



HAL
open science

Formuler des consortia microbiens pour piloter les propriétés sensorielles de gels à base de protéines de pois : Mieux comprendre l'effet de la matrice et des communautés microbiennes sur les propriétés sensorielles

Salma Ben Harb

► **To cite this version:**

Salma Ben Harb. Formuler des consortia microbiens pour piloter les propriétés sensorielles de gels à base de protéines de pois : Mieux comprendre l'effet de la matrice et des communautés microbiennes sur les propriétés sensorielles. Génie des procédés. Université Paris Saclay (COMUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLA045 . tel-02069128

HAL Id: tel-02069128

<https://theses.hal.science/tel-02069128>

Submitted on 15 Mar 2019

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

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

Formuler des consortia microbiens pour piloter les propriétés sensorielles de gels à base de protéines de pois

Mieux comprendre l'effet de la matrice et des communautés microbiennes sur les propriétés sensorielles

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
Préparée à AgroParisTech

École doctorale n°581 Agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES)

Spécialité de doctorat : Génie des aliments

Thèse présentée et soutenue à Paris, 18 décembre 2017, par

Salma Ben Harb

Composition du Jury :

Mme Sophie Landaud Professeur AgroParisTech, UMR GMPA, Grignon	Président
Mme Elisabeth Guichard Directrice de recherche INRA, UMRCSGA, Dijon	Rapporteur
Mme Anne Thierry Chargée de recherche, INRA, UMR STLO, Rennes	Rapporteur
M. Renaud Boulanger Chercheur CIRAD, UMR QualiSud, Montpellier	Examineur
M. Jacques Gueguen Directeur de recherche Emérite INRA, Nantes	Examineur
Mme Isabelle Souchon Directrice de recherche INRA, UMR GMPA, Grignon	Directrice de thèse
M. Pascal Bonnarne Directeur de recherche INRA, UMR GMPA, Grignon	Co-Directeur de thèse

Remerciements

Il est naturel de remercier à la fin d'un tel travail tous ceux qui, plus ou moins directement, ont contribué à le rendre possible. C'est avec un enthousiasme certain que je profite de ces quelques lignes pour rendre hommage aux personnes qui ont participé à leur manière à la réalisation de cette thèse.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à Isabelle Souchon et Pascal Bonnarme qui fut pour moi des directeurs de thèse attentifs et disponibles malgré leurs nombreuses charges. Leur compétence, leur rigueur scientifique et leur clairvoyance m'ont beaucoup appris. Ils ont été et resteront des moteurs de mon travail de chercheur.

Je tiens à remercier très chaleureusement Françoise Irlinger pour sa disponibilité et ses conseils aussi bien pour la thèse que pour le reste. Très humblement, je voudrais te dire merci pour ton soutien pendant mes périodes de doutes, pour tes multiples encouragements répétés, pour tes conseils avisés et ton écoute qui ont été prépondérants pour la bonne réussite de cette thèse. Ton énergie et ta confiance ont été des éléments moteurs pour moi. J'ai pris un grand plaisir à travailler avec toi.

Je suis également reconnaissante à Maud Panouille et Anne Saint-Eve pour le temps conséquent qu'elles m'ont accordé, leurs qualités pédagogiques et scientifiques. J'ai beaucoup appris à leurs côtés et je leur adresse ma gratitude pour tout cela.

J'exprime tous mes remerciements à l'ensemble des membres de mon jury Madame Sophie Landaud, Monsieur Jacques Gueguen, Madame Anne Thierry, Madame Elisabeth Guichard et Monsieur Renaud Boulanger, pour ces multiples discussions informelles reflétant parfaitement leur disponibilité et leur plaisir de partage.

Je tiens à remercier l'ensemble des chercheurs, techniciens, thésards, stagiaires du GMPA pour leur sympathie. En particulier, je souhaite remercier Roshan Raouf et Malou Le Corronc-Nuzum pour leur contribution plus que significative à ce travail, ainsi que Anne-Sophie Sarthou, Brigitte Pollet, Manon Surin et David Forest pour leur aide technique et leur réactivité.

J'ai une pensée spéciale pour toutes les personnes qui ont fait quotidiennement, quel que soit les conditions, le trajet Paris-Grignon avec moi : Solenne, Vincent, Daniela, Audrey et bien sûr Steven pour avoir toujours une bonne idée de débat et pour son bon humour, que j'apprécie beaucoup !

Mes derniers remerciements iront évidemment à tous ceux qui forment mon "cocon" familial. Je pense tout d'abord à mes parents sans qui l'enfant que j'étais ne serait pas devenu la femme que je suis. C'est avec émotion qu'à mon tour je leur dévoile le fruit de mes efforts. J'espère être à la hauteur de leur fierté inconditionnelle. Je suis très reconnaissante envers ma petite sœur Sana et mon frère Ahmed pour leur confiance, leur patience sans faille (enfin quasiment...) et leur soutien au cours de toutes ces années. Mes derniers remerciements et non les moindres, s'adressent à mon mari Hosni, qui, pour mon plus grand bonheur partage ma vie et mes expériences professionnelles depuis leurs origines. Il est simplement le pilier de toutes mes constructions et la base de tous mes projets. Il a su, tout au long de cette thèse, réfréner mes "ras le bol" et m'encourager dans ma voie. Son soutien a été sans faille et je lui serai éternellement reconnaissante d'avoir été la pierre angulaire de cette entreprise. Il est la clé de ma réussite, sans lui à mes côtés, cette réalisation n'aurait pas la même saveur.

VALORISATIONS ISSUES DE CE TRAVAIL DE THESE

Publications parues dans des revues scientifiques

1. **S. Ben-Harb**, M. Panouillé, D. Huc-Mathis, G. Moulin, A. Saint-Eve, F. Irlinger, P. Bonnarme, C. Michon, I. Souchon. The rheological and microstructural properties of pea, milk, mixed pea/milk gels and gelled emulsions designed by thermal, acid, and enzyme treatments. *Food Hydrocolloids*.

Projets de publication

1. **S. Ben-Harb**, A. Saint-Eve, M. Panouillé, I. Souchon P. Bonnarme, E. Dugat-Bony ,F. Irlinger. Design of microbial consortia for the fermentation of pea protein enriched emulsions. A soumettre à *International Journal of Food Microbiology*
2. **S. Ben-Harb**, F. Irlinger, A. Saint-Eve, M. Panouillé, I. Souchon, P. Bonnarme. Versatility of microbial consortia and sensorial properties induced by the composition of different milk and pea-proteins-based gels: towards new (milk and pea) fermented foods. A soumettre à *Food Microbiology*
3. **S. Ben-Harb**, A. Saint-Eve, F. Irlinger, M. Panouillé, P. Bonnarme, I. Souchon. Modulation of volatile and non-volatile composition of pea protein based gels and their perception through fermentation with different microbial starters, A soumettre à *Food Chemistry* ou *International Food Research*

Communications dans des conférences nationales et internationales

1. **S. Ben-Harb**, F. Irlinger, A. Saint-Eve, M. Panouillé, P. Bonnarme, I. Souchon. Fermentation of pea proteins for new food design: Use of dairy and plant microbial cultures blend to improve sensory properties. 2nd Euro-Mediterranean Symposium on Fruit and Vegetable Processing (Poster en Anglais)
2. **S. Ben-Harb**, F. Irlinger, A. Saint-Eve, M. Panouillé, P. Bonnarme, I. Souchon. Fermenter et structurer des protéines de pois pour améliorer leurs propriétés sensorielles. 1^{ères} rencontres francophones sur les légumineuses. (Oral en Français)
3. **S. Ben-Harb**, F. Irlinger, A. Saint-Eve, M. Panouillé, P. Bonnarme, I. Souchon. Fermenter et structurer des protéines de pois pour améliorer leurs propriétés sensorielles. Atelier prospectif recherches légumineuses –Académie de l’agriculture- (Oral en Français)
4. **S. Ben-Harb**, F. Irlinger, A. Saint-Eve, M. Panouillé, P. Bonnarme, I. Souchon. Titre à définir. 31st EFFoST International Conference. Food Science and Technology Challenges for the 21st Century - Research to Progress Society. (Oral en anglais)

TABLE DES MATIERES

Introduction générale	12
Chapitre I. Etude bibliographique	17
I.1. Protéines de pois : composition, extraction et propriétés fonctionnelles.....	17
I.1.1. Composition protéique	17
I.1.2. Méthodes d'extraction des protéines	19
I.1.3. Propriétés fonctionnelles des protéines de pois.....	21
I.1.4. Synthèse : les propriétés fonctionnelles des protéines de pois.....	29
I.2. Les défauts sensoriels des protéines de pois et leur origine.....	30
I.2.1. Les défauts sensoriels.....	30
I.2.2. Les solutions proposées pour réduire les défauts dans des produits à base de pois	35
I.2.3. Démarche sensorielle et méthodes pour caractériser les produits.....	37
I.2.4. Synthèse : Les défauts sensoriels des protéines de pois et leur origine	39
I.3. Les produits fermentés : origines et diversité microbienne.....	40
I.3.1. Introduction.....	40
I.3.2. Les aliments fermentés issus de la fermentation spontanée et "back-slopping"	44
I.3.3. Les ferments microbiens inoculés dans la fermentation de produits à base de lait et de légumineuses : de la composition microbienne aux fonctionnalités	49
I.3.4. Les stratégies d'assemblage raisonné pour l'élaboration d'écosystèmes microbiens efficaces et innovants.....	67
I.3.5. Synthèse	68
I.4. Objectifs des travaux de thèse et démarche expérimentale	69
Chapitre II. Résultats	73
II.1. Propriétés rhéologiques et de microstructure des gels/émulsions de pois, mixte et lait formés avec différents types de coagulations : thermique, enzymatique et chimique.....	73
II.1.1. Résumé.....	73
II.1.2. Publication.....	75
II.2. Choix des communautés microbiennes permettant d'avoir des propriétés sensorielles améliorées pour la fermentation des émulsions enrichies en protéines de pois.....	94
II.2.1. Résumé.....	94
II.2.2. Préparation des matrices avant fermentation (tests préliminaires).....	96
II.2.3. Publication.....	100
II.3. Etude du fonctionnement de communautés microbiennes synthétiques aptes à fermenter des gels avec composition différente.....	127
II.3.1. Résumé.....	127
II.3.2. Publication.....	129
II.4. Impact de l'origine des souches sur le fonctionnement des communautés microbiennes et sur les qualités sensorielles au cours de la fermentation de différents types de gels.....	151

II.5. Etude de la composition volatile et non-volatile des gels fermentés enrichis en protéines végétales et leur perception.....	162
II.5.1. Résumé.....	162
II.5.2. Publication.....	163
Chapitre III. Discussion générale.....	181
Conclusions générales et perspectives.....	190
Références.....	193

