésium (41mg/L), le fer (5mg/L) et enfin le cuivre (1,1mg/L)⁶².

De nombreux acides aminés sont présents à l'état de traces ; l'acide aspartique, l'acide glutamique, l'acide aspartique, la sérine, l'histidine, la glycine, l'arginine, l'alanine, la tyrosine, la méthionine, la valine, la phénylalanine, l'isoleucine, la leucine et la lysine⁶³.

2.5.4. Profil aromatique

Lors de la fermentation, différents types d'arômes peuvent être répertoriés ; les arômes primaires déterminés par la composition initiale de la pomme, les arômes secondaires créés lors de la fermentation en elle-même et les arômes tertiaires générés lors de la maturation du produit fini⁶⁴.

Certaines propriétés sensorielles du cidre comme la couleur, l'amertume, l'astringence, la douceur et l'acidité sont impactées par sa composition phénoliques⁶⁵. Les composés à haut poids moléculaires comme les procyanidines sont responsables de l'astringence tandis que celles à faible poids moléculaire, de l'amertume. Les esters acétates contribuent à l'arôme torréfié et cuit des cidres.

Le profil aromatique du cidre impliquant les alcools, les esters et les acides gras, varie en fonction de la levure qui a effectué la fermentation du jus. La levure *Saccharomyces cerevisiae* est un grand producteur d'esters d'acétate, l'acétate d'isoamyle étant l'ester le plus abondant dans les cidres (2000 µg/L).

Les molécules diacétyle, 2,3-butanediol et acétoïne sont, quant à elles, produites par les bactéries lactiques⁶⁶.

Certains composés volatils se retrouvent en moindre quantité tels que les monoterpènes (linalol et géraniol) et les norisoprénoïdes (3-hydroxy-β-damascone et β-damascénone). Le linalol (à environ 2 µg/L) et le géraniol (à environ 12 µg/L) contribuent à l'arôme fleuri et fruité et peuvent être libérés par les levures à partir de précurseurs de glycosides. Un phénol volatil, le 4-vinyl guaiacol a également été retrouvé dans le cidre⁵⁴.

Le 3-méthyl-1-butanol et le 2-phényléthanol sont les alcools les plus abondants dans tous les cidres, suivis du 2-butanol et du 1-hexanol. Le 3-méthyl-1-butanol et le 2-phényléthanol sont les principaux alcools produits par *Saccharomyces cerevisiae*⁵⁴.

2.6. Microbiote du cidre

La fermentation est la collaboration de différentes de levures et de bactéries initialement présentes dans le produit. La levure joue un rôle essentiel dans la production des boissons alcoolisées. Cependant, il est nécessaire de sélectionner la souche appropriée pour contrôler le rendement en alcool ainsi que la qualité sensorielle du produit final. Les levures fermentatives consomment les sucres en anaérobiose et agissent comme donneurs d'électrons, accepteurs d'électrons et sources de carbone.

La souche *Saccharomyces cerevisiae* est couramment utilisée pour réaliser une fermentation alcoolique complète en raison de son comportement contrôlé et répétitif et la libération de précurseurs d'arômes. D'autres souches comme *Saccharomyces bayanus* ou non-*Saccharomyces* ont pu être sélectionnées comme starter dans la production de cidre (Pando et al., 2017). Il est possible d'utiliser les espèces de levures *Saccharomyces* (à 83% de la population totale de levures) et les espèces de levures non-*Saccharomyces* (à 13% de la population totale de levures) ensemble lors de la fermentation du jus de pomme.

Les critères de sélection des souches de levures sont leur capacité à dominer le milieu, à améliorer les caractéristiques sensorielles souhaitées et leur incapacité à produire des composés indésirables tels que les amines biogènes⁶⁸. Généralement, un complexe de levures est utilisé, certaines espèces peuvent n'être présentes que dans l'une des premières étapes de fermentation et d'autres (plus résistantes à l'éthanol) sont présentes dans les autres étapes de la fermentation⁶⁹.

Les principaux genres de levures présents dans les premières étapes de fermentation sont *Hanseniaspora* (non-*Saccharomyces*) et *Candida*. Ces espèces ont une faible capacité fermentaire et sont sensibles à des concentrations en alcool de 5 ou 6%. Lors de la fermentation, d'autres levures telles que *Brettanomyces* (non-*Saccharomyces*),

Kluyveromyces, *Schizosaccharomyces*, *Torulasporea*, *Zygosaccharomyces* et *Saccharomyces* peuvent avoir un impact positif sur les arômes du produit fini.

Les espèces *Hanseniaspora*, *Zygosaccharomyces* et *Schizosaccharomyces* produisent de grandes quantités d'acide acétique et faibles concentrations en alcools supérieurs tandis que les espèces *Candida*, *Hanseniaspora*, *Torulasporea delbrueckii* et *Kazachstania gamspora* produisent des esters et composés soufrés. *Hanseniaspora uvarum* est le plus grand producteur d'acétate d'hexyle et d'isoamyle ⁷⁰.

En plus des levures, les bactéries lactiques (LAB) contribuent à la transformation de l'acide malique, abaissant l'acidité totale et induisant un changement organoleptique. Les genres de LAB d'intérêt et capables de survivre dans les environnements du cidre (teneur élevée en éthanol, faibles teneurs en nutriments et pH faible) sont *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Pediococcus* ⁶⁶.

2.7. Composition biochimique du vinaigre de pomme

Comme mentionné précédemment, le vinaigre de cidre de pomme est obtenu à partir de la fermentation acétique du cidre. La double fermentation alcoolique et acétique ainsi que la matière première (variété, conditions de croissance et de stockage) modifie sa composition biochimique ⁷⁰. Cependant composé de 94% d'eau, c'est une boisson riche en antioxydants et en acides organiques donnant la saveur unique du vinaigre de pomme. Cette boisson ne comprend ni lipides, ni protéines, ni vitamines, ni pectines.

2.7.1. Glucides et minéraux

Le vinaigre de pomme contient entre 1,5 et 7 g/L de glucides dont le fructose est majoritaire ⁷¹.

Les minéraux répertoriés dans le vinaigre de pomme sont le potassium, sodium, calcium, magnésium, fer, phosphore, nickel et manganèse ⁷².

2.7.2. Acides organiques

L'acide acétique est l'acide organique principal du vinaigre de pomme (5%). Ensuite, l'acide tartrique et malique (3,56 g/L), lactique (0,38 g/L), formique (0,28 g/L), succinique (0,27 g/L), citrique (0,02 g/L), chlorogénique (0,006 g/L) et gallique (0,004 g/L) sont présents en quantité moindre ⁷¹.

2.7.3. Profil aromatique

Les composés responsables du profil aromatique sont les phénols, les alcools, les esters, les aldéhydes, les cétones, les acides organiques.

Les composés phénoliques majoritaires du vinaigre de pomme sont l'acide p-coumarique, l'acide protocatéchuïque et l'acide chlorogénique ⁴².

Les molécules d'alcools impliquées dans le profil aromatique du vinaigre de pomme sont : isopropanol, 2-méthyl-1-butanol, méthanol, éthanol, isoamyl-alcool et α -terpinol⁷³.

Les molécules d'esters impliquées sont : méthyl acétate, ethyl acétate, méthyl isobutyrique, ethyl isobutyrique, méthyl 2-méthylbutyrate, ethyl 2-méthylbutyrate, butyl acétate, ethyl isovalérate, isoamyl acétate, ethyl hexanoate, hexyl acétate, méthyl cinnamate, δ -decalactone, α -decalactone, pentyl cinnamate et ethyl cinnamate⁷³.

Les molécules d'aldéhydes impliquées sont : acétaldéhyde, propinaldéhyde, 3-méthylbutanal, 2-méthylbutanal, hexanal, benzaldéhyde et nonanal⁷³.

Les molécules de cétones impliquées sont cyclopentanone, cyclohexanone, 2-heptanone et β -ionone⁷³.

Les molécules d'acides organiques impliquées sont les acides acétique, propanoïque, butyrique, isovalérique, valérique, hexanoïque et heptanoïque⁷³.

L'acéto-nitrile et la pyrosine sont également impliquées dans le profil aromatique du vinaigre de pomme⁷³.

2.8. Microbiote du vinaigre de pomme

Le pH du vinaigre de pomme issu de la variété *Gloden delicious* est à un pH d'environ 3, ce qui lui confère des propriétés antiseptiques. Les levures et les bactéries acétiques (AAB) sont les deux principaux groupes impliqués dans la production du vinaigre ⁷².

Les AAB sont les souches responsables du rendement et de la qualité du vinaigre (production de l'acide acétique). Ce sont des souches aérobies obligatoires, gram-négatifs ou gram-variable, catalase-positif, oxydase-négatif, mobiles ou non, non-sporulées et ellipsoïdaux en forme de bâtonnets (simples, paires ou chaînes) avec des tailles comprises entre 0,4 et 1 μm de large et 0,8 à 4,5 μm de long. Les AAB qui sont flagellées de manière pétriche sont des *Acetobacter* et les polaires, des *Gluconobacter*. Leur température de croissance optimale est de 25 à 30°C et la plupart sont mésophiles et certaines sont thermotolérantes. Ces AAB peuvent se développer à des pH faibles (3 à 4). *Acetobacter syzygii*, *Komagataeibacter melaceti*, *Komagataeibacter melomenus* et *Komagataeibacter xylinus* sont des espèces ayant été utilisés pour la fabrication de vinaigre de cidre de pomme ^{74,75}.

Les bactéries lactiques (LAB) sont productrices d'acide lactique jouant un rôle dans l'amélioration du goût et de l'odeur ainsi que de l'abaissement du pH inhibant la croissance de souches indésirables. Ce sont des souches à gram-positif, catalase-négatif, en forme de bâtonnet ou de coccus, non sporulés ⁷⁵.

3. Matériel et méthode

3.1. Matériel végétal

3.1.1. Les pommes

A l'origine, ce travail devait se faire sur du matériel végétal issu de la station de conditionnement « Bismillah » à Meknès au Maroc. Pour cause des contraintes logistiques, le matériel végétal étudié est le marc de pommes de la variété *Golden delicious* issues de l'agriculture biologique et locale Sica 'Les Vergers Du Lez' à Saint-Clément-de-Rivière (Département du Gard, France) (figure 5). La fin de la récolte se faisant en septembre, les pommes sont alors stockées à des températures entre 0,5 et 6°C tout au long de l'année et ainsi vendues au fur et à mesure. Elles sont soit vendues telles quelles en magasin ou transformées en jus ou compotes par leurs partenaires. Le marc issu de la transformation en jus est alors récupéré et est utilisé en engrais pour les prochaines cultures ou jeté.



Figure 5 : pommes Golden Delicious utilisées lors de cette étude ; à gauche pour la fermentation 1 (six mois post-récolte) et à droite pour la fermentation 2 (neuf mois post-récolte)

3.1.2. Extraction du jus

L'élaboration du jus a été réalisée en deux étapes. Pour commencer, les pommes ont été rincées et les appareils (figure 6), nettoyés et rincés à l'eau de distribution. La verrerie de récupération du jus et du marc quant à elle, a été préalablement stérilisée à l'autoclave.

Après élimination des parties "pourries" visibles à l'œil nue à l'aide d'un couteau de cuisine, les pommes ont été broyées à l'aide d'un broyeur Voran à couteaux RM 5.5 qui allait à un débit de 4 200 kg/h. Ensuite, celles-ci ont été pressées avec une presse Sakaya 12 dans un sac à pressoir.



Figure 6 : appareils utilisés pour le pressage du jus, à gauche le broyeur et à droite la presse

3.1.3. La matière sèche

L'objectif de cette méthode est d'estimer le taux de matière sèche utilisé pour lors des deux fermentations. Dans une coupelle en aluminium, environ 1g de marc a été pesé à l'aide d'une balance analytique. Les coupelles ont ensuite été incubées à 110°C durant 24h.

3.1.4. Préparation des "vinaigres"

Fermentation 1

Cinq modalités avec différents paramètres ont été mises en place avec les pommes de six mois post-récolte et quatre paramètres ont été testés.

Le premier paramètre concerne la quantité de marc, à savoir 10% et 20% de marc de pomme pour un total de 400ml avec de l'eau de distribution ou du jus. Le deuxième paramètre est l'ajout ou non du jus obtenu lors du pressage (0% ou 25%).

L'agitation est testée à l'aide de barreaux magnétiques ou d'un piston (mis en place au CIRAD, Montpellier) afin d'éviter toute source de contamination en y introduisant une cuillère par exemple.

Pour finir, deux types de récipients ont été testés ; la fiole Erlenmeyer et le Bécher. Toutes les modalités ont été réalisées en triplicat et ont été couvertes par des compresses afin de permettre la respiration des levures et des bactéries acétiques.

La température de fermentation optimale étant de 30°C, ces préparations ont été placées à l'étuve à cette température durant 21 jours (jusqu'à épuisement des sucres fermentescibles).

Les cinq modalités se présentent de la manière suivante ; la première modalité contient 10% de marc et 90% d'eau dans un bécher avec un barreau magnétique ; la seconde, 10% de marc et 90% d'eau dans un bécher avec un piston; la troisième, 10% de marc et 90% d'eau dans un Erlen-Meyer avec un barreau magnétique ; la quatrième, 20% de marc et 90% d'eau dans un bécher avec un barreau magnétique et enfin la dernière, 10% de marc, 65% d'eau et 25% jus dans un bécher avec un barreau magnétique (*figure 7*).

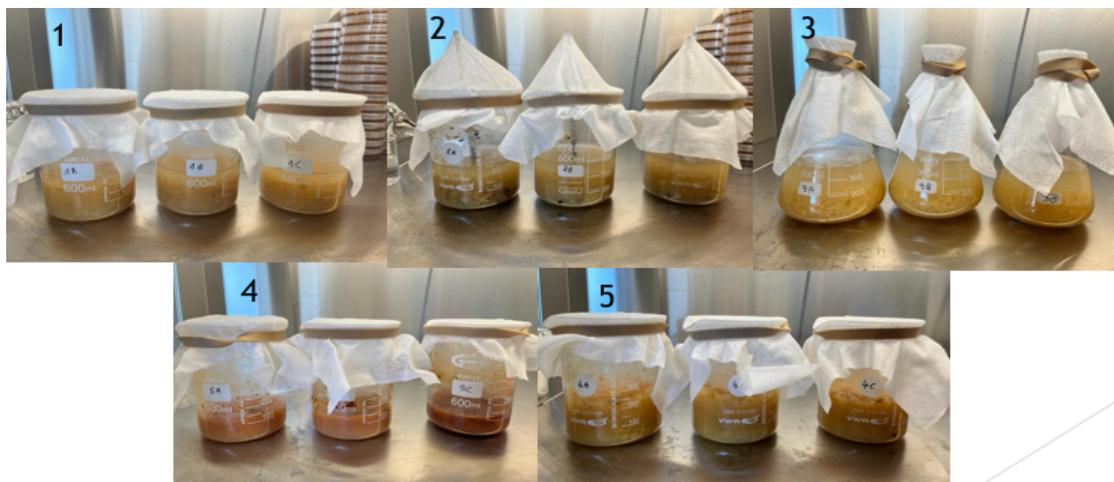


Figure 7 : illustration des cinq modalités de préparation de vinaigres en fin de fermentation 1 (jour 21)

Fermentation 2

Quatre autres modalités en triplicat ont été mises en place avec les pommes de neuf mois post-récolte (*figure 8*). Toutes contiennent 10% de marc et ont été réalisées dans des bécards et agitées à l'aide de barreaux magnétiques. Dans la 6^e et 7^e modalité, du saccharose et du jus ont respectivement été ajoutés afin d'atteindre une concentration de 75,5g/L de sucres de départ, le volume final a été complété par de l'eau de distribution. Dans la modalité 8, un complexe d'enzyme de liquéfaction composé de pectinases et cellulases (ROHAPECT® PTE 100) qui permet initialement de diminuer la viscosité du vin a été ajouté. Dans la modalité 9, une pectinase pure a été ajoutée (Pectinaex Ultra®). Les deux solutions d'enzymes sont issues d'*Aspergillus aculeatus* et à une concentration de 3800 U/ml.