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Répartition des cultures de légumineuses à graines dans le monde (Labalette et Guiavarc'h, 2016).....	13
Figure 2. Composition et caractéristiques des protéines de pois et assemblage des sous-unités consécutives de globulines de pois 7S et 11S (Mession, 2012).....	18
Figure 3. Solubilité des protéines de pois (natives et commerciales) et des protéines de soja en fonction de pH-extraction par voie humide -PP = Protéine de pois, SP = protéine de soja, les indices I _c et I _n indiquent respectivement les conditions d'obtention à l'échelle labo (conditions « natives ») et à l'échelle industrielle (« commerciales ») (Shand <i>et al.</i> , 2007).....	23
Figure 4. Mécanisme général de dénaturation/agrégation thermique de globulines en fonction des paramètres du solvant appliqués, pI : pH isoélectrique, force ionique faible ; force ionique élevée (d'après Bryant and McClements, 1998; Clark <i>et al.</i> , 2001).....	25
Figure 5. Mécanisme de dénaturation thermique et d'agrégation de mélange protéique (protéines de pois et caséines) suivi d'une gélification par GDL à 20°C) Viciline chauffée en présence de caséines b) viciline et protéines de pois chauffées seules puis mélangées ensuite avec les caséines – (Mession <i>et al.</i> , 2017b).....	27
Figure 6. Représentation de la réticulation de protéines par la transglutaminase – (D'après Gerrard, 2002)).....	28
Figure 7. Structure des saponines B et DDMP présentes dans le pois.....	34
Figure 8. Différents types de produits fermentés (D'après Feng <i>et al.</i> , 2017).....	43
Figure 9. Succession des flores microbiennes au cours de la fabrication d'un fromage à pâte molle croûte lavée. (Irlinger <i>et al.</i> , 2007)	52
Figure 10. Fermentation du glucose par les bactéries lactiques (Caplice and Fitzgerald, 1999)	56
Figure 11. Métabolisme du pyruvate par les bactéries lactiques et les produits formés (Peyer <i>et al.</i> , 2016).....	58
Figure 12. Schéma présentant la démarche du projet de thèse en 5 phases	72
Figure 13. Storage modulus (G') and loss modulus (G'') across different frequencies for non-gelled samples of the a) pea suspension and emulsion as well as the b) mixed suspension and emulsion. G': closed symbols; G'': open symbols; suspensions: squares; emulsions	84
Figure 14. Microstructure of non-gelled suspensions. Fats are labeled in red, and proteins are labeled in green; scale bar = 50 μm.....	84
Figure 15. Storage modulus (G') as a function of time for the regular pea, milk, and mixed suspensions and the LC pea and milk suspensions subject to a) thermal, b) enzyme, and c) acid treatments. The dark colors represent the regular suspensions (14.8% protein); the clear colors represent the LC suspensions (7.4% protein). Pea, milk, and mixed suspensions are depicted using dashed, dash-dot, and	

solid lines, respectively. Pea, milk and mixed gels are depicted using blue, red and green respectively. The temperature is depicted in grey	85
Figure 16. Storage modulus (G') and loss modulus (G'') as function of strain at rupture γ (%) for regular pea, milk, and mixed gels and low-concentration (LC) pea and milk gels created using a) thermal, b) acid, and c) enzyme treatments. G' : closed symbols; G'' : open symbols	86
Figure 17. Storage modulus (G') of gels and gels emulsions as a function of the different gelation. A: regular pea gels, B; regular mixed gels.....	90
Figure 18. Microstructure of samples before gelation (top row) and after gelation induced by three treatment types (bottom three rows). Fats are labeled in red, and proteins are labeled in green; scale bar = 50 μm	92
Figure 19. Cinétique de gélification des différents émulsions végétales (100% protéines de pois) et des émulsions mixtes (50% protéines de pois/50% protéines de lait) en fonction du temps. Noir : température ($^{\circ}\text{C}$), Vert : coagulation acide (2% GDL), rouge : coagulation enzymatique (0,3% TGase+0,3 CaSO_4 +0,5% chymosine), bleu (coagulation thermique (90 $^{\circ}\text{C}$ /1h).....	96
Figure 20. Preparation of pea and mixed fermented emulsions	105
Figure 21. Distribution and abundance of species on the pea emulsions (PE) fermented by ten different allochthonous microbial consortia (V1 to V10).....	116
Figure 22. Distribution and abundance of species on the mixed pea and milk protein emulsions (ME) fermented by ten different allochthonous microbial consortia (M1 to M10)	118
Figure 23. Representation of the ten different fermented emulsions and one control non-fermented emulsion and aroma descriptors describing the samples in the first two dimensions of CFA (Correspondence Factorial Analyses) of data from Call All That Apply CATA. A: Pea Emulsion (PE: 100% pea proteins). B: Mixed Emulsion (ME/ 50% pea proteins/50% milk proteins). Blue: samples (V1---V10) (M1---M10). Red: aroma descriptors, Black: control samples (emulsions not fermented).	120
Figure 24. Volatile compounds identified by GC-MS of the emulsions after and before fermentation (A: Pea Emulsion (PE) before fermentation; B: Mixed Emulsion (ME) before fermentation; C: Fermented pea emulsion (V10); D: Fermented mixed (milk and pea proteins) emulsion (M7).....	121
Figure 25. Preparation of fermented gels	133
Figure 26. Representation of the different fermented (after seven days of fermentation) and non-fermented gels and descriptors describing the samples in the first two dimensions of CFA (Correspondence Factorial Analysis) of data from Call All That Apply CATA . A hierarchical ascendant cluster analysis (HCA) was carried out for grouping the trials according to their similarity, measured by pearson correlation, whereas cluster aggregation was based on the average linkage method (black circles) (black circles). A: Fermented gels with VEGAN consortium, B: Fermented gels with MEGAN consortium, C: Fermented gels with ExEco consortium. Red: significant descriptors cited by the panel, Blue: samples.	142

Figure 27. Total Area Peak (TAP) of the different aromatic compounds that composed control samples (no-fermented samples), Pea Gel (PG), Pea and Milk Gel (PMG) and Milk Gel (MG) fermented by microbial starters. A: control samples. B: VEGAN consortium; C: MEGAN consortium; D: ExEcoo consortium 145

Figure 28. Multiple Factorial Analysis (MFA) of fermented gels, sensory attributes, microbial communities, and volatile compounds. Red: microbial communities; green: sensory attributes; purple: volatile compounds; blue: fermented samples..... 150

Figure 29. Analyse Factorielle de Correspondance (AFC) représentant les propriétés sensorielles des différents gels avant et après fermentation avec deux types de consortia : MEGAN-A et MEGAN-B Bleu ; produits ; rouge : descripteurs sensoriels significatifs ($p < 0,05$). Une analyse ascendante hiérarchique ascendante (HCA) a été réalisée pour regrouper les essais en fonction de leur similarité, mesurée par corrélation de Pearson, alors que l'agrégation de cluster était basée sur la méthode de liaison moyenne (cercles noirs). 155

Figure 30. Composition en composés volatiles des différents gels fermentés avec deux types de consortia microbiens (MEGAN-A et MEGAN-V) après sept jours de fermentation. A : témoins (gel non fermenté, B : gel de pois fermenté, C : gel mixte fermenté ; D : gel lait..... 158

Figure 31. Analyse Factorielle Multiple (AFM) représentant les propriétés sensorielles, microbiologiques et analytiques des différents gels fermentés avec deux types de consortia microbien (MEGAN-A et MEGAN-V) à sept jours. Carte droite : carte des produits fermentés (Triplicats pour chaque produit sont présentés); carte gauche : carte des propriétés sensorielles, microbiologiques et physicochimiques associés aux produits. $RV(\text{souche-descripteurs}) = 0,61$. $RV(\text{souche-molécules}) = 0,26$. $RV(\text{molécules-descripteurs}) = 0,90$. Lettres A et B (attribuées aux souches) désignent le consortium MEGAN-A et MEGAN-V respectivement. 161

Figure 32. Average intensities of the sensory attributes evaluated during descriptive sensory analysis by panelists for pea gels. Fermentation effect between control sample (not fermented pea gel) and fermented sample (after three days of fermentation) determined by ANOVA on each sensory attribute. Letters A and B indicate means that significantly differ between products at $P < 0.05$ (Newman-Keuls test). A: VEGAN consortium, B: MEGAN-A consortium, C: MEGAN-V consortium..... 171

Figure 33. Average intensities of the sensory attributes evaluated during descriptive sensory analysis for mixed gels by panelists. Fermentation effect between control sample (not fermented mixed gel) and fermented sample (after three days of fermentation) determined by ANOVA on each sensory attribute. Letters A and B indicate means that significantly differ between products at $P < 0.05$ (Newman-Keuls test). A: VEGAN consortium, B: MEGAN-A consortium, C: MEGAN-V consortium..... 172

Figure 34. Amino acid composition of pea and mixed gels (not fermented gel and fermented gel at three days). A: map of amino acids composition, B: map of products (Blue: mixed gels, Green: Pea gels). 178

Figure 35. Correlation map of descriptive attributes (issued from MFA), volatile compounds and amino acids composition of the different pea and mixed gels. Red: sensory attributes, Green; volatile compounds, Blue; amino acids. A: Correlation map, B: map of products .RV (sensory a attribute-volatile compounds) = 0.77/RV (sensory attribute –amino acids) =0.45/RV (amino acids – volatile compounds) =0.71 180

Figure 36. Analyse Factorielle Multiple (AFM) représentant les propriétés sensorielles, microbiologiques et analytiques des différents gels et émulsions fermentés avec deux types de consortia microbien (VEGAN et MEGAN) à trois jours. Carte droite : carte des produits fermentés (Triplicats pour chaque produit sont présentés) ; carte gauche : carte des propriétés sensorielles, microbiologiques et physicochimiques associés aux produits. RV(souche-descripteurs)=0,52. RV(souche-molécules)=0,52. RV(molécules-descripteurs)=0,93. MEG et VEG (attribuées aux souches) désignent le consortium MEGAN et VEGAN respectivement. 186

Figure 37. Analyse Factorielle Multiple (AFM) représentant les propriétés sensorielles, microbiologiques et analytiques des différents gels et émulsions fermentés avec trois types de consortia microbien (ExEco, VEGAN et MEGAN) à trois et sept jours. Carte droite : carte des produits fermentés (Triplicats pour chaque produit sont présentés, flèche représente l'évolution du produit de trois à Sept jours de fermentation) ; carte gauche : carte des propriétés sensorielles, microbiologiques et physicochimiques associés aux produits. RV(souche-descripteurs)=0,28. RV(souche-molécules)=0,22. RV(molécules-descripteurs)=0,34. MEG et VEG (attribuées aux souches) désignent le consortium MEGAN et VEGAN respectivement. 189