Figure 8 : illustration des quatre modalités de préparation de vinaigres en début de fermentation (jour 0)

Fermentation 3

Deux modalités supplémentaires ont été mises en place ; les deux contiennent des marcs respectivement issus des pommes des fermentations 1 et 2. A ces 10%, du saccharose pur a été ajouté afin d'obtenir une concentration de 75,5g/L de sucres fermentescibles de départ.

Dans chacune des modalités, des souches commerciales de l'espèce de levure *Saccharomyces Cerevisiae* (LM de la société Lallemand, Blagnac, France) et des souches de bactéries acétiques de l'espèce *Acetobacter pasteurianus* (B19, Lallemand, Blagnac, France) ont été ajoutées. Ces souches ont été fournies sous forme de levures sèches (LSA) avec une concentration de cellules viables 10 log UFC/g et stockées à 4°C. Des concentrations initiales à 7 log UFC/ml dans les modalités ont été supposées afin qu'elles soient majoritaires par rapport aux bactéries lactiques présentes.

Pour ce faire, une préculture de chacune des souches a été réalisée (*figure 9*). Après centrifugation, le milieu de culture a été éliminé puis remplacé par de l'eau de distribution. L'ensemencement a ensuite été réalisé dans chacune des modalités. La concentration en UFC/ml des suspensions a été vérifiée à l'aide d'un ensemencement en surface de 4 dilutions en cascade sur boîte de Pétri en triplicat. Les levures ont été ensemencées sur le milieu Sabouraud au chloramphénicol et les bactéries acétiques sur milieu GYC (Glucose, Yeast-extract and Calcium carbonate) contenant de la pénicilline et du cycloheximide.

Toutes les boites ont été incubées à 30°C durant 48h.

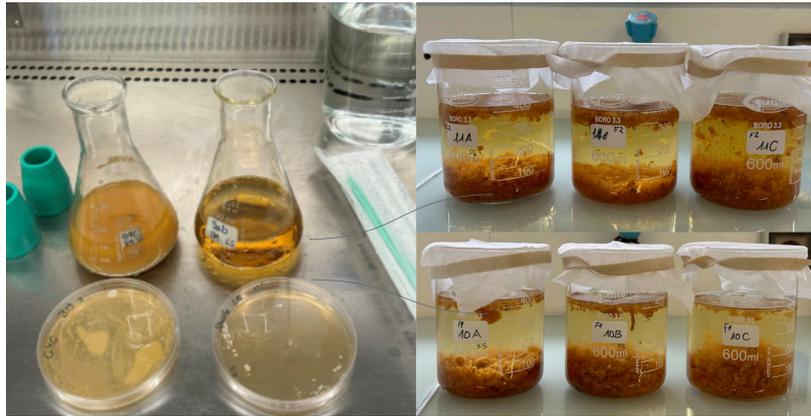


Figure 9 : Illustration des précultures effectuées et des deux préparations de vinaigres en début de fermentation (jour 0)

3.2. Analyses

3.2.1. Microbiologie

Milieux de culture

Les flores d'intérêt dans cette étude sont celles impliquées dans la fermentation, à savoir les levures, les bactéries acétiques ainsi que les bactéries lactiques. Pour ce faire, différents milieux de cultures spécifiques ont été testés.

Pour les levures, le milieu gélosé Sabouraud au chloramphénicol a été utilisé.

Concernant les bactéries lactiques qui sont des gram + anaérobies partiellement tolérantes à l'oxygène, elles sont cultivées dans des jars avec des sachets assurant le maintien du milieu en anaérobiose. Le milieu utilisé est le MRS (Man, Rogosa et Sharpe). Ces milieux ont été conçus à partir des milieux déshydratés de la marque BLOKAR Diagnostics.

Concernant les bactéries acétiques, les milieux ont été conçus en laboratoire à partir des ingrédients retrouvés dans le recueil des méthodes internationales d'analyses – oiv. Pour 1L d'eau distillée, le milieu Kneifel contient 30g d'extrait de levure, 20g d'agar bactériologique, du vert de de bromocrésol à 2,2% dans de l'éthanol ainsi que 20ml d'éthanol ajoutés après stérilisation. Dans le GYC (Glucose, Yeast-extract and Calcium carbonate) ou Acétobacter agar ; 50g de glucose, 10g d'extrait de levure et 3g Carbonate de calcium (CaCO_3) sont ajoutés à 1L d'eau distillée. Pour les 2 milieux, après autoclavage, 100 mg/L de cycloheximide pour inhiber le développement des levures et 12,5 mg/L de pénicilline pour éliminer la croissance des bactéries lactiques sont ajoutés après stérilisation.

Tous les milieux ont été stérilisés à l'autoclave (15min à 121°C) et ensuite, coulés sur boite de Pétri.

Dénombrement

Afin de dénombrer les microorganismes d'intérêt dans le marc, 1/10^e de marc a été dilué dans de l'eau physiologique (9 g/L de chlorure de sodium (NaCl)) et mis dans un sac stomacher. A partir de la solution obtenue, des dilutions en cascade au 10^{ème} ont été effectuées jusqu'à 10⁻⁵. A partir de chaque dilution, 100 µl ont été ensemencées sur les boites de Pétri qui sont par la suite incubées à 30 °C pendant 48 h.

Le dénombrement a été réalisé sur le marc de pomme (jour 0) et les préparations de vinaigres des cinq premières modalités A au jour 10 (milieu de l'expérimentation) et 21 (fin de l'expérimentation).

Concernant les modalités 6 à 9, les dénombrements ont été effectués au jour 1 et 10 sur les deux répétitions biologiques A et B.

Concernant les modalités 10 et 11, l'objectif est la confirmation des 9 log UFC/ml initiales pour ensuite ensemercer 7 log UFC/ml de chacune des souches (levures et bactéries acétiques commerciales) dans les modalités 10 et 11 selon le calcul :

$$\text{Concentration initial} \times \text{Volume initial} = \text{Concentration finale} \times \text{Volume finale}$$

Équation 3 : corrélation entre la concentration et le volume

Le volume initial ensemercé est 4ml et le volume final dans la modalité, 400 ml, la concentration de départ des bactéries lactiques est de 6 à 7 log UFC/ml, le but est que les souches d'intérêt soient plus nombreuses que celles-ci.

Isolement

Après l'obtention de différents aspects de colonies dans les milieux de culture spécifiques, les différentes souches de la fermentation 1 ont été repiquées par triplicat dans leurs milieux spécifiques respectifs. Ensuite, elles ont été stockées dans des cryotubes à -80°C.

3.2.2. Screening des levures

L'objectif du screening est le suivi de la croissance des levures et leur production d'éthanol à partir de sucres fermentescibles en milieu aqueux (Sabouraud au Chloramphénicol enrichi en saccharose) incubées à 30°C durant 24h.

Le but étant de déterminer les souches avec un potentiel de production d'éthanol optimal et de les utiliser comme inoculum lors de nouvelles fermentations. La concentration de départ de sucres est de 75,5g/L ; le rendement de production devrait être de 0,51g d'éthanol par gramme de sucres fermentescibles.

Dans un premier temps, La croissance microbienne est suivie à l'aide de l'évaluation de la densité optique (à 620nm) par spectrophotométrie et du comptage sur cellule de Malassez au microscope optique.

La consommation de sucres et la production d'éthanol est évaluée à l'aide du dosage par HPLC-UV-RI (ThermoFisher Scientific Ultimate 3000, Villebon sur Yvette, France).

Dans un second temps, l'évaluation de la densité optique a été réalisé à l'aide du Bioscreen C MBR (Labsystems, Helsinki, Finlande) qui est un système automatisé utilisé pour l'analyse des courbes de croissance microbienne à haut débit en milieu aqueux durant 24h. Quant à l'évaluation de la consommation de sucres et de la production d'éthanol, elle a été réalisé par HPLC-UV-IR durant une semaine.

3.2.3. Biologie moléculaire

Barcoding

L'objectif est d'identifier les souches de levures, bactéries acétiques et bactéries lactiques impliquées dans la fermentation 1.

Extraction de l'ADN

Les souches stockées dans des cryotubes ont été repiquées sur boîte de Pétri. Après incubation de 48h à 30°C, elles ont été déposées dans de l'eau physiologique. Un choc thermique est ensuite réalisé afin d'extraire l'ADN ; alternance du chaud (2min à 100°C au bain-marie) et du froid (2min dans de l'azote liquide) cinq fois. Celles-ci ont été centrifugées et ensuite, conservées à -20°C.

Amplification de l'ADN

Sur une plaque PCR à ADN, les échantillons sont ajoutés à un mélange réactionnel (tableau 1). Ce mélange contient les amorces primers et reverse spécifiques aux bactéries et aux levures, de l'eau ultra pure et mastermix (Thermo Fisher Scientific, Lituanie) composé de la Taq Polymérase (enzyme thermorésistante tolérant des températures à 100°C), les désoxyribonucléases triphosphate (pour l'élongation du brin d'ADN) et le tampon (contenant le Mg²⁺ qui est un cofacteur neutralisant les charges de l'ADN et ainsi permettant à la Taq Polymerase de fonctionner de manière optimale), le tout était stocké à -20°C.

Réactifs	Volume (en µl)
Master Mix	7
Eau ultra pure	10
Amorce sens (10 µM)	1
Amorce anti-sens (10 µM)	1
ADN	1
Total	20

Tableau 1 : mélange réactionnel introduit dans les plaques PCR

Une amorce est une petite séquence d'ADN complémentaire d'une des extrémités de la séquence cible. Elle permet à la Taq polymérase de démarrer la synthèse de l'ADN complémentaire. Les amorces utilisées pour les bactéries sont la 27F (5'-GTGCTGCAGAGAGTTTGAT-CCTGGCTCAG) et 1492R (5'-GGTTACCRRGTTACGACTT) et celles pour les levures : ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG) et ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC).

Les étapes d'amplification pour les bactéries sont : une phase initiale de dénaturation (1min à 98°C) suivie de 35 cycles de 3 étapes : dénaturation (15s à 98°C), hybridation (15s à 60°C) et élongation (25s à 72°C). L'amplification se termine avec une phase d'élongation supplémentaire (15s à 98°C).

Les étapes d'amplification pour les levures sont : une phase initiale de dénaturation (5min à 98°C) suivie de 35 cycles de 3 étapes : dénaturation (15s à 98°C), hybridation (20s à 55°C) et élongation (20s à 72°C). L'amplification se termine avec une phase d'élongation supplémentaire (5min à 72°C).

Électrophorèse sur gel d'agarose

L'objectif est de vérifier l'amplification de l'ADN et la taille des fragments en le comparant à une référence de poids moléculaire (DNA Ladder, Promega, USA).

La préparation du gel se fait en mélangeant de l'agarose (Eurobio Scientifique, France) avec du tampon (TAE), le mélange est chauffé puis coulé et laissé refroidir. Le colorant de charge (Blue/Orange 6x, Promega, USA) et l'ADN sont déposés dans les puits. La cuve d'électrophorèse, rempli du tampon et du gel, est mise sous tension (30min à 100V). Une fois la migration réalisée, le gel est mis sous UV (BioDoc-Ti Imaging System, Cambridge, UK) afin de réaliser une photo de celui-ci.

Identification des souches isolées

Les plaques PCR sont envoyées à Eurofins (France) qui est un fournisseur international majeur de services de séquençage d'ADN. L'objectif est d'identifier les souches par la méthode de séquençage Sanger et de comparer à la base de données NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Meta-barcoding

Isolement des colonies

L'objectif de cette méthode est d'identifier la flore cultivable au cours de la fermentation dans le but de les utiliser comme inoculum lors de nouvelles fermentations. Pour ce faire, les trois répétitions de boîtes de Pétri utilisées lors des dénombrements des différentes modalités 1A, 4A et 5A (les modalités avec 10% de marc ; 20% de marc ; 10% de marc + 25% de jus) et dont les colonies sont comptables (entre 30 à 150 colonies) ont été sélectionnées. De l'eau physiologique (2ml) a été versé dans chacune des boîtes d'où le maximum de microorganismes a été raclé. Les bactéries et levures ont été récupérées séparément dans des tubes stériles. Ceux-ci ont été stockés à -20°C avant l'extraction.

Extraction de l'ADN et séquençage

Un kit d'extraction FastDNA SPIN Kit (Mp Biomedicals, France) a été utilisé. Dans un tube Lysing Matrix, l'échantillon et du tampon CLS-TC ont été mélangés. Ensuite, le broyage est réalisé sur FastPrep (MP Biomedicals™, France) avec les paramètres suivants : deux fois 20 secondes à 6 m/s. Un témoin d'extraction est ajouté à la série.

Après centrifugation (5min à 14000g), le surnageant est récupéré dans un tube dans lequel du tampon DES est ajouté. Le tout est incubé 30 minutes à 55°C et ensuite, centrifugé avant d'être stocké à -20°C.

Séquençage

Le dosage se fait sur Nanoquant et Qubit afin d'estimer la concentration des microorganismes présents. Une PCR est ensuite effectuée pour les bactéries et levures. Pour les levures les kits « Ligation Sequencing Kit » et « PCR Barcoding Expansion » ont été utilisés et pour les bactéries, le kit « 16S Barcoding Kit » a été utilisé.

Le séquençage a été réalisé en dehors du cadre de cette étude. Les résultats n'ont pas encore été obtenus à cette date.

3.2.4. Biochimie

Dosage des pectines

L'objectif du dosage de pectines est d'estimer la teneur en pectines dans le marc avant et après fermentation pour ainsi observer la consommation possible des pectines par les microorganismes d'intérêt.

Le marc de pomme est dilué au 40^e dans de le tampon d'extraction EDTA (0,05M à pH 10). Les tubes sont ensuite mis au bain marie (55°C durant 1h). Après centrifugation à 4000rpm durant 10min, le surnageant est récupéré est prêt à être analysé à l'aide d'une gamme étalon préalablement définie. Les analyses de pectines ont été effectuée sur le marc de la fermentation 1 et 2 à t0 (temps initial) à raison de six répétitions réparties sur deux jours et sur les marcs à tf (temps final) des répétitions A des cinq premières modalités.

A pH basique, l'acide galacturonique permet une l'extraction de pectines méthylées. Les pectines non méthylées sont alors obtenues à l'aide de l'EDTA 0,05M. Ensuite, en milieu acide fort et chaud, une hydrolyse se produit à l'aide d'un acide sulfurique 97% à 98°C. La déshydratation interne avec cyclisation des oses va produire un composé furfuralique qui sera coloré suite à la réaction avec du 3-phényl-phénol (MHDP), qui est un composé aromatique réagissant avec les fonctions carboxyle des acides uroniques. La mesure se fait à l'aide d'un spectrophotomètre « Skalar » (*figure 10*).



Figure 10 : appareil de dosage des pectines "SKALAR"

Dosage de la patuline

L'objectif du dosage de la patuline est d'observer la contamination ou non des pommes. Si c'est le cas, une possible réduction de cette toxine par la fermentation est évaluée en effectuant le dosage sur les vinaigres en fin de préparation.

Le dosage de la patuline est réalisé après l'étape d'extraction. Pour ce faire, de la pectinase et de l'eau distillée ont été ajoutées et laissées agir durant 24h car la pectine se complexe avec la patuline.

Après cela, les tubes sont centrifugés à 4500rpm durant 5min à température ambiante. Le mélange de solvant acétate d'éthyle/hexane (60/40) et du bicarbonate de soude ont ensuite été ajoutés et agités durant 10 min. Après centrifugation, du sulfate de sodium est ajouté dans le surnageant récupéré puis le tout a été mis sous flux d'azote à 40°C. La solution ainsi concentrée est mise dans un bain à ultra-son et ensuite, filtré à 0,45 µm et transférée dans un vial.

La séparation et identification s'est fait par HPLC et la quantification par un détecteur UV (à 277nm).

Dosage des glucides et des acides organiques

La matière première

L'objectif est de caractériser la matière première (marc et jus de pomme) afin d'évaluer la quantité de sucres fermentescibles disponibles pour la fermentation.

Pour ce faire, deux méthodes d'extraction du marc de pomme ont été testées. La méthode 1 a été réalisé avec du marc non lyophilisé issu de la première fermentation. Celui-ci a été dilué au 5^e dans une solution sulfurique 1%, mélangé et agité durant 1h en rotation. Le surnageant a ensuite été filtré (0,45µm) et transféré dans des vials et mis à l'HPLC-UV-RI (avec détecteur UV pour les acides organiques et RI pour les sucres). Les jus de pommes de la fermentation 1 et 2 ont également été filtrés et transférés dans les vials pour HPLC-UV-RI.

Les mesures ont été réalisées à l'aide de la Chromatographe Liquide à Haute Performance (ThermoFisher Scientific Ultimate 3000, Villebon sur Yvette, France) équipé d'une colonne Aminex HPX87H (Biorad, Hemel Hempstead, UK), d'un détecteur U.V. (210 nm) et réfractométrique. L'élution a été réalisée avec un débit de 0.6 mL/min d'acide sulfurique 5 mM, à 30 °C.

La méthode 2 a été réalisé sur du marc lyophilisé et non lyophilisé issu de la fermentation 1 et le marc non lyophilisé de la fermentation 2 dilué au 16^e dans de l'eau acidifiée (0.002M H2504) à 70°C. Le broyage s'est ensuite réalisé au FastPrep (MP Biomedicals™, France) à l'aide de billes (3 fois 20 secondes). Les tubes ont été mis à l'ultra-son durant 15min à 70°C et laissés agités en rotation durant 2h. Après centrifugation (10min à 15000 rpm), le surnageant a été

filtré (0,45µm) et transféré dans des vials pour HPLC-DC (ICS Dionex -500+ avec un détecteur conductimètre).

Les suivis de fermentations

Les suivis de la fermentations ont été réalisés par dosage quotidien des teneurs en disaccharide (saccharose) et en monosaccharides (glucose et fructose) qui sont fermentescibles par la flore d'intérêt. Les produits d'intérêt ; les acides organiques, principalement l'acide acétique et l'acide lactique sont également suivis tout le long de la fermentation. L'objectif est de suivre la consommation de la flore ainsi que d'atteindre 50g/L d'acide acétique afin d'obtenir un vinaigre.

Les mesures ont été réalisées sur le même appareil que la méthode 1 pour la matière première.

Le dosage a été effectué quotidiennement (en excluant les jours de week-ends). Avant chaque analyse, les échantillons ont été filtrés (0.45 µm) et mis dans des vials.

Profil aromatique

L'objectif de cette technique est de caractériser le profil aromatique des marcs utilisés lors de la fermentation 1 et 2 ainsi que du jus de la seconde fermentation. Les cinq modalités de la première fermentation ont également été différenciées via leur profil aromatique.

Tout d'abord, un travail d'optimisation a été effectué afin de déterminer quel était la méthode et la quantité à utiliser dans le cadre de ce travail. Pour ce faire, deux techniques ont été testées.

La première est la micro-extraction en phase solide (SPME) associée à une séparation par chromatographie en phase gazeuse (GC) et une identification par spectrométrie de masse (MS) ; le standard interne (1µl) a été ajouté manuellement (solution de 3-heptanol) à 1g d'échantillon.

La seconde méthode a été effectuée avec la DHS. La méthode DHS a été utilisée pour extraire les composés aromatiques à l'aide d'un échantillonneur automatique Gerstel (Gerstel, Mülheim an der Ruhr, Allemagne) et ensuite, La désorption et l'analyse ont été effectuées sur un GC-MS à l'aide d'un GC Agilent 7890B (Agilent Technologies, Santa Barbara, USA). Différentes quantités ont été testées ; 1g ; 0,5g ; 0,2g et 0,1g d'échantillon.

Après l'optimisation, 3 répétitions techniques ont été testées pour chacune des modalités 1 à 5 de la première fermentation ainsi que les répétitions biologiques (A, B et C).

3.2.5. Analyse statistique

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne et de l'écart-type. Lorsque cela est nécessaire, une ANOVA est réalisé avec un intervalle de confiance de 95% à l'aide du logiciel XLSSTAT.

4. Résultats et discussion

4.1. Caractérisation de la matière première

Les caractéristiques microbiologique et biochimique de la matière première jus et marcs sont représentés dans le tableau 2.

	Rendement d'extraction	Matière sèche	Analyses microbiologiques			Analyses biochimiques			
			Levures	Bactéries acétiques	Bactéries lactiques	Glucose	Fructose	Saccharose	Acide galacturonique
Unité	%	%	en log UFC/ml			en g/Kg pour le MP et g/L pour le jus			en mg/g
MP F1	19	17,3±0,6	4,6±0,8	4,5±0,0	5,4±0,8	13	49	12	14,18±1,22
MP F2	33	14,0±0,5	/	/	/	15	66	2	16,49±0,41
Jus F1	71	/	/	/	/	25	54	28	/
Jus F2	67	/	/	/	/	/	/	/	/

Tableau 2 : caractérisation de la matière première utilisée en fermentation 1 (F1) et 2 (F2) ; / : non analysé ou aberrants

Un rendement d'extraction de 71% de jus et 19% de marc a été obtenu pour la fermentation 1 et un rendement de 67/33 pour la fermentation 2. Dans la littérature, le rendement en jus peut s'élever jusqu'à 91% selon les techniques d'extraction : pressurage, extraction à froid ou à chaud ⁷⁶. Cela pourrait s'expliquer par l'intervalle de temps entre les deux extractions (environ trois mois). La peau plus dure engendré par le vieillissement de la pomme peut fournir moins de jus.

Le taux de matière sèche dans les pommes de la fermentation 1 est de 17,3±0,6 % et dans les pommes de la fermentation 2, il est de 14,0±0,5%. Cela pourrait expliquer le rendement plus haut obtenu pour les pomme de la fermentation 2. Dans la littérature, le taux de matière sèche est plus haut (25%) mais cela diffère selon la technique d'extraction utilisée et du rendement d'extraction ²¹.

Selon la littérature, les bactéries et levures sont présentes à des concentrations entre 3,6 à 7,1 log UFC/ml ²², ce qui semble correspondre aux valeurs obtenues. Néanmoins, dans l'étude précédente effectuée sur du MP des pommes bio du Super U de la variété *Golden delicious*, les concentrations en log UFC/ml des levures et bactéries étaient respectivement de 3 et 2,92 ; ce qui est nettement plus bas que les concentrations obtenues dans cette étude. Cela pourrait s'expliquer par le vieillissement de la pomme de plusieurs mois après la récolte bien qu'aucune étude n'a encore confirmé cela.

Comme cela a été mentionné dans la bibliographie, le MP contient 55g/kg de sucres tandis pour le MP F1, il contiendrait 75g/kg et le MP F2, 83g/kg. Dans l'étude précédente sur les pommes bio du Super U, des concentrations relativement plus hautes ont été obtenues soit : 28,3±0,1 g/L pour le glucose, 86,0±0,4 pour le fructose et 23,1±0,2 pour le saccharose.

Le jus de pommes de 12 variétés contient en moyenne 25,6±8,4 g/L de saccharose, 24,3±4,5 g/L de glucose et 70,3±8,7 g/L de fructose pour un total approximatif de 120g/L de sucre⁷⁷.

Les valeurs obtenues pour le jus de la F1 semblent cohérentes avec celles de la littérature sauf pour le fructose qui est censé avoir une concentration plus haute. Dans l'étude précédente effectuée sur les pommes bio du Super U, le jus de pommes fraîches *Golden delicious* contenait entre 37,7 et 44,9 g/L de saccharose, 17,1 et 20,9 g/L de glucose et 67,6 et 86,4 g/L de fructose, ce qui est relativement différents des valeurs obtenues. Cela pourrait s'expliquer par la différence de l'origine des pommes.

Le jus de la F2 a été analysé mais pas repris dans le tableau car dans un premier temps, le prélèvement a été effectué sur le surnageant du jus décanté, ce qui donnait un total de 30g/L de sucres. Lorsque l'homogénéisation a été effectuée, le taux de glucose et de saccharose a doublé mais un pic saturé de fructose ne permettant pas d'avoir la concentration de celui-ci. Et enfin, le jus homogène a été analysé avec un volume d'injection de 5µl au lieu de 20µl mais le taux de sucres était plus bas que lors de la première analyse. Les résultats sont disponibles en annexe mais ne seront pas repris dans cette étude. Le jus F2 et F1 est différents visuellement, le jus de la F1 était plus jaunâtre tandis que celui de la F2, marron. Le jus F2 semblait oxydé lors de l'étape de l'extraction de jus.

La quantité extraite varie selon le matériel végétal, à savoir l'espèce ou la variété, le type de tissu, le sol et les conditions climatiques de croissance ainsi que la maturité. Un autre facteur de quantification est la méthode de préparation et d'extraction (quantité de solvant utilisé, pH, température et temps de traitement). Selon tous ces facteurs, la quantité de pectine dans le marc de pomme peut aller de 2,5 à 33,2% ²⁸. La variété *Golden delicious* fait partie des variétés contenant le moins de pectines, la concentration en pectines est de 0,5% dans la pomme en entier et de 3,03% de matière sèche ⁷⁸. Les résultats sont cohérents avec la littérature, étant donné que 1,4 et 1,7% de pectines ont été dosés dans les MP F1 et 2 respectivement.

4.2. Evolution de la flore microbienne

Dénombrement

Temps (jour)	Modalité	Levures	Bactéries acétiques	Bactéries lactiques
10	1	6,6±1,1	8,0±1,1	7,9±1,1
	2	6,3±0,7	8,5±1,3	7,4±0,8
	3	6,3±0,7	7,6±0,9	7,3±0,8
	4	6,7±0,9	8,0±1,0	7,8±0,0
	5	6,2±0,7	8,3±1,2	8,0±0,0
21	1	5,4±0,8	7,8±1,0	7,8±0,8
	2	5,3±0,0	7,5±1,3	7,5±1,3
	3	6,0±0,2	7,4±1,2	7,5±1,4
	4	6,1±0,1	7,8±1,0	7,7±0,9
	5	6,1±1,1	5,3±1,2	7,4±0,8
Littérature vinaigre de pomme*		3	6	5

Tableau 3 : Dénombrement en log UFC/ml pour les préparations de vinaigre des modalités 1 à 5

Les bactéries lactiques au jour 21, sont de l'ordre de 7 log UFC/ml alors que dans la littérature, elles sont d'environ 5 log UFC/ml dans un vinaigre de pomme (tableau 3).

Le nombre d'AAB dans les vinaigres de pomme est généralement d'environ 6 log UFC/mL ⁷⁹, ce qui n'est pas le cas dans ces résultats, néanmoins, elles peuvent être sélectives d'une souche à l'autre ⁸⁰ et réagissent donc différemment selon le substrat. Il est à remarquer qu'il y a 100 fois moins de bactéries acétiques dans la modalité 5 au jour 21 alors qu'il y a plus de substrat que dans les autres modalités grâce à l'ajout de 25% de jus.

Pour les levures, elles sont censées être d'environ 3 log UFC/ml mais dans ces résultats, elles sont de l'ordre de 5 log UFC/ml pour les modalités avec 10% de marc de pomme (1 à 3 au jour 21) et de l'ordre de 6 log UFC/ml pour les modalités avec 20% de marc et 25% de jus respectivement.

Par ailleurs, les microorganismes suivent la tendance de croissance des microorganismes qui débute par la phase de latence où la vitesse de croissance est nulle (jour 0). Ensuite, vient la phase d'accélération où les bactéries commencent à se multiplier pour atteindre progressivement la vitesse maximum de croissance à la phase exponentielle (jour 10). Et enfin, arrive la phase de décélération jusqu'à la phase stationnaire où se produit une décroissance de population microbienne (jour 21) ⁸¹.

Temps (jour)	Modalité	Levures	Bactéries acétiques	Bactéries lactiques
1	6	4,4±0,1	6,0±1,6	6,9±1,7
	7	4,9±0,6	7,9±0,8	6,4±0,2
	8	4,4±0,1	7,8±1,1	6,2±1,7
	9	4,5±0,5	7,7±0,9	6,1±1,7
10	6	5,2±1,3	7,0±1,3	7,1±1,6
	7	4,9±1,4	7,2±0,9	7,1±1,7
	8	5,2±1,3	7,5±0,8	7,2±1,4
	9	5,2±1,7	6,0±0,5	7,2±1,5
Littérature vinaigre de pomme*		3	6	5

Tableau 4 : dénombrement en log UFC/ml pour les préparations de vinaigre des modalités 6 à 9

Lors du dénombrement au jour 1 et 10, aucune réelle évolution n'a été observée et les bactéries lactiques semblent prendre le dessus sur les autres souches (tableau 4).