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Propriétés conférées par les protéines de légumineuses dont celles du pois aux systèmes alimentaires (Utsumi, 1992)	22
Tableau 2. Principales notes sensorielles de pois (Roland <i>et al.</i> , 2017).....	30
Tableau 3. Caractéristiques sensorielles (odeur) de certains composés chimiques responsables des notes « Beany » à une certaine concentration (VARA-UBOL <i>et al.</i> , 2004).....	32
Tableau 4. Caractéristiques sensoriels des combinaisons de molécules responsable ou non de notes beany à différentes concentration (1-1000 ppm).(Bott and Chambers, 2006).....	33
Tableau 5. Descripteurs de saveurs et d'arômes indésirables dans la farine de pois (Price <i>et al.</i> , 1985).....	35
Tableau 6. Exemples de méthodes sensorielles descriptives et discriminatives	38
Tableau 7. Quelques produits fermentés africains (Franz <i>et al.</i> , 2014)	41
Tableau 8. Quelques exemples de produits fermentés traditionnels à base de légumineuses et les micro-organismes identifiés/utilisés	45
Tableau 9. Micro-organismes ensemencés dans la fermentation de produits traditionnels et leur effet bénéfique	50
Tableau 10. Micro-organismes en commun entre les principaux produits fermentés (à base de soja) et des fromages	54
Tableau 11. Molécules produites par le catabolisme d'acides aminés sous l'action des transaminases (Smit <i>et al.</i> , 2005)	57
Tableau 12. Utilisation des bactéries, levures dans les produits alimentaires	64
Tableau 13. Démarche de la thèse, présentée en 5 phases, avec leur objectif et le type de produit utilisé pour y répondre	70
Table14. Different gelation and aggregation techniques used on pure pea and pea/milk mixtures	78
Table15. Composition of pea, milk, and mixed suspensions (g protein/100 g)	81
Table16. Final pH values of the different acid-induced gels	89
Tableau 17. Différents procédés de décontamination testés.....	99
Table 18. Composition of pea and mixed emulsions (g /100 g)	104
Table 19. Composition of experimental synthetic communities and growth of individual strains in combination of one to 9 strains in a pea emulsion (PE) (A: 100% pea proteins) and in a mixed emulsion (ME) (B: 50% of pea proteins and 50% milk proteins).....	111
Table20. Distribution and growth (expressed as $\log N/N_0$, N: growth of strains at three (D3) and seven (D7) of fermentation; N0: initial cell density) of microbial species and pH values through the fermentation of pea gel (PG), pea and milk proteins (PMG) and milk gel (MG) by three microbial communities (VEGAN, MEGAN and ExEco) during three and seven days of fermentation.....	137

Tableau 21. Composition des consortia microbien : MEGAN-A et MEGAN-V	151
Tableau 22. Croissance des souches des différents consortia microbiens ensemencés (MEGAN-A et MEGAN-V) dans les différents gels. pH des gels avant fermentation (J0) et après fermentation (J3 et J7).A- gel pois (100% protéines de pois); B : gel mixte (50% protéines de pois/50% protéines de lait) ; C : gel lait (100% protéines de lait). Les croissances microbiennes sont exprimées en Log UFC/g (soit log de N/N0, N est la croissance après fermentation à J3/J7, N0 est la croissance à J0. Toutes les analyses sont faites en triplicat.....	154
Table 23. List of attributes used for CATA questionnaire presented in 6 classes	167
Table 24. Odorant compounds identified in the pea gels: control sample (not fermented gel), pea VEGAN gels and pea MEGAN-V gels (after three days of fermentation). Blue: lactic zone, red; fruity zone, yellow: roasted/grilled zone and green; vegetal zone	174
Table 25. Odorant compounds identified in the mixed gels: control sample (not fermented gel), mixed MEGAN-A gels and mixed MEGAN-V gels (after three days of fermentation). Blue: lactic zone, red; fruity zone, yellow: roasted/grilled zone, and green; vegetal zone	176
Tableau 26. Caractéristiques des consortia microbiens sélectionnés pour la suspension végétale et mixte.....	184

Introduction générale

Du fait de l'augmentation de la population mondiale, la production de protéines pour l'alimentation des populations et l'évaluation de la qualité de ces protéines pour satisfaire les besoins de l'homme pourraient devenir des questions majeures dans les décennies à venir pour l'ensemble de la planète (Pimentel and Pimentel, 2003). De nombreuses études montrent qu'en revisitant les modes de consommation des produits d'origine animale, notamment en favorisant ceux de produits à base de protéines végétales, il serait possible de tendre vers un système alimentaire plus durable, qui permettrait de nourrir les populations tout en respectant l'environnement et en prévenant le développement de pathologies liées à une alimentation déséquilibrée, comme l'obésité, le diabète ou encore certains cancers du tube digestif (Aiking, 2011, Guéguen *et al.*, 2016). Par ailleurs, des résultats récents montrent que les protéines végétales sont un marqueur robuste d'une alimentation saine (Camilleri *et al.*, 2013). Toutefois, en France et en Europe, la part de protéines végétales dans notre alimentation ne représente que 35 à 40% des protéines totales alors que les recommandations du PNNS 2017 (Plan National de Nutrition Santé) proposent un ratio 60/40 entre protéines végétales et protéines animales. Au-delà des effets santé, l'environnement est également un grand bénéficiaire d'une alimentation moins riche en produits animaux. Produire un kilogramme de protéines végétales peut demander plus de vingt fois moins de surface agricole impliquant une forte réduction de la production de gaz à effet de serre par exemple (Kling and Hough., 2010 ; Tukker *et al.*, 2006).

Les teneurs élevées en protéines de certains végétaux en font des candidats très intéressants pour la production d'aliments à haute teneur en protéines et à bas coût. C'est en particulier le cas des légumineuses à graines, telles que le pois, la féverole, le lupin ou le soja par exemple qui présentent à la fois des qualités nutritionnelles et fonctionnelles particulièrement intéressantes (Bhat and Karim, 2009; Boye *et al.*, 2010). Leur profil en acides aminés se combine efficacement avec celui des céréales pour atteindre un équilibre en acides aminés essentiels proche des besoins physiologiques. Elles présentent un faible index glycémique ou sont encore source de fibres (Chardigny and Walrand, 2016). Les qualités nutritionnelles des légumineuses à graines sont donc aujourd'hui largement reconnues conduisant récemment le PNNS à une identification spécifique de cette classe d'aliments dans la définition des repères nutritionnels. Par ailleurs, les légumineuses, grâce à leur capacité à fixer l'azote atmosphérique, offrent l'avantage de permettre la réduction d'intrants dans la conduite des cultures en alternance avec des céréales ou en culture mixte (Pelzer *et al.*, 2012). La proportion de la production mondiale de légumineuses à graines a augmenté entre 1970 et 2012, passant de 7 % à 12,5 % de la production mondiale de céréales (maïs, riz, blé, etc.).

La légumineuse à graines la plus produite à l'échelle mondiale reste le soja (**figure 1**).

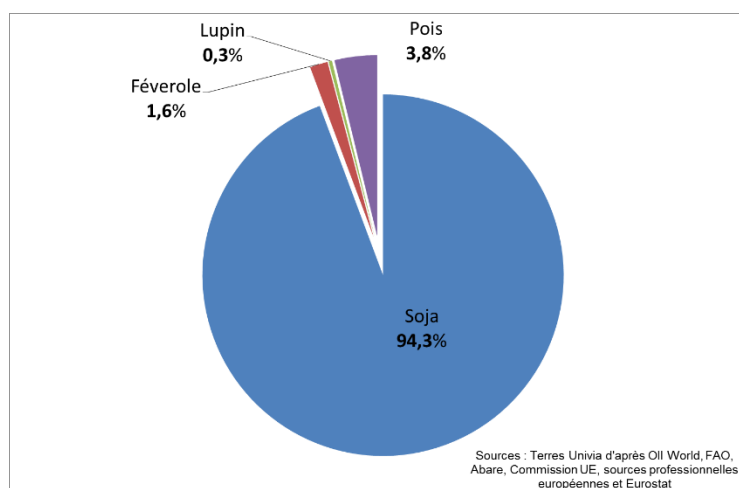


Figure 1. Répartition des cultures de légumineuses à graines dans le monde (Labalette et Guiavarc'h, 2016)

La France représente 15 % des surfaces en légumineuses à graines de l'UE et 21 % de la production totale (1er rang des pays de l'UE) (FAOstat, 2011). Le pois est la légumineuse à graines la plus cultivée en France avec une production de plus de 600 000 tonnes en 2015 (Magrini *et al.*, 2017).

Si les légumineuses à graines offrent de nombreux avantages nutritionnels et environnementaux, leur préparation longue et leur goût restent souvent un frein à leur consommation. Elles sont, par ailleurs, parfois associées à des inconforts digestifs.

Une nouvelle offre alimentaire diversifiée et plus riche en protéines végétales doit donc être repensée. Une façon de repenser cette offre est de s'intéresser aux Matières Protéiques Végétales ou MPV. Les MPV sont des fractions végétales enrichies en protéines offrant des teneurs en protéines généralement comprises entre 40% pour les concentrats protéiques jusqu'à 90% pour les isolats protéiques. Ces protéines sont commercialisées principalement soit pour leur rôle émulsifiant ou texturant, soit comme agent « de charge » à forte valeur nutritionnelle. Une conséquence directe est l'augmentation du marché des protéines végétales qui, entre 2013 et 2018, devrait croître de près de 50%. La formulation de nouveaux aliments enrichis en protéines végétales représente une tendance forte, clairement identifiée par les acteurs de l'agro-alimentaire. Cette tendance répond à la fois à une demande des consommateurs, à un souci des industriels d'améliorer la durabilité de leurs filières, et à une incitation des pouvoirs publics, pour des raisons à la fois nutritionnelles et environnementales. L'industrie de première transformation, qui pratique le fractionnement des agro-ressources, investit massivement pour développer des sites industriels capables de produire des protéines végétales en grande quantité.

Les MPV les plus utilisées restent le soja et le blé, mais une forte demande pour le pois est observée. Le marché mondial des protéines de pois affiche en effet une forte croissance de plus de 13% /an en volume (Global Market Insights) et on a pu observer, par ailleurs, une augmentation entre 2013 et 2015, de 80% du nombre de références de produits alimentaires contenant des protéines de pois (Mintel's

Database). Le pois, s'il possède des avantages agronomiques, environnementaux, technologiques et nutritionnels, présente une utilisation dans des formulations d'aliments qui restent fortement freinés par des défauts sensoriels (Roland *et al.*, 2017). D'importants défauts d'arômes et de saveur, définis comme des odeurs et goûts désagréables ou indésirables perçus par l'homme, ont souvent été reportés dans le cas de produits à base de protéines végétales et notamment le pois. Ces défauts sont, soit intrinsèques à la graine, soit générés lors des différentes étapes de fractionnement des matières premières (Murat *et al.*, 2013) ou encore lors de la transformation finale du produit. Ils constituent un des principaux verrous à lever pour le développement de produits enrichis en protéines végétales (Chumchuere *et al.*, 2000). Ainsi, une transformation des protéines est souvent nécessaire non seulement pour augmenter leur propriétés techno-fonctionnelles, leur bénéfique santé, mais aussi, pour avoir des produits acceptés par le consommateur (Cao-Hoang *et al.*, 2013). Fin 2016, le collectif « Protéines France » (consortium de 9 acteurs français industriels) et l'État français se sont engagés à mettre en œuvre un programme stratégique de développement en termes de recherche, d'investissement et de soutien de la filière pour faire de la France un leader mondial des protéines. L'amélioration de la qualité organoleptique des protéines végétales et le développement de nouveaux produits sont clairement un des axes de travail prioritaires identifiés dans la feuille de route du collectif « protéines France ».

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse. Il est en effet essentiel, pour augmenter la part du pois dans l'alimentation humaine de proposer des solutions pour réduire ou masquer les défauts sensoriels. Qu'il s'agisse d'amertume, d'astringence, de persistance ou de « beany off-flavour » (défauts d'arôme lié à différents composés volatils responsables de notes vertes, terreuses et/ou de sous-bois), les défauts sensoriels sont nombreux. Le masquage de ces défauts par des formulations spécifiques serait envisageable mais ne correspond pas à l'image de produit « naturel » que recherchent les consommateurs aujourd'hui. La fermentation, qui est un procédé ancien de transformation et de conservation pourrait être un moyen de lever les verrous sensoriels liés à l'utilisation des protéines végétales et en particulier du pois, en alimentation humaine. En effet, il suffit de prendre pour exemple les fromages français pour comprendre tout le potentiel des procédés de fermentation pour offrir une large palette de texture et d'arôme à partir d'une même matière première, le lait. Au-delà des propriétés sensorielles de texture, de saveur ou d'arômes, la fermentation offre de nombreux bénéfices sur les propriétés nutritionnelles (exemples : vitamines B, peptides bioactifs, hydrolyse de facteurs antinutritionnels, réduction d'allergies), mais aussi en terme d'impact environnemental (traitement basse température, conservation rallongée des produits et parfois à température ambiante sans ajout de conservateurs (Steinkraus, 2002, Tamang *et al.*, 2016a). Ainsi, ce mode de transformation pourrait donc constituer une voie tout à fait pertinente en termes de durabilité pour favoriser l'augmentation de la part de protéines d'origine végétale dans les régimes alimentaires occidentaux. La fermentation est un procédé de conservation des produits végétaux largement employé en particulier en Asie, générant ainsi une gamme de produits très variée, avec des produits issus de la fermentation du soja (ex : tofu fermenté (sufu), tempeh, yaourt à base de soja) ou

d'autres matières premières comme le chou (duamuoi) (Cao-Hoang *et al.*, 2013). Ces produits ont l'avantage de contenir en général des taux de protéines relativement élevés de l'ordre de 20%, dont la fermentation va contribuer à libérer sous forme de peptides et d'acides aminés, des métabolites susceptibles d'avoir à la fois des effets santé et sensoriels (Chen *et al.*, 2012). Ces produits végétaux fermentés sont généralement obtenus à partir de communautés microbiennes composées de plusieurs espèces (Tamang *et al.*, 2016b). Qu'il s'agisse de la fermentation de produits animaux tels que les fromages, ou de la fermentation de produits végétaux, ce sont les communautés microbiennes d'une part et les conditions environnementales dans lesquelles ces dernières se développent d'autre part, qui sont à l'origine de la diversité des propriétés sensorielles des produits finis. Ainsi, la formulation microbienne et le fonctionnement de l'écosystème au cours de la fermentation sont des étapes clés à l'origine de la typicité des produits fermentés.

Partant de ce constat, la question générale de recherche de ce projet de thèse peut être formulée ainsi : « **Quels sont les bénéfices sensoriels de la fermentation d'un gel enrichi en protéines végétales ?** ». Le pois a été choisi comme protéine végétale « modèle » sur la base de ses défauts sensoriels très souvent mis en avant dans la littérature d'une part, et pour un intérêt grandissant des acteurs de l'industrie alimentaire pour cette protéine, d'autre part. Il s'agissait donc de comprendre comment concevoir une communauté microbienne adaptée à des matrices protéiques en fonction des cibles sensorielles recherchées. Pour cela, nous nous sommes attachés à démontrer un concept de formulation d'aliments fermentés enrichis en protéines de pois, présentant des qualités sensorielles améliorées sur la base de la connaissance des écosystèmes laitiers.

Le premier chapitre de ce manuscrit est consacré à l'état de l'art des connaissances actuelles sur la fermentation des protéines végétales. La composition des protéines de pois, leurs méthodes d'extraction et les méthodes de gélification possibles pour former des gels protéiques sont détaillés dans une première partie. Puis les défauts sensoriels de ces protéines sont présentés ainsi que leurs origines. La troisième partie de cette partie bibliographique porte sur les différents produits fermentés végétaux, en particulier à base de soja, les espèces dominantes présentes dans ces produits et les différentes approches possibles pour la sélection de consortia microbiens. En parallèle, sont décrits le procédé de fabrication du fromage et les différentes espèces susceptibles de s'implanter en surface et en cœur des fromages ainsi que leurs principales activités enzymatiques impliquées dans des fonctionnalités majeures en termes de production d'arômes, d'acidification et de protéolyse. Enfin, la stratégie proposée pour répondre aux questions de recherche est explicitée à la fin de ce premier chapitre.

Le second chapitre du manuscrit présente les résultats associés à ces expérimentations. Il est composé de 4 sous-parties, rédigées en anglais sous forme d'articles (déjà publiés ou sous la forme de projets d'article). Le troisième chapitre propose une synthèse des principaux résultats issus de ces travaux de thèse et leurs discussions. Le manuscrit se conclut en présentant les principales perspectives envisagées

pour la poursuite de cette thématique de recherche.

Chapitre I. Etude bibliographique

L'objectif de la première partie de cette étude bibliographique est une synthèse des principales connaissances de la littérature sur la composition protéique de la graine de pois, les méthodes d'extraction existantes pour l'obtention d'isolats protéiques ainsi que leurs propriétés fonctionnelles avec en particulier les différents modes de gélification étudiés.

I.1. Protéines de pois : composition, extraction et propriétés fonctionnelles

I.1.1. Composition protéique

Les protéines représentent une des fractions majeures des constituants de la graine de pois. Cette fraction, qui représente 25 à 30% des constituants de la graine sèche, constitue le deuxième constituant majoritaire de la graine, le premier étant l'amidon ($\approx 50\%$). On trouve ensuite les fibres ($\approx 20\%$) et les matières grasses ($\approx 2,5\%$) (% exprimés sur une base Matière Sèche) (Tzitzikas *et al.*, 2006). Comme dans la plupart des protéines, les protéines de pois sont des protéines globulaires. Elles se classent en deux grandes familles selon les critères de solubilité définis par Osborne et Campbell (1898) ; les albumines solubles dans l'eau (qui représentent 20 à 30% des protéines totales) et les globulines solubles dans des tampons salins (qui représentent 55 à 65 % des protéines totales). Il existe aussi environ 10 à 15 % de protéines insolubles. La **figure 2** résume la composition et les caractéristiques de chaque fraction protéique.

I.1.1.1. Globulines

Les globulines sont constituées principalement de deux fractions caractérisées par des coefficients de sédimentation différents : la légumine « 11S » et la viciline/convicine « 7S » (**Fig2**). Contrairement aux albumines, les globulines ont une composition caractéristique des protéines de réserve, riche en acides aspartique et glutamique et leurs amides correspondants, ainsi qu'en arginine.

I.1.1.2. Albumines

La fraction albumine regroupe la plupart des protéines qui présentent une activité biologique telles que des activités enzymatiques ou des inhibiteurs. La fraction albumine diffère de la fraction globuline par sa masse molaire plus faible qui varie entre 10 kDa et 100 kDa, alors que pour les globulines la masse molaire peut atteindre plusieurs centaines de kDa. Généralement, les albumines présentent des teneurs élevées en lysine et en acides aminés soufrés, comme la méthionine et la cystéine. La structure de ces protéines est associée à une quantité élevée de ponts disulfures qui affectent leur résistance à la dénaturation thermique. Les albumines (2S) ont une composition beaucoup plus hétérogène que celle des globulines, mais il existe néanmoins deux albumines majeures appelées PA₁ et PA₂ (**Fig2**).

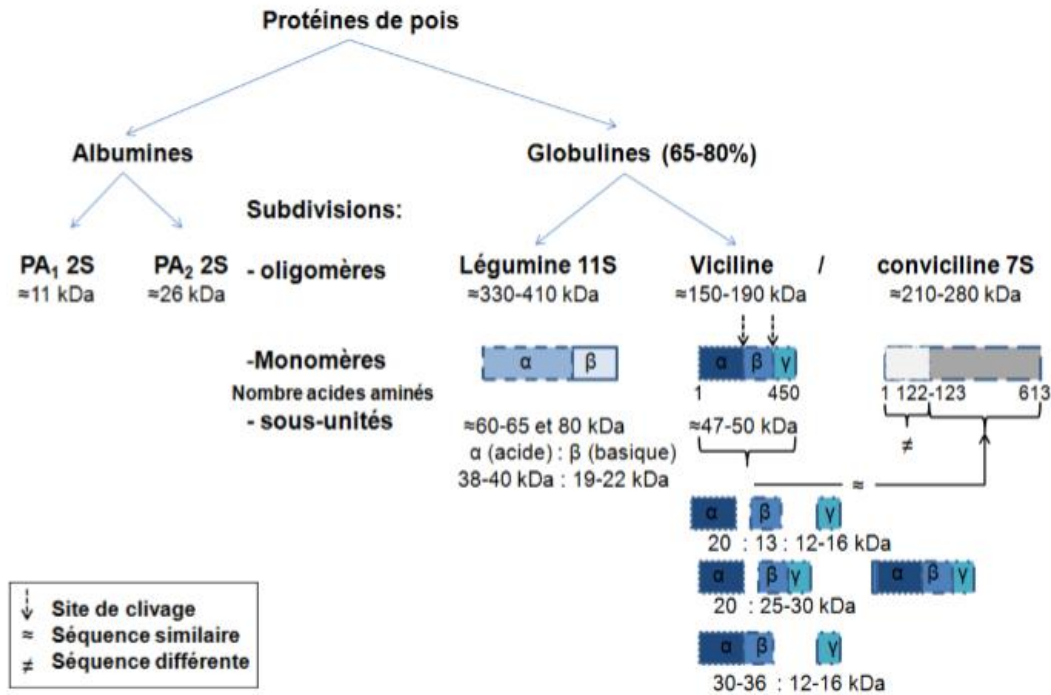


Figure 2. Composition et caractéristiques des protéines de pois et assemblage des sous-unités consécutives de globulines de pois 7S et 11S (Mession, 2012)

I.1.1.3. Acides aminés

Le **Tableau S1 (Annexe 1)** présente les compositions en acides aminés, pour les deux fractions séparées de pois : globulines et albumines. Les globulines sont les plus utilisées en industrie alimentaire. La composition en acides aminés essentiels du pois est particulièrement riche en lysine, isoleucine, acide glutamique, acide aspartique et arginine (Gueguen, 1991; Boye *et al.*, 2010). Par contre, les protéines du pois sont déficientes en tryptophane et ont un contenu pauvre en résidus d'acides aminés soufrés, ce qui les oppose aux protéines de lait.