Concernant les modalités 10 et 11, après comptage sur boîte de Pétri, la concentration initiale de levure était de 8±1 log UFC/ml et celle de bactéries acétique de 6±0,3 log UFC/ml.

La concentration de levures alorsensemencée est de 6 log UFC/ml et celle de bactéries acétiques de 4 log UFC/ml. La concentration de départ des bactéries lactiques est de 6 à 7 log UFC/ml.

Les levures

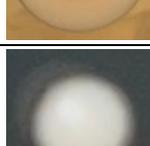
Levure	Récurrence	Photo de la colonie
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Au jour 0 uniquement	
<i>Candida intermedia</i>	Au jour 0 et 10	
<i>Metschnikowia sp.</i>	Au jour 0 uniquement	
<i>Pichia sp. ou Saturnispora silvae</i>	Au jour 10 et 21	
<i>Zygoascus meyeræ</i>	Au jour 10	
<i>Pichia fermentans</i>	Au jour 10 et 21	
<i>Hanseniaspora pseudoguilliermondii</i>	Au jour 10	
<i>Zigosaccharomyces bailii</i>	Au jour 21	

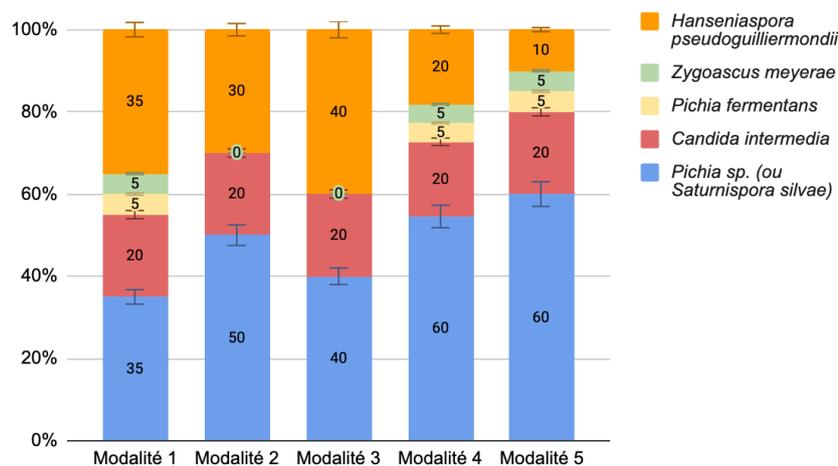
Tableau 5 : levures isolées en début (jour 0), milieu (jour 10) et fin de fermentation 1 (jour 21)

Les espèces *Metschnikowia pulcherrima* et *Metschnikowia sp.* ont été isolées qu'à partir du MP (tableau 5). *Metschnikowia pulcherrima*, aussi connue sous le nom de *Candida pulcherrima* est une espèce de levure présente naturellement dans la pomme et utilisée pour la fermentation du moût en cidre⁸².

Bien que les principales levures présentes lors de la fermentation alcooliques sont du genre *Saccharomyces* (*Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lachancea cidri*, *Dekkera anomala* et *Hanseniaspora valbyensis*)⁶⁶, d'autres espèces non-*Saccharomyces* peuvent être

répertoriés lors de la fermentation alcoolique : *Candida railenensis*, *Candida cylindracea*, *Hanseniaspora meyeri*, *Hanseniaspora pseudoguilliermondii*, *Metschnikowia sinensis* et *Kloeckera apiculata*⁸², des genres : *Candida*, *Hansenula*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Metschnikowia* et *Pichia*⁵⁶. Généralement, ces levures ne sont présentes que dans les phases initiales de la fermentation. Cependant, lorsque la fermentation est lente, sans aucun ajout et avec un taux de sucre initial inférieur à 110g/L, un faible rendement d'alcool permet la présence de ces levures en fin de fermentation⁵⁶. L'espèce *Metschnikowia pulcherrima* est connue pour sa forte activité enzymatique et est capable de produire des esters aromatiques et de l'acide pulcherriminique pendant la fermentation⁸³.

Proportion des espèces de levures au jour 10 selon la modalité



Proportion des espèces de levures au jour 21 selon la modalité

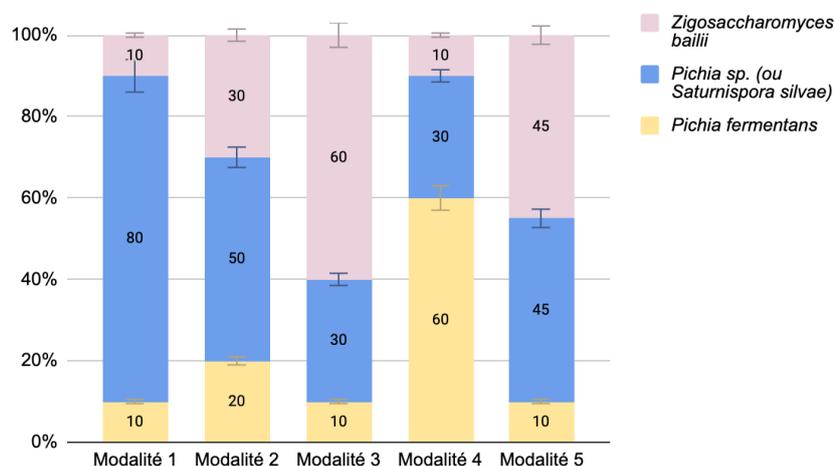


Figure 11 : proportion des espèces de levures dans les modalités 1 à 5 en milieu (jour 10) et fin de fermentation (jour 21)

Pichia sp. ou Saturnispora silvae est l'espèce majoritaire dans toutes les modalités au jour 10 et 21 (figure 11). *Pichia fermentans* est présente en plus faible quantité dans les deux cas, elle s'est néanmoins, plus développée dans la modalité 4 contenant 20% (au lieu de 10% dans les autres). En revanche, les espèces *Hanseniaspora pseudoguilliermondii*, *Zygoascus meyerae*, *Candida intermedia* n'ont été isolées qu'au jour 10 tandis que *Zigosaccharomyces bailii* a été isolée uniquement au jour 21.

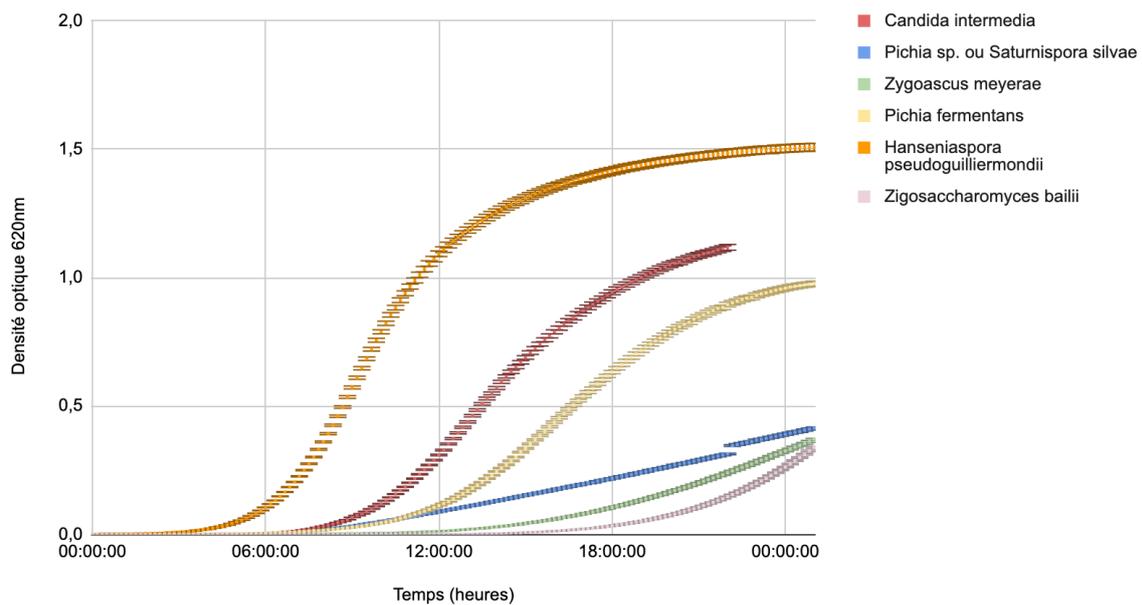


Figure 12 : courbe de croissance des différentes espèces de levures au selon la densité optique

Selon le suivi de croissance effectué (figure 12), *Hanseniaspora pseudoguilliermondii* est l'espèce qui atteint un taux de croissance maximal le plus rapidement. C'est une espèce clé dans la fermentation du cidre car elle affecte sa composition aromatique. Au fur et à mesure de la fermentation, la pollution décroît⁸⁴. Du même genre, *Hanseniaspora uvarum* est le plus grand producteur d'acétate d'hexyle et d'isoamyle parmi les levures non-Saccharomyces⁵⁴.

Zigosaccharomyces bailii, espèce isolée qu'au jour 21 a le taux de croissance le plus long, son début de croissance débute qu'après un jour (00h00 = 24h00). C'est l'organisme le plus résistant aux conservateurs connu, capable de résister à des concentrations élevées d'acide acétique et d'éthanol, cela pourrait expliquer sa présence en fin de fermentation. *Z. bailii* a été décrit comme fructophile, fermentant préférentiellement le fructose en glucose⁸⁵.

Pichia sp. ou Saturnispora silvae et *Zygoascus meyerae* ont des taux de croissances aussi bas. La co-inoculation de *S. cerevisiae* avec *Z. meyerae* dans un moût de raisin a montré une production plus élevée d'alcool isoamylique et d'esters éthyliques⁸⁶. *Zygoascus meyerae* pourrait être un producteur d'acide hexanoïque⁸⁷. *Pichia fermentans* est une espèce dominante retrouvée à la surface des pommes⁶⁶ comme *Candida sake*⁶⁶.

Candida intermedia est un bon producteur d'éthanol. Les espèces ayant produit plus de 18g/L d'éthanol après 134h de fermentation à 30°C à partir de 75.5g/L de sucre fermentescible sont *Candida intermedia* et *Zigosaccharomyces bailii*. Pour *Candida intermedia*, tout le fructose n'avait pas été consommé (Les résultats complets de l'analyse se trouvent à l'annexe 1).

Les bactéries

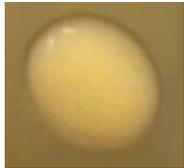
Bactérie	Type de bactérie	Récurrence	Photo de la colonie
<i>Lactobacillus plantarum</i>	LAB	Au jour 10 et 21	
<i>Gluconobacter oxydans</i>	AAB	Au jour 0, 10 et 21	
<i>Gluconobacter frateurii</i> ou <i>japoniticus</i>	AAB	Au jour 10 et 21	

Tableau 6 : bactéries lactiques et acétiques majoritaires isolées lors de la fermentation 1

Les souches isolées à partir du MP sont *Klebsiella aerogenes*, *Cronobacter sakazakii*, *Pantoea agglomerans* et *Lelliottia amnigena*. Ces bactéries provoquent des infections et peuvent être considérés comme des agents pathogènes. Ce sont des bactéries opportunistes qui colonisent la surface de différents végétaux⁸⁸. Elles n'ont pas été reprises dans le tableau 6 car elles n'interviennent pas dans la fermentation. Des souches Acétobacter sont normalement présentes dans le MP⁸⁹ mais elles n'ont pas été isolées.

Lors de la production de vinaigre, la croissance des LAB n'affecte pas l'activité des AAB mais elle peut affecter la croissance des levures, ce qui peut contribuer de manière significative à la qualité du vinaigre. En outre, les populations de LAB contribuent également à une teneur considérable en acide lactique dans le vinaigre, ce qui peut favoriser un goût doux en modérant l'aigreur de celui-ci¹⁵.

Une seule espèce de LAB a été isolée, *Lactobacillus plantarum*. Celle-ci est homofermentative, c'est-à-dire qu'elle produit 2 moles d'acide lactique à partir d'une mole de glucose⁹⁰.

Lors de la production de vinaigre, seuls deux genres d'AAB sont principalement impliqués : *Gluconobacter* et *Acetobacter*. Les espèces *Gluconobacter* sont toujours impliquées dans l'acétification précoce car elles oxydent le glucose plus fortement que l'éthanol, et leur rôle principal est l'oxydation du glucose en acide gluconique et en éthanol, même dans des conditions d'alcool et d'acidité élevées¹⁵.

La présence assez soutenue de *Lactobacillus plantarum* et de *Gluconobacter oxydans*, deux espèces consommant le glucose, peut expliquer la concurrence avec les levures pour le substrat.

4.3. Biochimie

Dosage de la patuline

Aucune détection de la patuline n'a été observée dans le marc de pommes en début de fermentation (avec un seuil de détection de 50 µg/L). Il n'a donc pas été nécessaire de la doser en fin de fermentation.

Dosage des pectines

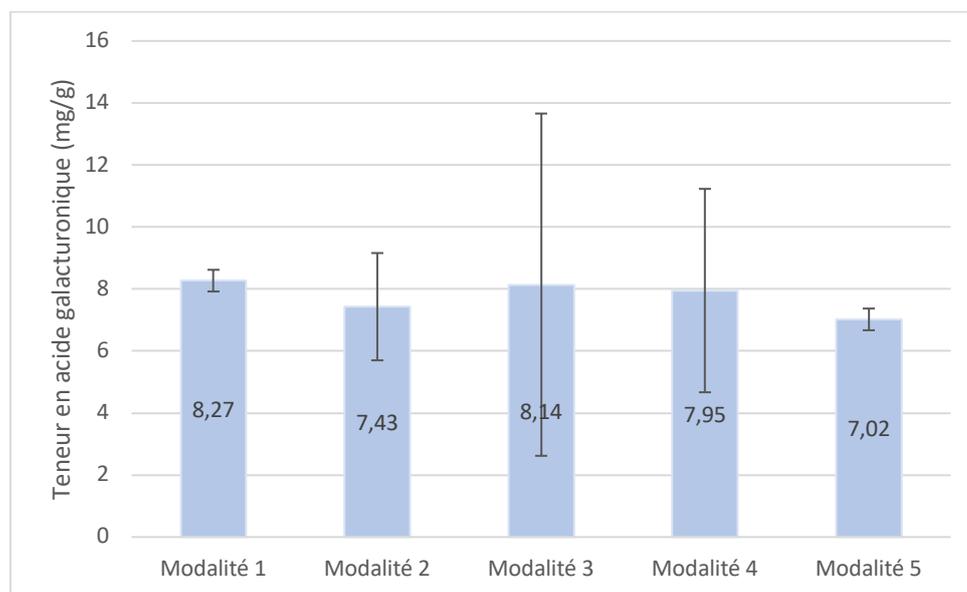


Figure 13 : teneur en acide galacturonique dans les marcs récupérés à la fin de fermentation 1

Aucune différence significative (*figure 13*) n'a été observée entre les modalités 1, 2, 3 et 4 sauf pour la modalité 1 (à 10% de MP) et la modalité 5 (à 10% de MP et 25% de jus) ($p \leq 0,05$).