La différence entre protéines végétales (Pois) et animales (Lait) repose pour partie dans leur composition en acides aminés avec certains acides aminés indispensables qui se retrouvent limitant dans le cas du pois comme pour de nombreuses protéines végétales. Les protéines animales présentent quant à elles, un profil équilibré en acides aminés essentiels, proche des besoins physiologiques de l'Homme. Il reste très facile de pallier au déficit en certains acides aminés des protéines végétales en mélangeant par exemple les sources de protéines végétales entre elles ou avec des protéines animales (Chardigny and Walrand, 2016).

I.1.2. Méthodes d'extraction des protéines

I.1.2.1. Objectif

L'extraction suivie de la concentration des protéines est un moyen efficace pour séparer les protéines des constituants non protéiques du végétal et obtenir un ingrédient alimentaire présentant des propriétés techno-fonctionnelles intéressantes telles que des propriétés émulsifiantes ou moussantes. La préparation obtenue est homogène et riche en protéines. On parle alors de concentrats ou d'isolats protéiques en fonction de la teneur en protéines obtenue après extraction (teneur en protéines comprise entre 65 et 90% pour les concentrats et supérieure à 90% pour les isolats) Ces fractions contiennent donc un taux de protéine plus élevé par rapport à leurs matières initiales. Il est important que les méthodes d'extraction mises en œuvre soient dites « douces », pour préserver au mieux la conformation et, par conséquent, les fonctionnalités des protéines extraites.

Différentes opérations et méthodologies permettent l'obtention d'isolats protéiques de pois de qualité variable, dont dépendront leurs propriétés physicochimiques et fonctionnelles futures.

I.1.2.2. Prétraitement de la graine

Afin de favoriser l'extraction des protéines de la graine, deux prétraitements sont nécessaires. Le premier est le décorticage qui a pour but de séparer la graine en deux parties : une fraction « coques » et une fraction « amandes » suivi d'une séparation associant souvent tamisage (séparation selon la taille des fragments) et tri densimétrique (séparation selon la densité) (Kaysi and Melcion, 1992). Le deuxième traitement est le broyage qui a pour but de réduire les composants de la graine (ou d'un ensemble de matières premières) en particules de granulométrie désirée afin de permettre un mélange plus homogène et plus stable. Les rendements (débit horaire et énergie spécifique) et les caractéristiques granulométriques du produit sont fonction de nombreux paramètres dont les plus significatifs sont le diamètre des trous de la grille et la vitesse de percussion des marteaux (Kaysi and Melcion, 1992).

I.1.2.3. Extraction par voie humide

Les procédés de fractionnement dit « humides » sont la technologie la plus utilisée pour produire des isolats de protéines végétales. Au cours de ce procédé, le matériau de départ (graine) est réduit en taille et ensuite dilué dans l'eau à différents pH pour obtenir une dispersion complète des tissus et permettre l'extraction des différents constituants de la matière végétale, c'est-à-dire les fractions protéiques, amidon et lipidique. Le fractionnement par voie humide implique souvent les étapes suivantes :

- Préparation d'une suspension de farine
- Extraction sous des conditions alcalines ou acides
- Précipitation isoélectrique ou concentration par ultrafiltration,
- Séchage.

Les procédés de fractionnement par voie humide peuvent permettre d'aboutir à des isolats de

protéines relativement purs (> 90 %). Un inconvénient est que les processus humides sont liés à l'utilisation de grandes quantités d'eau et d'énergie, ce qui induit le retraitement de grandes quantités d'effluents. Une autre limite de cette technologie est la difficulté à obtenir des fractions protéiques présentant une conformation native, puisque le principe du fractionnement est fondé sur des changements de pH et la température. Ces importantes contraintes peuvent influencer négativement les propriétés fonctionnelles des protéines isolées (Schutyser and van der Goot, 2011). Deux procédés sont utilisés par voie humide pour concentrer les protéines extraites : l'ultrafiltration et la précipitation isoélectrique. Ainsi, dans le cas du pois par exemple, les propriétés fonctionnelles des protéines sont différentes selon le procédé utilisé : celles récupérées par ultrafiltration présentent des propriétés fonctionnelles (solubilité, activité émulsifiante, activité moussante et capacité de rétention d'huile) améliorées par rapport à celles obtenues par précipitation (Fuhrmeister and Meuser, 2003).

a. Précipitation isoélectrique

La précipitation isoélectrique est basée sur le changement des conditions environnementales des protéines modifiant leurs propriétés physiques et donc leur solubilité. Ce procédé a été largement utilisé pour l'extraction des protéines de pois (Makri *et al.*, 2005; Pelgrom *et al.*, 2015; Shand *et al.*, 2007). Il consiste à extraire les protéines à partir de la farine de pois par solubilisation de la poudre dans un tampon alcalin (pH 7-8), l'insoluble est éliminé par centrifugation, puis les protéines sont précipitées par addition d'acide jusqu'à ce que le point isoélectrique soit atteint (pH ~ 4,5). Dans ce domaine de pH, les globulines peuvent être altérées car elles sont glycosylées ou phosphorylées (Marcone, 1999). L'acidification de l'extrait brut doit s'opérer progressivement, sans chauffage pour garder au maximum les propriétés natives des globulines (Fuhrmeister and Meuser, 2003). Les globulines extraites sont re-solubilisées à pH alcalin (>7) par ajout d'une solution de soude. La suspension protéique est enfin séchée par atomisation ou lyophilisation.

b. Procédés membranaires

Les procédés à membrane sont utilisés pour séparer et surtout concentrer des molécules ou des espèces ioniques en solution et/ou pour séparer des particules ou des micro-organismes en suspension dans un liquide ; ces procédés sont basés sur la mise en œuvre de membranes perméables. Les procédés membranaires sont des techniques de filtration tangentielle basées sur l'effet d'un gradient de pression qui permettent de séparer des molécules en fonction de leurs masses moléculaires. En fonction de la taille des pores de la membrane utilisée et donc de leur seuil de coupure, on distingue la microfiltration (MF) pour la filtration de molécules ou particules de 0,1 à 1 µm et l'ultrafiltration (UF) lorsque les tailles sont plus petites (≈ 0,001 – 0,1 µm) (Selmane, 2010). La séparation par membrane des globulines de pois s'effectue par solubilisation à pH alcalin des protéines suivie d'un passage à travers une membrane. La séparation du matériel protéique avec les autres constituants s'opère sur la base des masses moléculaires

(seuil de coupure des membranes utilisées compris généralement entre 50 et 100 kDa) – les globulines sont retenues dans le rétentat alors que les plus petites molécules (oligosaccharides, sels...) sont éliminées dans le perméat. L'efficacité de la séparation entre matériel protéique et non protéique est affectée par la conduite du procédé (débit de rétentat, nature et seuil de coupure de la membrane, temps de filtration...) (Boye *et al.*, 2010).

I.1.2.4. Extraction par voie sèche : turbo séparation

Le fractionnement à sec est extrêmement plus économe en énergie que le fractionnement humide. En outre, cette méthode permet la production de fractions enrichies en protéines, tout en préservant au mieux leurs conformations natives. Le fractionnement par voie sèche est le plus souvent employé sur les légumineuses et les céréales. En effet, la structure spécifique des tissus de ces sources végétales leur confère une bonne aptitude au fractionnement sec (Schutyser and van der Goot, 2011).

La turbo séparation a été utilisée pour fractionner les farines de pois et a permis l'obtention d'une fraction enrichie en protéines (51-55 % MS) (Pelgrom *et al.*, 2013). La séparation est effectuée sur la base de deux systèmes : un système de broyage et un système de sélecteur. La séparation est réalisée sur la taille, la forme et la densité des particules renfermant les granules d'amidon et corpuscules protéiques (Boye *et al.*, 2010). L'étape de broyage définit la qualité des protéines recueillies. Un broyage trop fin augmente le pourcentage d'amidon endommagé et affecte négativement la séparation. Un broyage grossier conduit à la présence dans les fractions d'agrégats de protéines, de granules d'amidon et d'autres composants de la cellule et conduit à une mauvaise séparation de particules riches en amidon de celles riches en protéines (puisque leurs tailles sont similaires). Les corpuscules protéiques du pois ont une taille de 1-3 µm et la dimension des granules d'amidon est en moyenne de 22 µm (Pelgrom *et al.*, 2013).

I.1.3. Propriétés fonctionnelles des protéines de pois

Outre leur valeur alimentaire, les protéines végétales possèdent également des propriétés physico-chimiques qui permettent de les employer avantageusement en technologie alimentaire en tant qu'ingrédient. C'est ainsi qu'elles sont utilisées à des fins d'émulsification, de gélification, de foisonnement, ou encore d'absorption et de rétention des graisses et de l'eau (Tab1).

Ces propriétés varient en fonction de la nature des protéines, de leur concentration, de leur procédé de fractionnement et des conditions expérimentales mises en œuvre pour la conception du produit alimentaire (pH, température, force ionique,..). Le large spectre des propriétés techno-fonctionnelles des protéines végétales permet leur utilisation dans de nombreuses applications telles que pour des aliments à base de viande, le pain, la pâtisserie, les produits diététiques, ou encore les analogues de produits laitiers.

Les globulines de pois présentent de nombreuses propriétés techno-fonctionnelles potentielles,

variables selon la source protéique et le cultivar considérés (Kimura *et al.*, 2008).

Tableau 1. Propriétés conférées par les protéines de légumineuses dont celles du pois aux systèmes alimentaires (Utsumi, 1992)

Propriétés physico-chimiques	Propriétés fonctionnelles	Mode d'action	Systèmes alimentaires
Hydratation	Solubilité Absorption et rétention d'eau	Solubilité des protéines Rétention d'eau Liaisons hydrogènes	Boissons Viandes Saucisses Pain Biscuits
Structure-rhéologie	Viscosité Propriétés gélifiantes Cohésion-adhésion Elasticité	Epaississant Fixation d'eau Formation d'une matrice protéique Protéines agissant comme adhésif Liaisons non covalentes et ponts disulfures dans gluten et gels	Soupes, Sauces Viandes caillés fromages Viandes, fromages, pâtes Viandes et produits boulangers
Propriétés de surface	Propriétés émulsifiantes Adsorption de lipides Fixation d'arômes Propriétés moussantes	Formation et stabilisation des émulsions Fixation des lipides Absorption rétention libération Formation de films stables	Saucisses, soupes, gâteaux Viandes, saucisses, beignets Produits boulangers Gâteaux de savoie Crème fouettée

1.1.3.1. Solubilité des globulines végétales/ du pois

a. Notion de solubilité

La solubilité des protéines est définie par la quantité de protéines solubilisées dans le milieu d'intérêt par rapport à la quantité de protéines introduites initialement. La mesure de l'azote total (méthode de kjeldhal) dans chacune des phases permet de déterminer l'index de solubilité de l'azote (nitrogensolubility index, NSI %, m/m). Pour le calcul de la teneur en protéines à partir de l'azote total il est nécessaire d'utiliser un facteur de conversion. Celui-ci est de 5.6 dans le cas des protéines de pois (Boye *et al.*, 2010) alors qu'il est de 6.38 pour les protéines du lait (Maubois and Lorient, 2016). La solubilité des protéines dépend du pH et de la composition/concentration en sels de la solution. L'environnement ionique du solvant conditionne la distribution des acides aminés hydrophiles/hydrophobes sur les chaînes polypeptidiques exposées au solvant (Kimura *et al.*, 2008). Une « bonne » solubilité va de pair avec des conditions optimales pour l'émulsification, le foisonnement et la gélification.

b. Effet du pH

A de faibles forces ioniques, les globulines de pois montrent un domaine de minimum de solubilité à des pH compris entre 4 et 5,5 (Ladjal-Ettoumi *et al.*, 2016; Messio *et al.*, 2015; Shand *et al.*, 2007). La solubilité augmente fortement de pH 6 à 7 et atteint des valeurs de 70 à plus de 90% à des pH alcalins (7-9).

Des conditions acides (pH<4) sont également favorables à la solubilisation des protéines végétales et notamment de pois (**Fig 3**). Il a été montré que les protéines de pois et soja obtenues à l'échelle laboratoire présentent une meilleure solubilité que les extraits obtenus à l'échelle industrielle (2%NaCl) (**Fig3**). Cette différence peut être expliquée par l'impact des conditions d'extraction des protéines sur leur état de dénaturation.

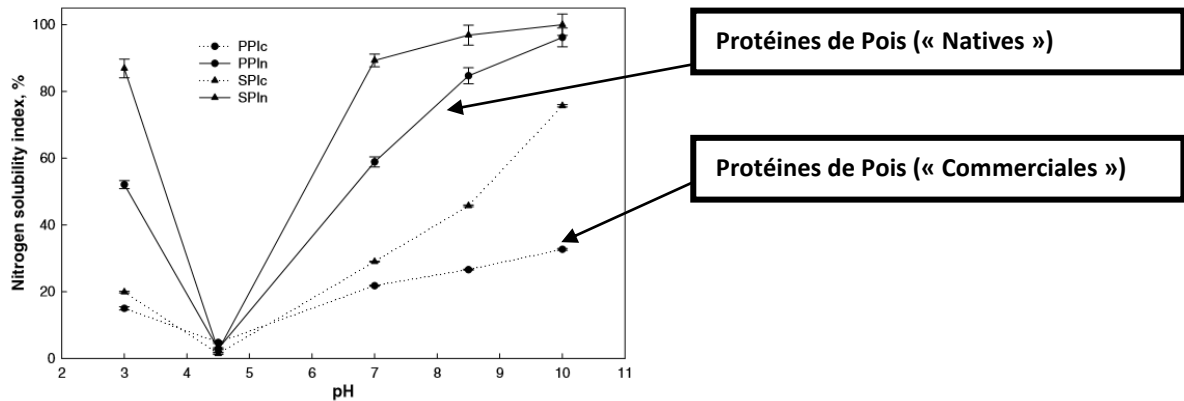


Figure 3. Solubilité des protéines de pois (natives et commerciales) et des protéines de soja en fonction de pH-extraction par voie humide -PP = Protéine de pois, SP = protéine de soja, les indices 1c et 1n indiquent respectivement les conditions d'obtention à l'échelle labo (conditions « natives ») et à l'échelle industrielle (« commerciales ») (Shand *et al.*, 2007)

c. Effet de la nature/composition en sels

L'écrantage des charges de surface des protéines va réduire les répulsions électrostatiques entre elles. Pour des ajouts modérés en sels, la solubilité des protéines peut être améliorée ; il s'agit là d'un effet de « salting-in ». A l'opposé, de trop fortes concentrations en sels vont insolubiliser les protéines par effet de « salting-out ». Pour des pH inférieurs à 5-6, [Kimura *et al.*, \(2008\)](#) ont montré que la solubilité des globulines 11S de pois diminuait fortement à une force ionique I=0,5. La précipitation des globulines 7S se produisait à pH proche de 2.

1.1.3.2. La gélification des protéines

L'une des propriétés des protéines végétales et notamment des protéines de pois, très recherchées dans la formulation des produits alimentaires, demeure leur aptitude à gélifier. La gélification correspond à une agrégation ordonnée des protéines plus ou moins dénaturées.

Il y a formation d'un réseau tridimensionnel où les polymères interagissent entre eux et avec le solvant. Il existe plusieurs voies de gélification possibles pour les protéines globulaires. Dans cette partie on s'intéressera à trois types de gélification : thermique, chimique et enzymatique

a. Dénaturation et gélification thermique

La dénaturation est la perte de la structure native de la protéine ce qui peut conduire dans certaines conditions à la formation d'un réseau protéique ou un gel. Un changement des variables externes

du système protéine/solvant, telles qu'une température (ou une pression) élevée, un pH extrême ou encore la présence d'alcool ou de tensioactif en grande quantité, peut être à l'origine d'une dénaturation.

Dans ce paragraphe nous allons principalement faire référence à la dénaturation thermique.

Cette méthode de gélification consiste en un chauffage (au-dessus de la température de dénaturation des protéines employées) et un refroidissement d'une solution concentrée de protéines (au-dessous de la concentration critique de gélification thermique). Le processus de formation de ce type de gel semble similaire quelles que soient les protéines employées : qu'elles soient d'origine animale (dans notre étude, les protéines de lactosérum de lait) ou végétale (globulines de pois) (Clark *et al.*, 2001). Dans un premier temps, le chauffage induit une dissociation des sous-unités protéiques s'accompagnant d'un dépliement des chaînes et à l'exposition d'un plus grand nombre de résidus hydrophobes. Dans un second temps, les molécules dépliées vont former des agrégats via des ponts disulfures, des liaisons hydrogène, des interactions hydrophobes, et/ou des forces de van der Waals.

La gélification thermique des protéines globulaires de pois est un phénomène assez bien connu qui a fait l'objet de plusieurs publications dans littérature ces dernières années (Chihi *et al.*, 2016; O'Kane *et al.*, 2004; Shand *et al.*, 2007; Sun and Arntfield, 2011a). O'Kane *et al.*, (2005) ont montré sur plusieurs isolats commerciaux de protéines de pois de cinq cultivars différents que la concentration minimale de gélification thermique des globulines non séparées était de l'ordre de 16% (m/v), pour un pH de 7,6 et une faible force ionique. Par ailleurs, Sun and Arntfield, (2010) ont obtenu des gels protéiques pour des gammes de concentrations en protéines comprises entre 5,5% et 18% (m/v), pour un pH de 5,6 et une concentration de 0,3 M de NaCl. La température de dénaturation des globulines dépend des conditions extrinsèques du solvant (pH, Force ionique). En effet, Sun and Arntfield, (2010) ont montré qu'un ajout modéré de NaCl réduit par écrantage des charges les répulsions inter- et intra-chaînes, ce qui tend à stabiliser la conformation de la protéine en solution et ainsi à élever la valeur de température de dénaturation. Dans une autre étude, Sun and Arntfield, (2012) ont montré que les sels comme NaSCN ont un effet déstabilisant sur les globulines de pois ; la forte charge des ions SCN⁻ augmente les répulsions et favorise la dénaturation à des valeurs de température de dénaturation plus basses.

Le type des agrégats protéiques formés dépend principalement de la nature, de la concentration protéique initiale, du couple temps/température ainsi que des facteurs extrinsèques du milieu qui vont affecter les interactions inter-protéines. Il en résulte des modes d'agrégation et des types d'agrégats différents qui définissent les interconnexions dans le réseau protéique (Fig4), et les propriétés mécaniques finales des gels (Bryant and McClements, 1998; Clark *et al.*, 2001; Langton and Hermansson, 1992). On distingue les agrégats filamenteux ou fibrillaires, produits lorsque les répulsions électrostatiques entre protéines partiellement dépliées sont fortes (pH éloigné de pI, force ionique faible). Ces gels sont

transparents à faiblement translucides, résultat d'un processus d'agrégation homogène, dont les filaments protéiques d'un diamètre inférieur à 50 nm forment un réseau infini. Les deuxièmes types d'agrégats sont les agrégats amorphes, qui sont obtenus à un niveau plus bas de répulsions électrostatiques. L'agrégation est plus rapide et plus aléatoire, aboutissant à des masses protéiques denses et sphériques. Ces gels sont plutôt opaques reflétant une agglomération de particules volumineuses (>1 µm). Le réseau protéique formé est plus grossier et de densité hétérogène, aussi des pores de solvant peuvent apparaître augmentant les phénomènes de synérèse.

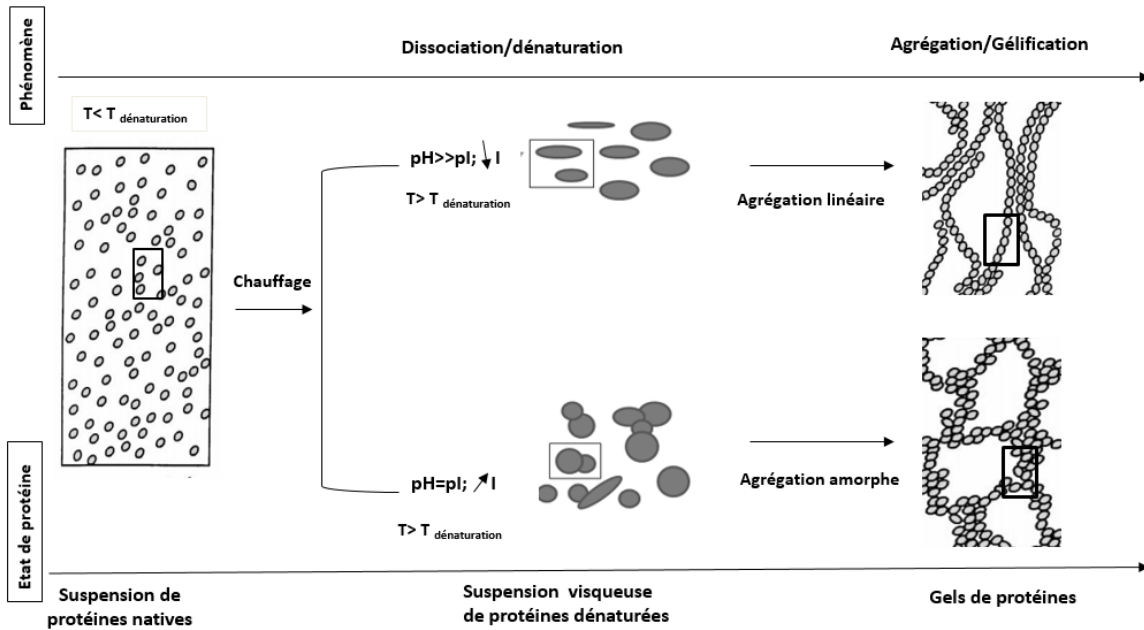


Figure 4. Mécanisme général de dénaturation/agrégation thermique de globulines en fonction des paramètres du solvant appliqués, pI : pH isoélectrique, force ionique faible ; force ionique élevée (d'après Bryant and McClements, 1998; Clark *et al.*, 2001)