Étant donné que la concentration initiale du marc F1 est de $14,18 \pm 1,22$ mg/g, une légère diminution a été observée mais toutes les pectines n'ont pas été consommées, cela est probablement dû à la consommation des pectines par les microorganismes excréant des enzymes pectolytiques présents chez les végétaux⁹¹. A partir de ces résultats, les nouvelles fermentations impliquant des pectinases ont été mises en place (modalité 8 et 9).

Profil aromatique

Le MP de la fermentation 1 (F1) et 2 (F2) ont été comparé à la DHS-GC. Dans le MP F1, la présence d'acide acétique a été observée tandis que dans le MP F2, non. Bien que le MP F1 ait été conservé au congélateur et ensuite au frais, il a été analysé que 2 mois plus tard tandis que le MP F2 a été analysé le jour-même de son extraction. Une hypothèse selon laquelle une fermentation du MP F1 aurait eu lieu a été émise. D'autres molécules issues d'une fermentation comme l'ethyl-acetate le 3-methyl-1-butanol et l'acétoïne sont présente dans le

MP F1 et non dans le MP F2, ce qui pourrait confirmer la fermentation du MP F1 (l'ensemble des molécules identifiées dans les deux MP se trouvent à l'annexe 2).

La seconde hypothèse serait qu'avec la maturité, les pommes changent de profil aromatiques et que les concentrations en alcools augmenteraient³⁹ (la molécule 1-butanol dans le MP F1 largement supérieur à celle dans le MP F2).

Concernant les cinq premières modalités, différentes molécules ont été répertoriées mais les concentrations de ces molécules : acide 2-methyl-propanoïque, acide butanoïque, acide 3-methyl-butanoïque, farnescene, acide hexanoïque, acide octanoïque, thymol et acide decanoïque sont très faibles. Des comparaisons entre les modalités n'ont donc pas été possibles.

Concernant la concentration en acétoïne (*figure 14*), une différence significative entre la modalité 3 à 10% de MP et la modalité 5 à 10% de MP et 25% de jus ont été observées ($p>0,05$). L'ajout du jus peut expliquer la présence abondante de cette molécule car le jus contient une grande proportion des composés aromatiques de la pomme⁷⁷.

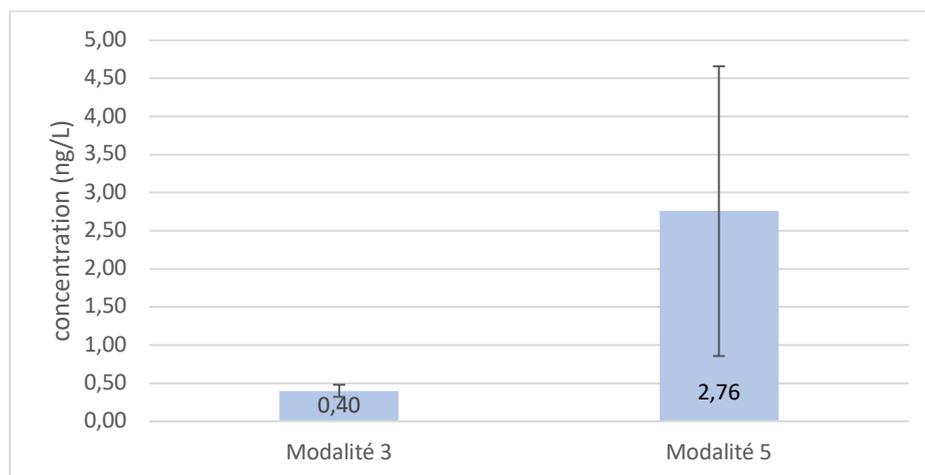
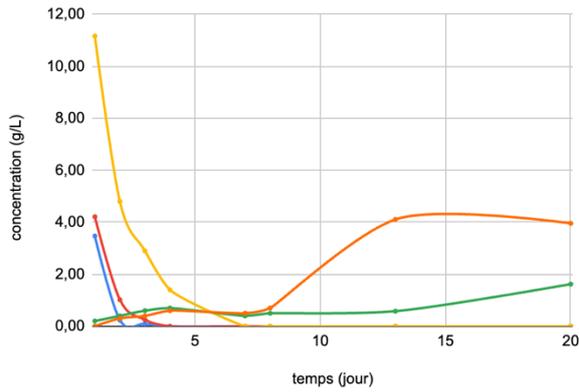


Figure 14 : concentration en acétoïne dans les modalités 3 et 5

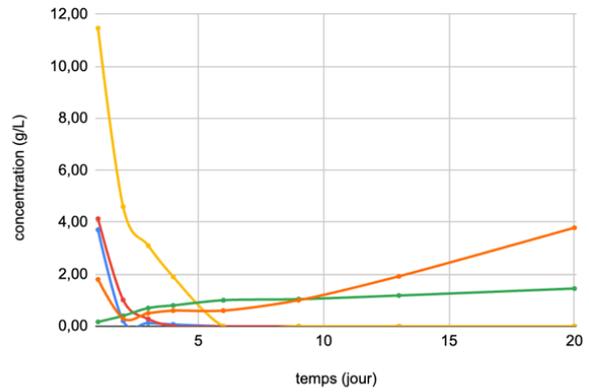
Dosage des glucides et des acides organiques

Lors de la fermentation 1, les trois répétitions biologiques de chacune des modalités ont été dosées. Une bonne répétabilité a été obtenue, à partir du jour 10, les mesures ont été effectuées que sur les répétitions A. Certains points aberrants dû aux problèmes rencontrés avec l'appareil HPLC ont été retirés pour faciliter l'observation.

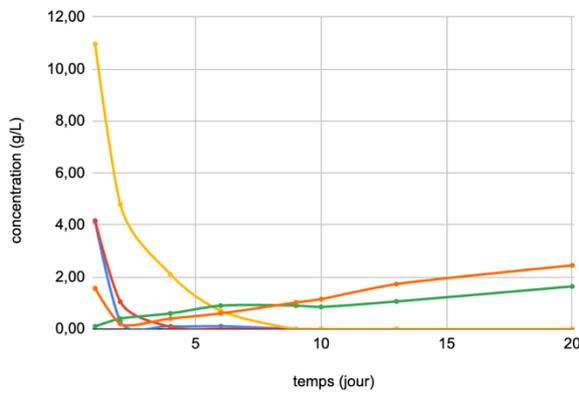
Modalité 1 (10% de MP)



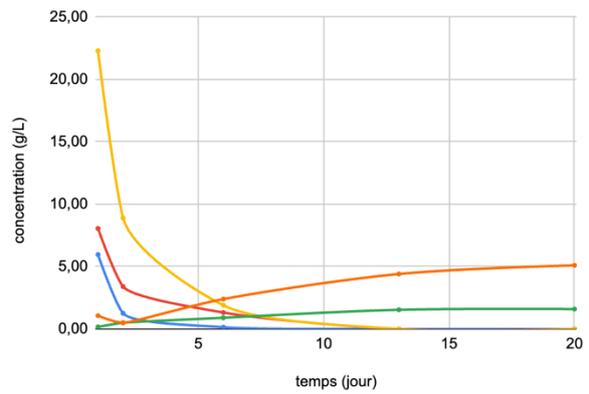
Modalité 2 (10% de MP)



Modalité 3 (10% de MP)



Modalité 4 (20% de MP)



Modalité 5 (10% de MP et 25% de jus)

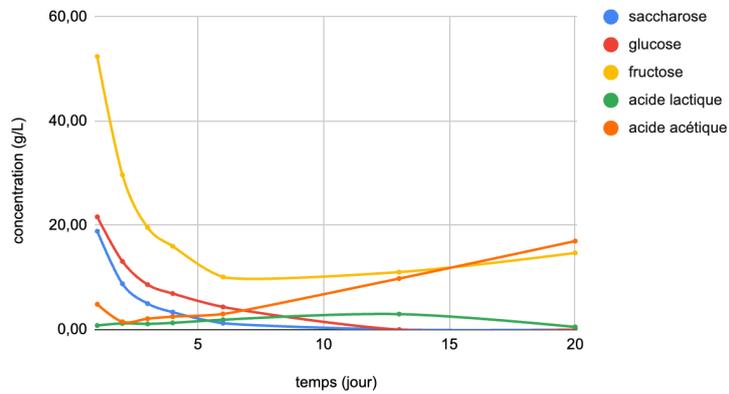


Figure 15 : évolution des sucres et des acides organiques des modalités de la fermentation 1

Modalités	[sucres] g/L de départ	[Acide acétique] g/L attendue	[Acide acétique] g/L obtenue
1	7,5	5,0	4,0
2	7,5	5,0	3,8
3	7,5	5,0	2,5
4	14,9	9,9	5,1
5	37,5	24,9	17,0

Tableau 7 : concentration en acide acétique attendue et obtenue en fin de fermentation dans chacune des modalités 1 à 5

Les concentrations en acide acétique attendues (tableau 7) ont été calculées sur base des équations stoechiométriques avec un rendement de 0,663g d'acide acétique par gramme de sucre fermentescible. Celles-ci n'ont pas été atteintes en fin de fermentation bien qu'il ne restait plus de sucres dans aucune des modalités. Dans la modalité 5, il restait du fructose mais ça n'aurait jamais atteint la concentration de 50g/L afin d'obtenir du vinaigre, c'est la raison pour laquelle il a été préférable de mettre en place de nouvelles modalités susceptibles de produire du vinaigre (fermentation 2).

Sur base de ces résultats, une hypothèse a été émise. Les bactéries lactiques auraient pris le dessus sur les autres souches étant donné qu'elles sont plus nombreuses et que production d'acide lactique pourrait interférer avec celle de l'acide acétique, ce qui a été confirmé par la présence de la souche *Lactobacillus plantarum* qui est homofermentative et donc consommatrice de glucose.

Les courbes d'évolution (figure 15) suivent la tendance suivante : une diminution des sucres fermentescibles signifiant que le substrat a été consommé par les microorganismes et une augmentation des acides acétiques et lactiques montrant une production de ceux-ci.

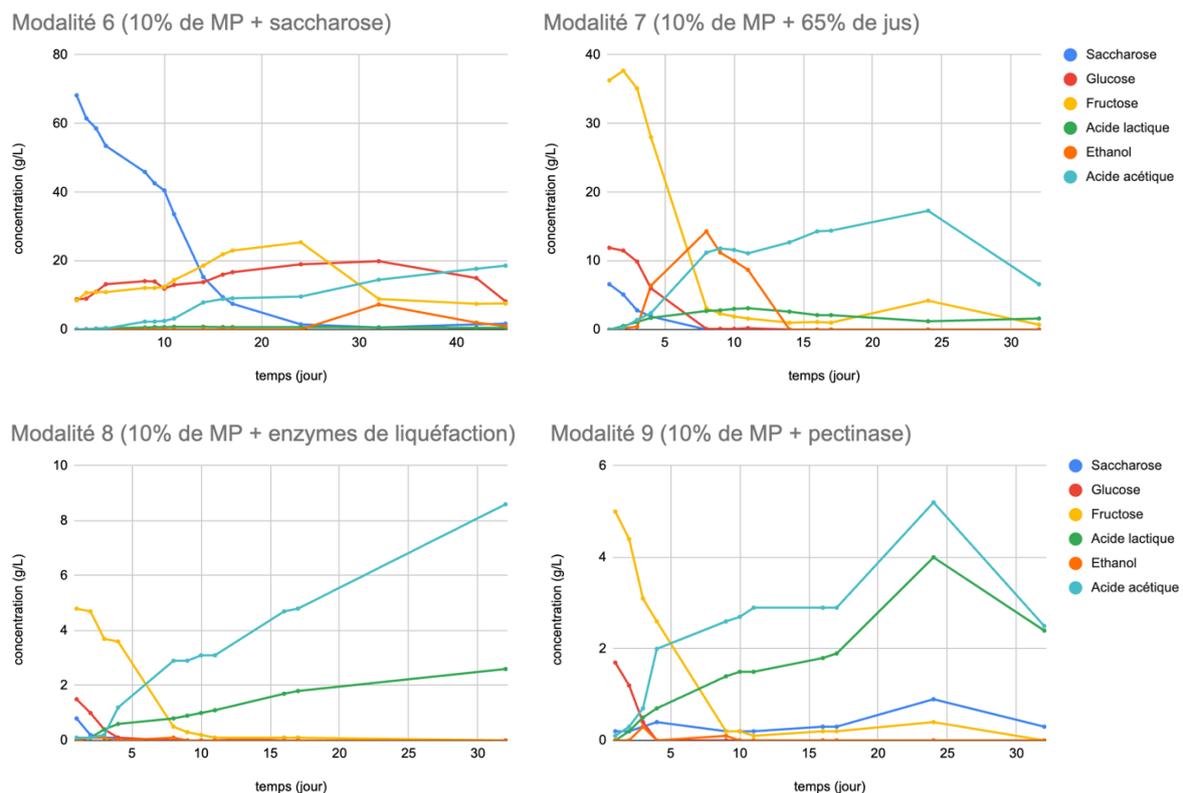


Figure 16 : évolution des sucres et des acides organiques des modalités de la fermentation 2

Après plus d'un mois de fermentation, aucune des modalités ne peut être appelée « vinaigre » car les concentrations en acide acétiques voulue n'ont pas été atteintes malgré l'ajout de sucres et de jus dans les modalités respectives 6 et 7.

L'évolution des sucres (figure 16) suit même tendance que lors de la fermentation 1. Les concentrations en fructose et glucose peuvent varier à la suite de la dégradation du saccharose en fructose et glucose. Quant à la production d'éthanol, elle augmente lors de la

fermentation alcoolique (les premiers jours) lorsque les sucres diminuent puis elle diminue lors de la fermentation acétique afin de produire de l'acide acétique.

Malgré la présence de substrat de plus de 75,5g/L, les souches endogènes n'ont pas permis d'obtenir une concentration finale attendue d'acide acétique de 50g/L. Deux souches commerciales (*Saccharomyces Cerevisiae* et *Acétobacter pasteurianus*) ont été testées sur le MP de six mois post-récolte utilisé lors de la fermentation 1 (MP F1) et le MP de neuf mois post-récolte utilisé lors de la fermentation 2 (MP F2).