Peu d'études sont disponibles sur la co-géification des protéines de lait (lactosérum) et globulines de pois (Chihl *et al.*, 2016; Wong *et al.*, 2013). Ces études montrent que les protéines de pois peuvent renforcer les propriétés rhéologiques (G') des gels mixtes par la formation des nouveaux ponts disulfures entre les sous unités des protéines dénaturées. Récemment, (Mession *et al.*, 2017a) ont étudié les interactions induites par un traitement thermique entre des globulines de pois (viciline 7S ou légumine 11S) et des micelles de caséines en suspension à une concentration de 18 à 36 mg protéine /g produit (rapport 1 :1, pH 7,1, Traitement thermique « 40 à 85°C / 60min »). Ils ont montré que dans le mélange des protéines, la température de dénaturation pour chaque fraction augmente de 4°C par rapport à celle des protéines de pois toutes seules, ce qui peut être expliqué par le pouvoir stabilisant des caséines contre la dénaturation. La formation des agrégats est probablement due aux interactions entre les légumine et vicilines dénaturées et donc, les micelles de caséines ne s'impliqueraient pas dans l'agrégation des protéines de pois.

b. Gélification par voie chimique

Alternativement, ce type de gélification est obtenu en diminuant les répulsions entre les agrégats protéiques. Dans ce type de gélification, deux étapes sont indispensables. Il s'agit donc dans un premier temps (i) de chauffer et d'incuber à une température proche de la température de dénaturation de la solution protéique et en assurant un maximum de répulsions électrostatiques (pH éloigné du pI, absence de sels). La solution contient alors des agrégats solubles et stables. Puis dans un deuxième temps à température ambiante(ii), la diminution des répulsions électrostatiques entre agrégats est effectuée, ce qui entraîne leur assemblage. Les stratégies les plus utilisées pour ce type de gélification sont : l'ajout de sels ou l'acidification progressive. Cette méthode de gélification est utilisée pour les protéines de lactosérum (Bryant and McClements, 2000; Remondetto and Subirade, 2003), ou pour les produits fermentés à base de soja telque le tofu (Maltaiset *al.*, 2008).

➤ **Gélification par ajout de sel**

La présence des sels conduit à des interactions avec les groupements carboxylate à la surface des agrégats, ce qui induit un écrantage partiel ou total des charges négatives. Le sulfate de calcium est essentiellement le plus utilisé en tant que coagulant pour la formation des produits fermentés tels que le tofu. Ce coagulant a une faible solubilité dans l'eau, il réagit lentement avec le substrat et cela permet la formation d'un caillé avec une grande capacité de rétention d'eau (Kao *et al.*, 2003). L'ajout de cations divalents (calcium), outre le fait qu'ils génèrent une plus haute force ionique à des concentrations plus faibles que des ions monovalents, permet la formation de ponts salins entre agrégats à l'origine du réseau protéique tridimensionnel. Le mode d'association des agrégats (fibrillaires à amorphes) dépend clairement de la quantité de calcium ionique apporté (Maltais *et al.*, 2008).

➤ **Gélification par acidification par GDL (Glucono- δ -Lactone)**

L'acidification des protéines pré agrégées peut s'effectuer par une acidification graduelle. L'objectif est d'amener la solution à un pH à l'équilibre proche du pI, de l'ordre de 4-5 pour les protéines de pois par exemple. L'agent d'acidification le plus employé est un additif alimentaire (E575) : la glucono- δ -lactone (GDL).

Cette stratégie a été développée sur des solutions de protéines de lait pré agrégées (Lucey and Singh, 1998)et plus récemment utilisée pour la coagulation des protéines de pois (Mession *et al.*, 2015). L'avantage de cette méthode serait une plus grande flexibilité dans la cinétique de réduction des répulsions électrostatiques (Ju and Kilara, 1998). La lente hydrolyse de la GDL en acide gluconique libère des protons en solution. La vitesse d'acidification et le pH à l'équilibre dépendent de la concentration en sels, en protéines et de la température. La modulation du rapport de concentrations protéines/GDL permet de jouer sur la vitesse de gélification du système.

Une étude récente de [Mession *et al.*, 2017b](#) a étudié la coagulation des fractions de protéines de pois (Viciline 7S et légumine 11S) en présence ou en absence de micelles de caséine. La gélification a été réalisée par un traitement thermique suivi d'un ajout de GDL à 20°C (pour une concentration en protéines de 3,6% et un ratio de 1 :1 de chaque type de protéine, pH initial =7.1). Deux procédés de coagulation ont été étudiés (i) les protéines (pois et caséines) sont chauffées ensemble et (ii) les protéines de pois sont chauffées séparément pour obtenir des agrégats solubles puis mélangées avec les micelles de caséines (**Fig5**). Le premier procédé de gélification a conduit à des fortes augmentations des modules rhéologiques (G') dans le cas des Viciline. Toutefois, pour le deuxième procédé, où les protéines sont chauffées séparément, les protéines de pois (excepté les légumine) se comportent différemment. Le gel est formé à un niveau d'acidification plus faible (pH proche de 5) et à une vitesse plus rapide. Par conséquent, le deuxième procédé serait plus efficace pour produire un produit gélié plus homogène contenant des protéines de pois et avec des propriétés de texture améliorées.

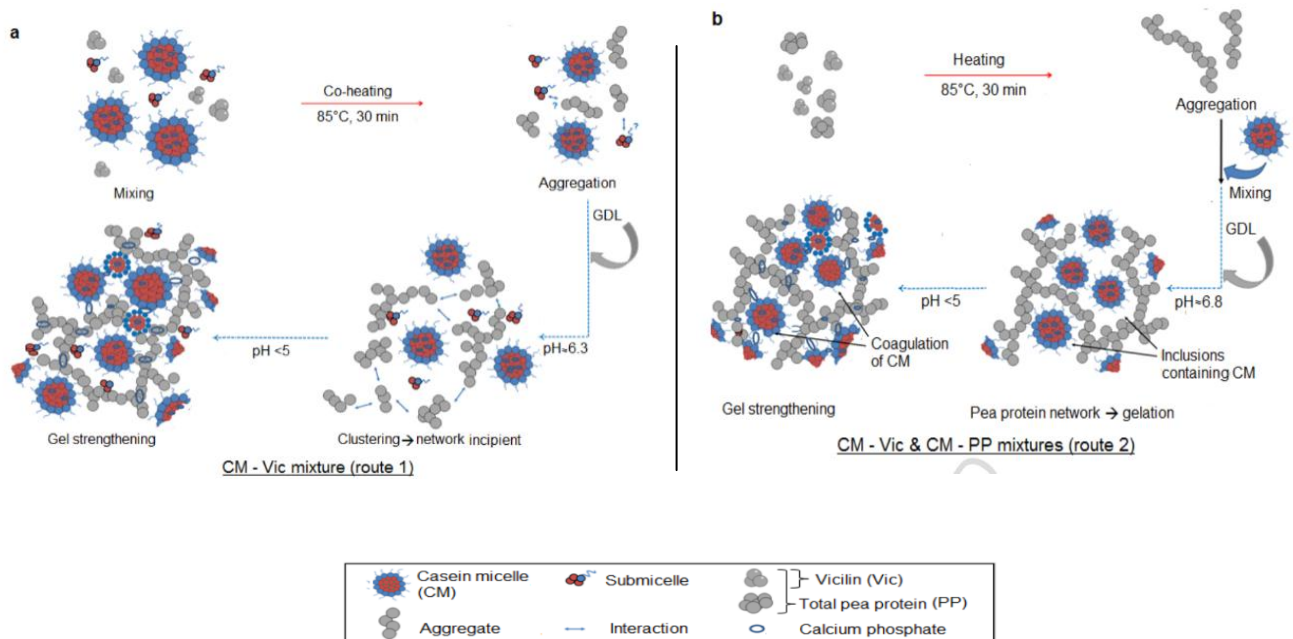


Figure 5. Mécanisme de dénaturation thermique et d'agrégation de mélange protéique (protéines de pois et caséines) suivi d'une gélification par GDL à 20°C Viciline chauffée en présence de caséines b) viciline et protéines de pois chauffées seules puis mélangées ensuite avec les caséines – (Mession *et al.*, 2017b)

c. Gélification par voie enzymatique

➤ Transglutaminase

La transglutaminase (TGase) est une aminoacyltransférase qui permet de créer une liaison covalente entre un amide de résidu glutamique et une amine primaire de résidu lysine ou d'extrémités de chaîne. La réaction se déroule avec libération d'une molécule d'ammoniac (**Fig6**). La TGase est utilisée pour catalyser la réticulation des chaînes protéiques, aussi bien d'origine animale que végétale, et pour modifier leurs

propriétés fonctionnelles soit à l'état natif ou dénaturé (Gerrard, 2002). Les propriétés texturales et rhéologiques (dureté, cohésion, contrainte de cisaillement...) des gels obtenus par utilisation de TGase sont modifiées. Les globulines de pois sont considérées comme un bon substrat pour la transglutaminase (TG) et leur réticulation a été largement décrite dans la littérature (Djoullah *et al.*, 2015; Shand *et al.*, 2008; Sun and Arntfield, 2011b). Il en est de même pour les protéines de lait et en particulier pour les caséines. En revanche, Les protéines de lactosérum sont beaucoup moins susceptibles de participer à des réactions de réticulation par la TGase, principalement à cause de leurs conformations globulaires stables qui limitent l'accès aux sites de réticulation (Bönisch *et al.*, 2007; Gaspar and de Góes-Favoni, 2015).

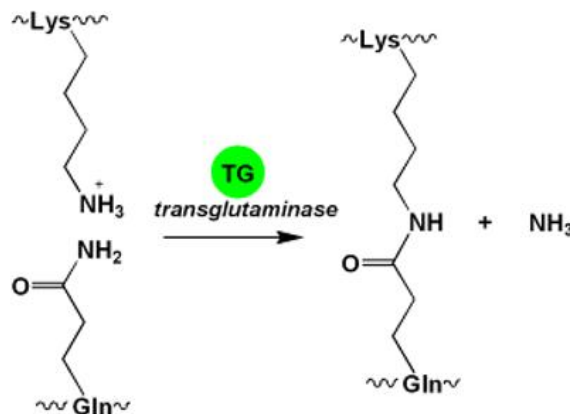


Figure 6. Représentation de la réticulation de protéines par la transglutaminase – (D'après Gerrard, 2002))

Les propriétés des gels de protéines de pois en présence de TGase sont conditionnées par le rapport enzyme/substrat. Les gels obtenus avec un isolat de protéines de pois, traité enzymatiquement avec de la MTGase, ont été observés plus deux fois visqueux, en comparaison avec les échantillons sans addition de l'enzyme (Djoullah *et al.*, 2015).

➤ Chymosine

La chymosine est couramment utilisée dans l'industrie fromagère pour la coagulation du lait. Lors de la fabrication du fromage, la chymosine va hydrolyser une partie des molécules de caséine K, ce qui se traduit par une légère diminution de la viscosité et de la taille des micelles. Les micelles perdent alors leur stabilisation stérique et s'agrègent (Walstra *et al.*, 1990). En raison de l'activité protéolytique faible, la chymosine peut être utilisée pour améliorer les propriétés fonctionnelles des protéines végétales.