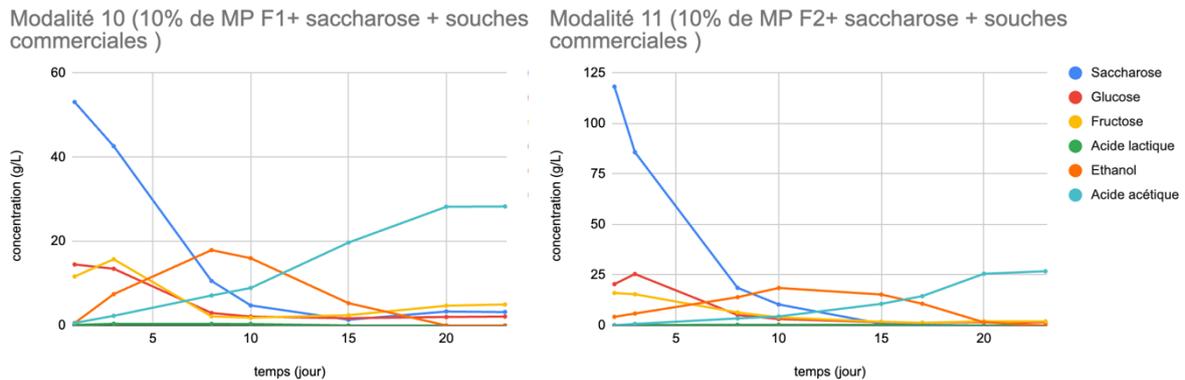


Figure 17 : évolution des sucres et des acides organiques des modalités de la fermentation 3

Au bout de 23 jours, des concentrations de 28,3g/L et de 26,8g/L d'acide acétique dans les modalités respectives 10 et 11 ont été atteintes (*figure 17*), ce n'est pas suffisant pour avoir l'appellation du vinaigre mais ça s'annonce prometteur.

5. Conclusion et perspectives

A l'issu de ce travail de recherche, l'objectif principal d'obtenir du vinaigre à partir du marc de pomme n'a pas été atteint. Néanmoins, plusieurs avancées ont été réalisées.

Le protocole de mise en place a été optimisé avec différents paramètres, à savoir la détermination de la source des pommes (fournisseur local), différents milieux de cultures pour la croissance des bactéries acétiques ont été testés et différents paramètres ont été testés (quantité de MP, quantité de jus, récipient et agitation). Au niveau des récipients, les fermentations à l'échelle industrielle sont réalisées dans des cuves avec un grand espace de tête et qui sont aérées continuellement¹⁷ durant plusieurs mois. Il serait donc intéressant d'inclure un paramètre d'oxygénation et de faire une nouvelle modalité sans aucune agitation.

Le projet AWP a finalement été axé sur le marc de pomme de la variété *Golden delicious* qui semble être un coproduit prometteur pour la revalorisation à la place des écarts de tri de pommes. Le marc de pomme a été caractérisé de manière précise et complète. Dans le cadre de cette étude, une multitude d'analyses physicochimiques et microbiologiques ont permis d'écarter des pistes et de mettre en œuvre de nouvelles modalités sur base des résultats d'autres modalités. Au total, 11 modalités ont été testées.

A l'issu de ces résultats, il a été conclu que la quantité de sucres fermentescibles dans le marc n'était pas suffisante et qu'un ajout de sucre était nécessaire. L'ajout de substrat peut se réaliser via du saccharose pur ou par ajout de jus de pomme mais la valorisation du coproduit de l'extraction du jus n'aurait plus réellement de sens si le jus extrait est aussi utilisé. D'autres écarts de tri de pomme pourrait être impliqués comme les sous-produits de la production de compotes (pelures et trognons) ou des pommes hors calibres qui ne sont pas acceptées sur le marché⁹².

Les souches endogènes du MP avec un potentiel de production optimale ont été identifiées et caractérisées. A la place des souches commerciales, les souches endogènes ayant le potentiel de production d'éthanol le plus haut peuvent être utilisées comme starters lors de prochaines fermentations. Il serait intéressant d'isoler d'autres souches endogènes du genre *Saccharomycès* car il est considéré comme l'un des meilleurs producteurs d'éthanol⁹³.

L'ajout des souches de levures et de bactéries acétiques pourraient se faire en deux temps. Dans un premier temps, les starters de levures pourraient être ajoutés afin de mener à bien la fermentation alcoolique. A la fin de celle-ci, les bactéries acétiques pourraient être ajoutées afin de permettre la fermentation acétique. Cela pourrait éviter une compétition entre les différentes souches amenant à un ralentissement voire à l'arrêt de la fermentation.

Les suivis de fermentation ont été réalisés sur du milieu liquide Sabouraud auquel du saccharose a été ajouté. La prochaine étape intéressante serait de tester ces souches sur milieu réel et si elles fonctionnent indépendamment les unes des autres ou qu'elles forment un complexe microbiologique. En plus de cela, il serait intéressant de déterminer leur taux de croissance maximal et les paramètres optimaux de ces souches en milieu synthétique en fonction de facteurs environnementaux (temps, température, dioxygène, éthanol et acide

acétique) afin de déterminer quels paramètres seraient susceptibles de ralentir voire arrêter la fermentation. Avant cela, une modélisation du système pourrait être intéressante.

En conclusion, le vinaigre requière un processus de fabrication chronophage et sensible aux variations des différents paramètres impliqués.

6. Contribution personnelle de l'étudiante

Dès le mois de janvier, l'étudiante a réalisé une étude bibliographique approfondie sur le sujet. En début février, l'étudiante s'est rendue au Maroc à L'École Nationale d'Agriculture de Meknès (ENA) afin de récupérer de la matière première issue du Maroc et réaliser certaines analyses préliminaires au sein de l'établissement.

Avec l'aide de son encadrante Ingrid Collombel et ses condisciples Joël Grabulos, Jean-Christophe Meile et Vincent Chochois, les objectifs de recherches ainsi que la constitution d'un plan expérimental ont été réalisés.

Lors du dernier mois de travail, l'étudiante a pu bénéficier de l'aide de l'étudiante en BTS biotechnologies Samira Sahli, avec laquelle différentes analyses physicochimiques et microbiologiques, lors de la deuxième fermentation, ont été réalisées.

Les résultats ont été analysés de manière hebdomadaire avec l'encadrante et de manière mensuelle avec l'équipe. Lorsque cela était nécessaire, le plan expérimental a été ajusté et de nouveaux plans expérimentaux étaient mis en place sous la supervision de l'encadrante.

7. Bibliographie

1. Ghinea, C., Prisacaru, A. E. & Leahu, A. Physico-Chemical and Sensory Quality of Oven-Dried and Dehydrator-Dried Apples of the Starkrimson, Golden Delicious and Florina Cultivars. *Appl. Sci.* **12**, 2350 (2022).
2. Patocka, J. *et al.* Malus domestica: A Review on Nutritional Features, Chemical Composition, Traditional and Medicinal Value. *Plants* **9**, 1408 (2020).
3. Skinner, R. C., Gigliotti, J. C., Ku, K.-M. & Tou, J. C. A comprehensive analysis of the composition, health benefits, and safety of apple pomace. *Nutr. Rev.* **76**, 893–909 (2018).
4. Kelly Wolfe, Xianzhong Wu, and Rui Hai Liu. Antioxidant Activity of Apple Peels | Journal of Agricultural and Food Chemistry. https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jf020782a?casa_token=WQ7elxweDJIAAAA%3ACU3dxzuX8RW9zxZgSUCmYwfHpPLZle8PCMkPRm3lkd5TpMJ3XmWsCEFGsVLujkujh4EoN9attWcYDcx (2003).
5. Leroy, A.-M. & Zelter, S.-Z. RECHERCHES SUR L'EFFICACITÉ ALIMENTAIRE DES MARCS DE POMME FERMIERS. III. - EFFET DE LA CONSOMMATION D'UN MARC DE POMME ENSILÉ SUR LA CROISSANCE DU PORC. INCIDENCES SUR L'UTILISATION NUTRITIVE DE LA RATION. *Ann. Zootech.* **3**, 109–124 (1954).
6. Launholt, T. L., Kristiansen, C. B. & Hjorth, P. Safety and side effects of apple vinegar intake and its effect on metabolic parameters and body weight: a systematic review. *Eur. J. Nutr.* **59**, 2273–2289 (2020).
7. Dabija, A. & Hatnean, C. A. Study concerning the quality of apple vinegar obtained through classical method. *J. Agroaliment. Process. Technol.* (2014).
8. Organization, W. H. Evaluation of certain food additives and contaminants: thirty-third report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives. *Eval. Certain Food Addit. Contam. Thirty-Third Rep. Jt. FAOWHO Expert Comm. Food Addit.* 64–64 (1989).
9. Wu, C. *et al.* Effects of lactic acid fermentation-based biotransformation on phenolic profiles, antioxidant capacity and flavor volatiles of apple juice. *LWT* **122**, 109064 (2020).
10. Drake, S. R. & Spayd, S. E. Influence of Calcium Treatment on 'Golden Delicious' Apple Quality. *J. Food Sci.* **48**, 403–405 (1983).
11. Eisele, T. A. & Drake, S. R. The partial compositional characteristics of apple juice from 175 apple varieties. *J. Food Compos. Anal.* **18**, 213–221 (2005).
12. Solieri, L. & Giudici, P. Vinegars of the World. in *Vinegars of the World* 1–16 (Springer, 2009).
13. Giudici, P., Gullo, M. & Solieri, L. Traditional Balsamic Vinegar. in *Vinegars of the World* (eds. Solieri, L. & Giudici, P.) 157–177 (Springer Milan, 2009). doi:10.1007/978-88-470-0866-3_10.
14. Slaa, J. Yeast and fermentation: the optimal temperature. in (2009).
15. Li, S., Li, P., Feng, F. & Luo, L.-X. Microbial diversity and their roles in the vinegar fermentation process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 4997–5024 (2015).
16. Wu, J. J., Ma, Y. K., Zhang, F. F. & Chen, F. S. Biodiversity of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in the fermentation of "Shanxi aged vinegar", a traditional Chinese vinegar. *Food Microbiol.* **30**, 289–297 (2012).
17. Yoshida, F. Chapter 1 - Aeration and Mixing in Fermentation. in *Annual Reports on Fermentation Processes* (ed. Tsao, G. T.) vol. 5 1–34 (Elsevier, 1982).
18. Luzón-Quintana, L. M., Castro, R. & Durán-Guerrero, E. Biotechnological Processes in Fruit Vinegar Production. *Foods* **10**, 945 (2021).
19. Sudha, M. L. Chapter 36 - Apple Pomace (By-Product of Fruit Juice Industry) as a Flour

Fortification Strategy. in *Flour and Breads and their Fortification in Health and Disease Prevention* (eds. Preedy, V. R., Watson, R. R. & Patel, V. B.) 395–405 (Academic Press, 2011). doi:10.1016/B978-0-12-380886-8.10036-4.

20. Moussaoui & Nassib, س. Comparaison des propriétés physicochimiques du vinaigre de pomme et de datte (Degla-Beida). (2019).

21. Zlatanović, S. *et al.* Functionality and Storability of Cookies Fortified at the Industrial Scale with up to 75% of Apple Pomace Flour Produced by Dehydration. *Foods* **8**, 561 (2019).

22. Al Daccache, M. *et al.* Impact of the Physicochemical Composition and Microbial Diversity in Apple Juice Fermentation Process: A Review. *Molecules* **25**, 3698 (2020).

23. Persic, M., Mikulic-Petkovsek, M., Slatnar, A. & Veberic, R. Chemical composition of apple fruit, juice and pomace and the correlation between phenolic content, enzymatic activity and browning. *LWT - Food Sci. Technol.* **82**, 23–31 (2017).

24. Salo, M.-L. & Korhonen, I. Carbohydrate and acid composition of some apple varieties. *Agric. Food Sci.* **44**, 63–67 (1972).

25. Nawirska, A. & Kwaśniewska, M. Dietary fibre fractions from fruit and vegetable processing waste. *Food Chem.* **91**, 221–225 (2005).

26. Rascón-Chu, A. *et al.* Pectin from low quality ‘Golden Delicious’ apples: Composition and gelling capability. *Food Chem.* **116**, 101–103 (2009).

27. Mahé, J. Modification chimique de la pectine : synthèse, caractérisations et applications en formulation galénique. (Bourgogne Franche-Comté, 2019).

28. Joslyn, M. A. & Deuel, H. The Extraction of Pectins from Apple Marc Preparations. *J. Food Sci.* **28**, 65–83 (1963).

29. Ackermann, Joerg., Fischer, Monica. & Amado, Renato. Changes in sugars, acids, and amino acids during ripening and storage of apples (cv. Glockenapfel). *J. Agric. Food Chem.* **40**, 1131–1134 (1992).

30. Müller-Maatsch, J. *et al.* Pectin content and composition from different food waste streams. *Food Chem.* **201**, 37–45 (2016).

31. Sylvie, B., Scibisz, I., Le Bourvellec, C. & Renard, C. Effect of Sample Preparation on the Measurement of Sugars, Organic Acids, and Polyphenols in Apple Fruit by Mid-infrared Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 3551–63 (2012).

32. Rajauria, G. & Tiwari, B. K. *Fruit Juices: Extraction, Composition, Quality and Analysis*. (Academic Press, 2017).

33. Belitz, H.-D., Grosch, W. & Schieberle, P. *Food Chemistry*. (Springer Science & Business Media, 2008).

34. Yamada, H., Ohmura, H., Arai, C. & Terui, M. Effect of Preharvest Fruit Temperature on Ripening, Sugars, and Watercore Occurrence in Apples. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **119**, 1208–1214 (1994).

35. Dimick, P. S., Hoskin, J. C. & Acree, T. E. Review of apple flavor — State of the art. *C R C Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **18**, 387–409 (1983).

36. VISAI, C., RIZZOLO, A. & VANOLI, M. Sviluppo delle sostanze volatili nelle mele durante la conservazione frigorifera. *Sviluppo Delle Sostanze Volatili Nelle Mele Durante Conserv. Frigorif.* **55**, 57–60 (1993).

37. Gorjanović, S. *et al.* Evaluation of Apple Pomace Flour Obtained Industrially by Dehydration as a Source of Biomolecules with Antioxidant, Antidiabetic and Antiobesity Effects. *Antioxidants* **9**, 413 (2020).

38. Brady, C. J. Fruit Ripening. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **38**, 155–178 (1987).

39. Mehinagic, E., Royer, G., Symoneaux, R., Jourjon, F. & Prost, C. Characterization of

- Odor-Active Volatiles in Apples: Influence of Cultivars and Maturity Stage. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 2678–2687 (2006).
40. Plotto, A., McDaniel, M. R. & Mattheis, J. P. Characterization of 'Gala' Apple Aroma and Flavor: Differences between Controlled Atmosphere and Air Storage. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **124**, 416–423 (1999).
 41. Hammer, T. J., Sanders, J. G. & Fierer, N. Not all animals need a microbiome. *FEMS Microbiol. Lett.* **366**, fnz117 (2019).
 42. Liu, J. *et al.* Apple endophytic microbiota of different rootstock/scion combinations suggests a genotype-specific influence. *Microbiome* **6**, 18 (2018).
 43. Abdelfattah, A., Wisniewski, M., Droby, S. & Schena, L. Spatial and compositional variation in the fungal communities of organic and conventionally grown apple fruit at the consumer point-of-purchase. *Hortic. Res.* **3**, 16047 (2016).
 44. Bösch, Y. *et al.* Dynamics of the Apple Fruit Microbiome after Harvest and Implications for Fruit Quality. *Microorganisms* **9**, 272 (2021).
 45. Abdelfattah, A. *et al.* Effect of Washing, Waxing and Low-Temperature Storage on the Postharvest Microbiome of Apple. *Microorganisms* **8**, 944 (2020).
 46. Tan, X. *et al.* The occurrence of *Listeria monocytogenes* is associated with built environment microbiota in three tree fruit processing facilities. *Microbiome* **7**, 115 (2019).
 47. Filannino, P., Di Cagno, R. & Gobbetti, M. Metabolic and functional paths of lactic acid bacteria in plant foods: get out of the labyrinth. *Curr. Opin. Biotechnol.* **49**, 64–72 (2018).
 48. Karadeniz, F. & Ekşi, A. Sugar composition of apple juices. *Eur. Food Res. Technol.* **215**, 145–148 (2002).
 49. Mattick, L. R. & Moyer, J. C. Composition of Apple Juice. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **66**, 1251–1255 (1983).
 50. Burroughs, L. F. The amino-acids of apple juices and ciders. *J. Sci. Food Agric.* **8**, 122–131 (1957).
 51. Melnyk, L., Bessarab, A. & Matko, S. Microbiological, Physico-Chemical and Organoleptic Parameters of Apple Juice, Processed by Shungite. (2013).
 52. Arroyo-López, F. N., Orlić, S., Querol, A. & Barrio, E. Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid. *Int. J. Food Microbiol.* **131**, 120–127 (2009).
 53. Boudreau IV, T. F., Peck, G. M., O'Keefe, S. F. & Stewart, A. C. Free amino nitrogen concentration correlates to total yeast assimilable nitrogen concentration in apple juice. *Food Sci. Nutr.* **6**, 119–123 (2018).
 54. Lorenzini, M., Simonato, B., Slaghenaufi, D., Ugliano, M. & Zapparoli, G. Assessment of yeasts for apple juice fermentation and production of cider volatile compounds. *LWT* **99**, 224–230 (2019).
 55. Morrissey, W. F., Davenport, B., Querol, A. & Dobson, A. D. W. The role of indigenous yeasts in traditional Irish cider fermentations. *J. Appl. Microbiol.* **97**, 647–655 (2004).
 56. Calugar, P. C. *et al.* An Overview of the Factors Influencing Apple Cider Sensory and Microbial Quality from Raw Materials to Emerging Processing Technologies. *Processes* **9**, 502 (2021).
 57. Schmid, T., Baumann, B., Himmelsbach, M., Klampfl, C. W. & Buchberger, W. Analysis of saccharides in beverages by HPLC with direct UV detection. *Anal. Bioanal. Chem.* **408**, 1871–1878 (2016).
 58. Carrín, M. E., Ceci, L. N. & Lozano, J. E. Characterization of starch in apple juice and its degradation by amylases. *Food Chem.* **87**, 173–178 (2004).

59. Lea, A. G. H., Lea, A. G. H. & Piggott, J. R. *Fermented Beverage Production*. (Springer Science & Business Media, 2003).
60. Ramos-Aguilar, A. L. *et al.* Physicochemical properties of apple juice during sequential steps of the industrial processing and functional properties of pectin fractions from the generated pomace. *LWT* **86**, 465–472 (2017).
61. Ye, M., Yue, T. & Yuan, Y. Evolution of polyphenols and organic acids during the fermentation of apple cider. *J. Sci. Food Agric.* **94**, 2951–2957 (2014).
62. Alberti, A. *et al.* Impact on chemical profile in apple juice and cider made from unripe, ripe and senescent dessert varieties. *LWT - Food Sci. Technol.* **65**, 436–443 (2016).
63. Ma, S. *et al.* Free amino acid composition of apple juices with potential for cider making as determined by UPLC-PDA. *J. Inst. Brew.* **124**, 467–476 (2018).
64. Padilla, B., Gil, J. V. & Manzanares, P. Past and Future of Non-Saccharomyces Yeasts: From Spoilage Microorganisms to Biotechnological Tools for Improving Wine Aroma Complexity. *Front. Microbiol.* **7**, (2016).
65. Alonso-Salces, R. M. *et al.* Chemometric characterisation of Basque and French ciders according to their polyphenolic profiles. *Anal. Bioanal. Chem.* **379**, 464–475 (2004).
66. Cousin, F. J. *et al.* Microorganisms in Fermented Apple Beverages: Current Knowledge and Future Directions. *Microorganisms* **5**, 39 (2017).
67. Pando Bedriñana, R., Mangas Alonso, J. J. & Suárez Valles, B. Evaluation of autochthonous *Saccharomyces bayanus* strains under stress conditions for making ice ciders. *LWT - Food Sci. Technol.* **81**, 217–225 (2017).
68. Morata, A. & Loira, I. *Yeast: Industrial Applications*. (BoD – Books on Demand, 2017).
69. Barnett, J. A. A history of research on yeasts 2: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850–1880. *Yeast* **16**, 755–771 (2000).
70. Guiné, R. P. F., Barroca, M. J., Coldea, T. E., Bartkiene, E. & Anjos, O. Apple Fermented Products: An Overview of Technology, Properties and Health Effects. *Processes* **9**, 223 (2021).
71. Morgan, J. & Shibeab, S. The Potential of Apple Cider Vinegar in the Management of Type 2 Diabetes. *J. Diabetes Res.* **5**, 129–134 (2016).
72. Ousaaïd, D. *et al.* Etude des paramètres physico-chimiques et de l'activité antioxydante de trois vinaigres de cidre traditionnels issus de trois variétés de pomme de la région de Midelt au Maroc. **10**, 37–50 (2021).
73. Ubeda, C. *et al.* Determination of major volatile compounds during the production of fruit vinegars by static headspace gas chromatography–mass spectrometry method. *Food Res. Int.* **44**, 259–268 (2011).
74. Yamada, T. M., Huong Thi Lan Vu, Yuki Muramatsu, Pattaraporn Yukphan, Somboon Tanasupawat, Yuzo Y. Systematics of Acetic Acid Bacteria. in *Acetic Acid Bacteria* (CRC Press, 2017).
75. Sengun, I. Y., Kilic, G., Charoenyingcharoen, P., Yukphan, P. & Yamada, Y. Investigation of the microbiota associated with traditionally produced fruit vinegars with focus on acetic acid bacteria and lactic acid bacteria. *Food Biosci.* **47**, 101636 (2022).
76. Tanner, H. Recherches Analytiques Sur Les Jus Obtenus Par Pressurage, Par Extraction À Froid Et À Chaud Des Marcs (système Dds) De Pommes De La Variété 'Golden Delicious'. *Ann. Nutr. Aliment.* **32**, 1103–1110 (1978).
77. Li, J., Zhang, C., Liu, H., Liu, J. & Jiao, Z. Profiles of Sugar and Organic Acid of Fruit Juices: A Comparative Study and Implication for Authentication. *J. Food Qual.* **2020**, e7236534 (2020).
78. Karakasova, L., Stefanoski, A., Rafajlovska, V. & Klopceska, J. TECHNOLOGICAL CHARACTERISTICS OF SOME APPLE CULTIVARS. *Acta Hortic.* 559–564 (2009)

doi:10.17660/ActaHortic.2009.825.89.

79. Torija, M. J., Mateo, E., Guillamón, J. M. & Mas, A. Identification and quantification of acetic acid bacteria in wine and vinegar by TaqMan–MGB probes. *Food Microbiol.* **27**, 257–265 (2010).
80. Gullo, M., Caggia, C., De Vero, L. & Giudici, P. Characterization of acetic acid bacteria in “traditional balsamic vinegar”. *Int. J. Food Microbiol.* **106**, 209–212 (2006).
81. Delhalle, L., Daube, G., Adolphe, Y., Crevecoeur, S. & Clinquart, A. Les modèles de croissance en microbiologie prévisionnelle pour la maîtrise de la sécurité des aliments (synthèse bibliographique). *BASE* (2012).
82. Lorenzini, M., Simonato, B. & Zapparoli, G. Yeast species diversity in apple juice for cider production evidenced by culture-based method. *Folia Microbiol. (Praha)* **63**, 677–684 (2018).
83. Escott, C. *et al.* Synergetic Effect of *Metschnikowia pulcherrima* and *Lachancea thermotolerans* in Acidification and Aroma Compounds in Airén Wines. *Foods* **11**, 3734 (2022).
84. van Wyk, N., Badura, J., von Wallbrunn, C. & Pretorius, I. S. Exploring future applications of the apiculate yeast *Hanseniaspora*. *Crit. Rev. Biotechnol.* **0**, 1–20 (2023).
85. Caballero, B., Trugo, L. & Finglas, P. Encyclopedia of food sciences and nutrition: Volumes 1-10. *Encycl. Food Sci. Nutr. Vol. 1-10* (2003).
86. Rollero, S., Bloem, A., Ortiz-Julien, A., Camarasa, C. & Divol, B. Altered Fermentation Performances, Growth, and Metabolic Footprints Reveal Competition for Nutrients between Yeast Species Inoculated in Synthetic Grape Juice-Like Medium. *Front. Microbiol.* **9**, (2018).
87. Larroque, M. N. *et al.* Effect of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* native yeasts on beer aroma compounds. *Int. J. Food Microbiol.* **337**, 108953 (2021).
88. Tindall, B. J., Sutton, G. & Garrity, G. M. *Enterobacter aerogenes* Hormaeche and Edwards 1960 (Approved Lists 1980) and *Klebsiella mobilis* Bascomb *et al.* 1971 (Approved Lists 1980) share the same nomenclatural type (ATCC 13048) on the Approved Lists and are homotypic synonyms, with consequences for the name *Klebsiella mobilis* Bascomb *et al.* 1971 (Approved Lists 1980). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **67**, 502–504 (2017).
89. Vashisht, A., Thakur, K., Kauldhar, B. S., Kumar, V. & Yadav, S. K. Waste valorization: Identification of an ethanol tolerant bacterium *Acetobacter pasteurianus* SKYAA25 for acetic acid production from apple pomace. *Sci. Total Environ.* **690**, 956–964 (2019).
90. Xu, D. *et al.* Modulation of Metabolome and Bacterial Community in Whole Crop Corn Silage by Inoculating Homofermentative *Lactobacillus plantarum* and Heterofermentative *Lactobacillus buchneri*. *Front. Microbiol.* **9**, (2019).
91. Christensen, S. H. Pectins. in *Food Hydrocolloids* (CRC Press, 1986).
92. Beretta, C., Stoessel, F., Baier, U. & Hellweg, S. Quantifying food losses and the potential for reduction in Switzerland. *Waste Manag.* **33**, 764–773 (2013).
93. Walker, G. M. & Stewart, G. G. *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages* **2**, 30 (2016).

8. Annexe

1. Résultats bruts du suivi de production des souches endogènes identifiées

N° levure	Noms levures	Identification levures	Temps	Temps (heures)	Saccharose (g/L)	Glucose (g/L)	Fructose (g/L)	Ac Lactique (g/L)	Ethanol (g/L)	Ac Acétique (g/L)
1	L51	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	t0	0	47,34	25,24	n.a.	0,38	n.a.	n.a.
1	L51	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	t1	6	50,82	27,03	n.a.	0,34	n.a.	n.a.
1	L51	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	t2	16	48,14	22,03	n.a.	0,13	1,76	2,37
1	L51	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	t4	38	46,78	11,96	n.a.	n.a.	6,13	16,29
1	L51	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	t6	60	46,96	7,34	1,79	n.a.	8,15	24,60
1	L51	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	t9	134	49,18	7,35	1,78	n.a.	8,18	18,57
2	L52	<i>Candida intermedia</i>	t0	0	47,11	25,16	n.a.	0,36	n.a.	n.a.
2	L52	<i>Candida intermedia</i>	t1	6	50,99	27,52	2,79	0,42	n.a.	n.a.
2	L52	<i>Candida intermedia</i>	t2	16	41,44	23,91	4,10	0,38	1,72	0,09
2	L52	<i>Candida intermedia</i>	t4	38	14,42	18,40	11,13	0,38	7,35	0,23
2	L52	<i>Candida intermedia</i>	t6	60	4,20	13,72	14,00	0,38	11,95	0,31
2	L52	<i>Candida intermedia</i>	t9	134	0,11	n.a.	1,25	0,40	25,12	3,04
3	L53	<i>Metschnikowia sp.</i>	t0	0	47,49	25,37	n.a.	0,37	n.a.	n.a.
3	L53	<i>Metschnikowia sp.</i>	t1	6	50,45	26,90	2,66	0,38	n.a.	n.a.
3	L53	<i>Metschnikowia sp.</i>	t2	16	49,12	23,91	2,66	0,13	1,34	0,76
3	L53	<i>Metschnikowia sp.</i>	t4	38	48,06	12,20	n.a.	n.a.	6,17	10,80
3	L53	<i>Metschnikowia sp.</i>	t6	60	48,01	8,56	2,05	n.a.	8,00	16,82
3	L53	<i>Metschnikowia sp.</i>	t9	134	51,41	8,09	1,86	n.a.	7,94	12,65
4	L54	<i>Candida intermedia</i>	t0	0	47,35	25,31	n.a.	0,37	n.a.	n.a.
4	L54	<i>Candida intermedia</i>	t1	6	51,37	27,48	2,80	0,38	n.a.	n.a.
4	L54	<i>Candida intermedia</i>	t2	16	41,64	24,60	4,56	0,38	1,80	0,10
4	L54	<i>Candida intermedia</i>	t4	38	13,62	18,52	11,55	0,38	7,55	0,24
4	L54	<i>Candida intermedia</i>	t9	134	0,12	n.a.	2,08	0,39	25,47	2,85
5	L55	<i>Pichia sp. (ou Saturnispora silvae)</i>	t0	0	47,86	25,55	n.a.	0,37	n.a.	n.a.
5	L55	<i>Pichia sp. (ou Saturnispora silvae)</i>	t1	6	50,85	26,77	n.a.	0,38	n.a.	n.a.
5	L55	<i>Pichia sp. (ou Saturnispora silvae)</i>	t2	16	49,36	26,42	2,63	0,37	n.a.	n.a.
5	L55	<i>Pichia sp. (ou Saturnispora silvae)</i>	t4	38	48,55	25,39	2,60	0,36	0,22	n.a.
5	L55	<i>Pichia sp. (ou Saturnispora silvae)</i>	t9	134	53,75	28,25	n.a.	0,36	1,30	0,27
6	L56	<i>Pichia sp. (ou Saturnispora silvae)</i>	t0	0	47,21	25,18	n.a.	0,36	n.a.	n.a.
6	L56	<i>Pichia sp. (ou Saturnispora silvae)</i>	t1	6	49,65	26,64	2,74	0,40	n.a.	n.a.
6	L56	<i>Pichia sp. (ou Saturnispora silvae)</i>	t2	16	48,63	25,65	n.a.	0,36	n.a.	n.a.
6	L56	<i>Pichia sp. (ou Saturnispora silvae)</i>	t4	38	48,58	25,07	n.a.	0,36	0,15	n.a.
6	L56	<i>Pichia sp. (ou Saturnispora silvae)</i>	t9	134	51,54	24,52	n.a.	0,39	1,00	0,20
7	L57	<i>Pichia sp. (ou Saturnispora silvae)</i>	t0	0	47,35	25,17	n.a.	0,36	n.a.	n.a.
7	L57	<i>Pichia sp. (ou Saturnispora silvae)</i>	t1	6	50,71	26,56	n.a.	0,38	n.a.	n.a.
7	L57	<i>Pichia sp. (ou Saturnispora silvae)</i>	t2	16	47,99	25,27	n.a.	0,36	n.a.	n.a.
7	L57	<i>Pichia sp. (ou Saturnispora silvae)</i>	t4	38	48,18	24,76	n.a.	0,36	0,20	n.a.
7	L57	<i>Pichia sp. (ou Saturnispora silvae)</i>	t9	134	12,33	5,89	n.a.	0,08	0,36	0,05
8	L58	<i>Candida intermedia</i>	t0	0	47,80	25,45	n.a.	0,36	n.a.	n.a.
8	L58	<i>Candida intermedia</i>	t1	6	50,28	26,84	2,70	0,38	n.a.	n.a.
8	L58	<i>Candida intermedia</i>	t2	16	37,95	24,57	5,08	0,37	1,58	n.a.
8	L58	<i>Candida intermedia</i>	t4	38	9,24	19,30	13,17	0,39	7,46	0,14
8	L58	<i>Candida intermedia</i>	t9	134	0,20	2,40	11,84	0,34	20,86	0,44
9	L59	<i>Candida intermedia</i>	t0	0	48,33	25,86	n.a.	0,41	n.a.	n.a.
9	L59	<i>Candida intermedia</i>	t1	6	49,75	26,09	n.a.	0,37	n.a.	n.a.
9	L59	<i>Candida intermedia</i>	t2	16	39,88	23,59	4,42	0,37	1,93	0,10
9	L59	<i>Candida intermedia</i>	t4	38	12,52	17,82	11,73	0,37	7,97	0,24
9	L59	<i>Candida intermedia</i>	t9	134	0,19	4,29	12,96	0,36	18,35	0,51
10	L60	<i>Candida intermedia</i>	t0	0	47,15	25,20	n.a.	0,36	n.a.	n.a.
10	L60	<i>Candida intermedia</i>	t1	6	48,19	25,56	n.a.	0,37	n.a.	n.a.
10	L60	<i>Candida intermedia</i>	t2	16	40,63	23,38	4,09	0,38	1,82	0,09
10	L60	<i>Candida intermedia</i>	t4	38	9,52	17,51	12,30	0,38	7,98	0,26
10	L60	<i>Candida intermedia</i>	t9	134	0,10	n.a.	1,77	0,36	25,74	2,85
11	L61	<i>Zygoascus meyeriae</i>	t0	0	48,21	25,99	2,63	0,36	n.a.	n.a.
11	L61	<i>Zygoascus meyeriae</i>	t2	16	47,71	25,18	n.a.	0,35	0,17	0,14
11	L61	<i>Zygoascus meyeriae</i>	t4	38	47,30	23,10	n.a.	n.a.	1,12	3,34
11	L61	<i>Zygoascus meyeriae</i>	t6	60	41,71	12,14	3,51	n.a.	5,72	31,27
11	L61	<i>Zygoascus meyeriae</i>	t9	134	36,67	10,75	4,92	n.a.	7,05	32,76
12	L62	<i>Zygoascus meyeriae</i>	t0	0	47,48	25,46	n.a.	0,36	n.a.	n.a.
12	L62	<i>Zygoascus meyeriae</i>	t2	16	47,40	24,96	n.a.	0,35	0,19	0,18
12	L62	<i>Zygoascus meyeriae</i>	t4	38	47,62	23,10	2,51	n.a.	1,35	3,97
12	L62	<i>Zygoascus meyeriae</i>	t6	60	43,27	15,69	3,55	n.a.	4,49	12,16
12	L62	<i>Zygoascus meyeriae</i>	t9	134	40,11	14,29	4,47	n.a.	5,58	14,94
13	L63	<i>Pichia fermentans</i>	t0	0	47,16	25,26	n.a.	0,36	n.a.	n.a.
13	L63	<i>Pichia fermentans</i>	t2	16	47,72	20,66	n.a.	0,37	2,53	0,11
13	L63	<i>Pichia fermentans</i>	t9	134	45,64	7,23	1,68	0,22	8,08	0,42
14	L64	<i>Hanseniaspora pseudoguilliermondii</i>	t0	0	47,60	25,72	2,60	0,36	n.a.	n.a.
14	L64	<i>Hanseniaspora pseudoguilliermondii</i>	t2	16	47,91	17,48	n.a.	0,42	4,18	0,33
14	L64	<i>Hanseniaspora pseudoguilliermondii</i>	t9	134	45,52	11,02	1,60	0,41	8,18	0,66
15	L65	<i>Hanseniaspora pseudoguilliermondii</i>	t0	0	46,90	24,90	2,58	0,36	n.a.	n.a.
15	L65	<i>Hanseniaspora pseudoguilliermondii</i>	t2	16	47,57	17,59	2,44	0,43	4,06	0,32
15	L65	<i>Hanseniaspora pseudoguilliermondii</i>	t9	134	45,92	11,07	1,59	0,41	8,38	0,65
16	L66	<i>Hanseniaspora pseudoguilliermondii</i>	t0	0	49,01	26,37	2,62	0,36	n.a.	n.a.
16	L66	<i>Hanseniaspora pseudoguilliermondii</i>	t2	16	48,43	18,84	n.a.	0,41	3,54	0,33
16	L66	<i>Hanseniaspora pseudoguilliermondii</i>	t9	134	45,48	11,00	1,59	0,41	8,27	0,68
17	L68	<i>Pichia fermentans</i>	t0	0	47,55	25,50	2,51	0,35	n.a.	n.a.
17	L68	<i>Pichia fermentans</i>	t2	16	47,49	22,12	n.a.	0,36	1,62	n.a.
17	L68	<i>Pichia fermentans</i>	t9	134	45,31	7,18	1,66	0,22	8,14	0,45
18	L67	<i>Pichia fermentans</i>	t0	0	46,97	25,45	2,47	0,36	n.a.	n.a.
18	L67	<i>Pichia fermentans</i>	t2	16	47,45	22,40	n.a.	0,36	1,48	n.a.
18	L67	<i>Pichia fermentans</i>	t9	134	45,76	7,32	1,69	0,22	8,30	0,46
19	L69	<i>Pichia fermentans</i>	t0	0	47,29	25,22	n.a.	0,36	n.a.	n.a.
19	L69	<i>Pichia fermentans</i>	t2	16	47,70	22,02	n.a.	0,36	1,72	n.a.
19	L69	<i>Pichia fermentans</i>	t9	134	45,91	7,23	1,69	0,12	8,35	0,40
20	L70	<i>Saturnispora silvae (Pichia sp.)</i>	t0	0	47,51	25,29	n.a.	0,36	n.a.	n.a.
20	L70	<i>Saturnispora silvae (Pichia sp.)</i>	t2	16	47,86	25,40	n.a.	0,35	n.a.	n.a.
20	L70	<i>Saturnispora silvae (Pichia sp.)</i>	t9	134	48,04	23,12	n.a.	0,36	0,82	0,19
21	L71	<i>Saturnispora silvae (Pichia sp.)</i>	t0	0	45,66	26,03	3,25	0,33	n.a.	0,03
21	L71	<i>Saturnispora silvae (Pichia sp.)</i>	t9	134	45,82	23,92	3,26	0,36	0,85	0,27
22	L72	<i>Saturnispora silvae (Pichia sp.)</i>	t0	0	46,96	26,71	3,32	0,34	n.a.	0,03
22	L72	<i>Saturnispora silvae (Pichia sp.)</i>	t9	134	45,37	23,69	3,17	0,37	0,84	0,28

N° levure	Noms levures	Identification levures	Temps	Temps (heures)	Saccharose (g/L)	Glucose (g/L)	Fructose (g/L)	Ac Lactique (g/L)	Ethanol (g/L)	Ac Acétique (g/L)
23	L73	<i>Zigosaccharomyces bailii</i>	t0	0	45,82	25,99	3,14	0,33	n.a.	n.a.
23	L73	<i>Zigosaccharomyces bailii</i>	t2	16	48,18	25,20	2,58	0,31	0,14	n.a.
23	L73	<i>Zigosaccharomyces bailii</i>	t4	84	0,12	16,55	0,64	0,43	19,95	0,26
23	L73	<i>Zigosaccharomyces bailii</i>	t6	106	0,11	10,72	0,14	0,44	23,36	0,31
23	L73	<i>Zigosaccharomyces bailii</i>	t9	134	0,11	3,80	0,08	0,47	27,23	0,36
24	L74	<i>Zigosaccharomyces bailii</i>	t0	0	46,25	26,22	3,19	0,33	n.a.	n.a.
24	L74	<i>Zigosaccharomyces bailii</i>	t2	16	45,83	25,28	3,08	0,31	0,35	n.a.
24	L74	<i>Zigosaccharomyces bailii</i>	t4	84	0,15	19,24	1,40	0,43	18,11	0,43
24	L74	<i>Zigosaccharomyces bailii</i>	t6	106	0,11	11,50	0,19	0,43	22,84	0,30
24	L74	<i>Zigosaccharomyces bailii</i>	t9	134	0,12	5,36	0,10	0,47	26,81	0,37
25	L75	<i>Zigosaccharomyces bailii</i>	t0	0	46,04	26,06	3,19	0,33	n.a.	n.a.
25	L75	<i>Zigosaccharomyces bailii</i>	t2	16	47,50	24,88	n.a.	0,31	0,24	n.a.
25	L75	<i>Zigosaccharomyces bailii</i>	t4	84	0,13	16,03	0,67	0,43	20,11	0,25
25	L75	<i>Zigosaccharomyces bailii</i>	t6	106	0,11	9,55	0,14	0,45	24,41	0,43
25	L75	<i>Zigosaccharomyces bailii</i>	t9	134	0,11	5,32	0,09	0,47	26,43	0,36
26	L76	<i>Zigosaccharomyces bailii</i>	t0	0	46,22	26,08	3,09	0,33	n.a.	n.a.
26	L76	<i>Zigosaccharomyces bailii</i>	t2	16	47,19	25,15	n.a.	0,30	n.a.	n.a.
26	L76	<i>Zigosaccharomyces bailii</i>	t4	84	0,17	16,26	0,87	0,42	20,14	0,31
26	L76	<i>Zigosaccharomyces bailii</i>	t6	106	0,11	13,23	0,23	0,42	21,97	0,30
26	L76	<i>Zigosaccharomyces bailii</i>	t9	134	0,16	8,19	0,11	0,45	24,76	0,35
27	SL1	<i>Cryptococcus laurentii</i>	t0	0	46,26	26,02	3,16	0,33	n.a.	n.a.
27	SL1	<i>Cryptococcus laurentii</i>	t9	134	45,72	19,88	n.a.	1,16	0,90	n.a.
28	SL2	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	t0	0	46,11	25,96	3,13	0,33	n.a.	n.a.
28	SL2	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	t9	134	29,70	27,57	7,42	0,35	n.a.	0,08
29	SL4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	t0	0	46,37	26,12	3,19	0,33	n.a.	n.a.
29	SL4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	t2	16	40,52	20,77	3,85	0,32	3,79	n.a.
29	SL4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	t4	84	0,17	1,20	1,19	0,82	28,06	0,62
29	SL4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	t6	106	0,19	n.a.	0,10	0,32	30,36	0,36
29	SL4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	t8	128	0,23	n.a.	0,06	0,32	29,30	0,23
29	SL4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	t9	134	0,22	n.a.	0,06	0,35	30,76	0,30
30	SL5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	t0	0	46,11	25,99	3,17	0,33	n.a.	n.a.
30	SL5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	t2	16	42,52	21,00	3,71	0,32	3,44	0,06
30	SL5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	t4	84	0,11	0,47	2,22	0,35	29,24	0,27
30	SL5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	t6	106	0,11	0,02	0,53	0,37	30,91	0,27
30	SL5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	t8	128	0,10	n.a.	0,12	0,34	31,33	0,27
30	SL5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	t9	134	0,10	n.a.	0,12	0,37	30,96	0,29

2. Résultats bruts des molécules identifiées pour les MP F1 et F2 :

Echantillon	Fermentation	Repetition	Butanal	Ethyle acetate	1,3-Dioxolane	2-pentanone	2-butanone	Isobutyl-acetate	1-propanol	Acetic acid, b	Hexanal	2-methyl-1-propanol	1-butanol	D-limonène
Marc	F1	a	0,00	1,59	0,00	0,15	0,03	0,04	0,00	0,00	0,00	1,27	0,00	0,92
Marc	F1	a	0,00	1,50	0,00	0,14	0,03	0,03	0,00	0,00	0,00	1,21	0,00	0,80
Marc	F1	a	0,00	1,58	0,00	0,23	0,07	0,02	0,00	0,00	0,00	1,12	0,00	0,72
Marc	F2	a	0,19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	ok	0,14	0,43	0,28	10,82	0,00
Marc	F2	a	0,26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,22	0,20	0,50	0,41	15,91	0,00
Marc	F2	a	0,26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15	0,30	0,17	0,55	13,88	0,00
Echantillon	Fermentation	Repetition	3-methyl-1-butanol	Acetic acid, h	Acetoin	6-methyl-5-hexanol	1-hexanol	Butanoic acid	acide acétique	2-methyl-propanoic acid	butanoic acid	3-methyl-butanoic acid	α-farnesene	Hexanic acid
Marc	F1	a	3,79	0,00	1,80	0,10	0,05	0,00	5,11	0,36	0,10	0,90	0,01	0,01
Marc	F1	a	2,87	0,00	2,42	0,11	0,21	0,00	7,48	0,43	0,12	1,15	0,01	0,01
Marc	F1	a	2,02	0,00	1,43	0,09	0,15	0,00	3,54	0,33	0,07	0,86	0,01	0,01
Marc	F2	a	0,26	0,31	0,00	0,00	6,00	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Marc	F2	a	0,28	0,23	0,00	0,00	4,50	ok	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Marc	F2	a	0,34	0,39	0,00	0,00	8,93	ok	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Echantillon	Fermentation	Repetition	Phenethyl alcohol	Octanoic acid	Thymol	Decanoic acid								
Marc	F1	a	0,27	0,01	0,01	0,00								
Marc	F1	a	0,34	0,01	0,01	0,00								
Marc	F1	a	0,24	0,01	0,01	0,01								
Marc	F2	a	0,00	0,00	0,00	0,00								
Marc	F2	a	0,00	0,00	0,00	0,00								
Marc	F2	a	0,00	0,00	0,00	0,00								