Barac *et al* (2011) ont étudié l'impact de cette enzyme sur les propriétés fonctionnelles des protéines de pois. Ils ont montré que cette enzyme a provoqué un degré d'hydrolyse faible mais qu'elle a amélioré de façon significative les propriétés fonctionnelles (solubilité, propriétés moussantes et émulsifiantes) des isolats protéiques surtout à des pH de 3 et 5. Ce résultat a pu être expliqué par une hydrolyse partielle des protéines insolubles.

I.1.4. Synthèse : les propriétés fonctionnelles des protéines de pois

Dans cette première partie, nous avons vu que l'utilisation des protéines végétales dans l'industrie alimentaire dépend de leurs propriétés fonctionnelles avec en particulier une propriété clé d'intérêt dans le cadre de ce travail de thèse : leur capacité de gélification. La coagulation des protéines pour l'obtention de gels est aujourd'hui bien documentée et reste possible par différentes voies, thermique, chimiques ou enzymatiques. Les propriétés d'agrégation et de gélification de différentes fractions de protéines de pois ont été ainsi étudiées. Cependant dans la plupart des cas, les études se focalisent uniquement sur la gélification des protéines de pois mais très peu de travaux concernent le comportement de mélanges de protéines et ils s'intéressent uniquement à de faibles teneurs en protéines totales. Un des premiers challenges de cette thèse a donc été d'étudier la gélification de matrices à haute teneur en protéines de pois mais aussi en association avec des protéines de lait en utilisant le même type de gélification.

Si les protéines végétales présentent des propriétés techno-fonctionnelles intéressantes, elles sont à l'origine de défauts sensoriels qu'il est important de bien comprendre et caractériser. Cette deuxième partie de l'état de l'art a donc pour objectif de réaliser une synthèse des connaissances liées aux propriétés sensorielles des protéines végétales (concentrats et/ou isolats protéiques), notamment leurs défauts sensoriels, en focalisant plus particulièrement sur celles des protéines de pois. Les connaissances relatives à l'origine de ces perceptions seront ensuite explorées. Puis, les solutions utilisées dans la littérature pour réduire et/ou masquer ces perceptions indésirables dans des produits alimentaires formulés seront présentées. Pour finir, une description des différentes méthodes sensorielles utilisées pour caractériser les défauts des protéines de pois dans les publications existantes sera présentée.

I.2. Les défauts sensoriels des protéines de pois et leur origine

I.2.1. Les défauts sensoriels

Le pois se caractérise par différentes notes sensorielles, qui peuvent être classées en deux familles de perception (**Tab2**) :

- Perception olfactive, issue des composés volatils, telle que l’odeur des notes vertes ou végétales (rapportées dans la littérature par le terme « beany »).
- Perception sapide, issue des composés non volatils telle que l’amertume, l’astringence mais aussi le gout métallique.

Tableau 2.Principales notes sensorielles de pois (Roland *et al.*,2017)

Type de composés	Notes sensorielles
Volatil	Vert Beany Pois Terreux Foin
Non volatil	Amer Astringent Métallique

Deux principaux types de défauts sensoriels sont associés aux protéines végétales et en particulier aux protéines de pois : la perception « beany » et la perception amère. Ces deux défauts sensoriels relèvent à la fois de perceptions olfactives et sapides. Ces défauts sensoriels ont été identifiés comme étant dépendants de la variation inter et intra espèces de pois, des conditions climatiques et culturelles, ainsi que des conditions de stockage (Azarnia *et al.*, 2011; Roland *et al.*, 2017). Les conditions d’extraction des protéines sont également déterminantes dans l’apparition de ces défauts (Murat *et al.*, 2013).

I.2.1.1. Perception de « beany »

a. Définition

La perception « beany » est multi sensorielle, elle est définie dans la littérature par des perceptions telles que les notes « moisi/terreux, poussiéreux, aigre, amidonné, poudré, pois, vert, et noisette » (VARA-UBOL *et al.*, 2004). Cette perception, connue par sa complexité, a été identifiée dans de nombreuses légumineuses comme le soja, la féverole ou encore le pois. Dans les produits à base de soja, cette note « beany » a été identifiée comme la cause majeure de rejet de la part des consommateurs des produits à base de protéines de soja (Kinney, 2003). La littérature est assez abondante concernant le soja, contrairement aux travaux sur le pois, qui sont peu nombreux.

b. Origine

Des aldéhydes responsables de la note « beany » ont été identifiés dans différentes variétés de pois vert et jaune. Ce sont principalement: (i) l'hexanal (vert, herbe et beany) (ii) le trans-2-heptenal (acre, beany et vert), le trans-2-octenal (feuille et vert) et le pentanal (acre, vert) (Azarnia *et al.*, 2011). L'hexanal et le pentanal sont les principales molécules produites suite à l'action de la lipoxygénase sur les acides gras insaturés présents initialement dans la matière première (Barra *et al.*, 2007). La molécule de 1-octanol, responsable de note noix et champignon, est l'alcool le plus abondant dans toutes les variétés de pois jaune et vert, par contre le 2-méthylpropanol, le 2-heptanol et le 3-méthylpropanol participant également aux notes beany (Bott and Chambers, 2006) n'ont été seulement détectés dans le pois jaune (Azarnia *et al.*, 2011). En ce qui concerne les cétones, la 2-butanone (note « solvant, piquant ») est la plus abondante dans le pois jaune et vert (Azarnia *et al.*, 2011). Ces composés volatils peuvent interagir avec les différents constituants de l'aliment, notamment les protéines modifiant ainsi leur perception (Guichard, 2002; Heng *et al.*, 2004; Plug and Haring, 1993).

Au cours du procédé d'extraction des protéines, la fraction volatile est impactée. Ainsi, Murat *et al.*, (2013) ont identifié la composition en molécules volatiles à chaque étape du procédé d'extraction et ils ont montré que la fraction protéique commerciale est finalement la plus riche en composés responsables de notes vertes. Certaines molécules ont été identifiées à chaque étape du procédé, telles que l'hexanal ; l'acide hexanoïque ou le 1-octanol, certaines ont été générées au cours du procédé telles que le 2-méthyl thiopropanal et l'heptanal, et enfin certaines ont été perdues comme le 1-hexanol ou le 1-nonanol. Du point de vue qualitatif, les aldéhydes restent, dans l'isolat protéique de pois, la famille la plus abondante en terme de diversité de molécules, puis on trouve les cétones et enfin les acides carboxyliques. D'un point de vue quantitatif, ce sont les cétones qui sont majoritaires, puis les alcools et enfin les aldéhydes. L'hexanal, l'heptanal, la 2-méthyl-3-heptanone et le (E,E)-3,5-octadien-2-one sont les molécules majoritaires dans l'isolat protéique de pois.

Ainsi, la perception des notes « beany » dépend principalement de la présence, de la concentration, de la combinaison et des interactions d'un grand nombre de molécules présentes dans le produit. En effet, dans une étude portant sur différents types de produits tels que le soja, le lait de soja et le tofu, (VARA-UBOL *et al.*, 2004) ont cherché à identifier les descripteurs sensoriels associés à la note « beany ». Pour cela, ces auteurs ont étudié la perception de 19 composants chimiques à différentes concentrations (1-100ppm). Ils ont montré que la perception de « beany » peut être modulée par la concentration de certaines molécules telles que le pentanol, le 3-méthyl-1 butanol et l'acétophénone, et avec l'apparition de notes plutôt sueur, rance et chimique (Tab3).

Tableau 3. Caractéristiques sensorielles (odeur) de certains composés chimiques responsables des notes « Beany » à une certaine concentration (VARA-UBOL *et al.*, 2004)

Chemicals	Odor characteristics at different concentration levels (ppm)*						
	1	10	100	1,000	5,000	10,000	100,000
3-methyl-1-butanol	← Beany →	←	←		Sweaty, Medicinal		→
Pentanol	← Beany →	←		Sweaty		→ ← Barnyard/Manure	→
1-octen-3-ol	← Musty/earthy	→ ←	Beany	→ ←	Musty/earthy, Green/dill, Chemical-like, Pungent		→
2,4-heptadienal	←	Beany	→ ←		Rancid oil, Fishy, Cinnamon		→
Acetophenone	← Beany →	←	Musty/earthy, Floral, Sweet	→ ←	Cherry, Bitter almond, Sweet	→ ←	Mothball, Cherry, Bitter almond
1-octen-3-one	← Beany →	←	Green/dill, Sour, Sweet, Musty/earthy	→ ←	Green/Dill, Sour, Musty/earthy, Green/Weed, Algae	→ ←	Spearmint, Green/grass
3-isopropyl-2-methoxypyrazine	← Beany →	←			Musty/earthy, Green/weed, Chemical-like, Pungent		→

Dans une autre étude réalisée avec un panel entraîné de 6 personnes, (Bott and Chambers, 2006) ont évalué l'origine de la note « beany », pour différentes solutions de molécules odorantes seules ou en mélanges. Les panélistes devaient noter l'intensité de la note « beany » par voie orthonasale, sur une échelle de 0 à 15 pour l'ensemble des solutions contenant les différentes molécules ou les différents mélanges. Cette étude a montré que certaines molécules sont décrites comme « non beany » quand elles sont toutes seules en solution (c'est par exemple le cas de l'hexanal, du pentanal, du trans-2,4-decadienal, du trans-2,4-nonadienal, du trans-2-hexenal, du trans-2-octenal, et du trans-2-nonanal), par contre elles peuvent contribuer à la note « beany » en présence d'autres molécules « beany » (c'est le cas de la 1-octen-3-one et du 3-methyl-1-butanol) ou en présence de molécules également non « beany » (comme le trans-2-nonanal) (Tab4). La plus forte intensité en odeur beany a été obtenue en combinant de la 1-octen-3-one et de l'hexanal.

Tableau 4. Caractéristiques sensoriels des combinaisons de molécules responsable ou non de notes beany à différentes concentration (1-1000 ppm).(Bott and Chambers, 2006)

Beany	Non-Beany	1	10	100	1000
1-octen-3-one	Hexanal	Beany			
1-octen-3-one	Trans-2-octenal	Beany		Waxy, Floral, Green, Chemical	
1-octen-3-one	Trans-2-nonenal	Beany		Musty/earthy, Chemical	
1-octen-3-one	Trans, trans-2,4-nonadienal	Beany		Chemical, Burnt	
1-octen-3-one	Trans, trans-2,4-decadienal	Beany			Weedy, Horseradish, Green, Nutty, Peanuts
3-methyl-1-butanol, 1 ppm	Hexanal	Beany			Scorched, Green
3-methyl-1-butanol, 1 ppm	Trans-2-octenal	Green	Beany		
3-methyl-1-butanol, 1 ppm	Trans, trans-2,4-nonadienal	Beany		Green, Chemical, Musty/dusty, Woody, Burnt	
3-methyl-1-butanol, 1 ppm	Trans, trans-2,4-decadienal	Beany			Musty, Chemical, Floral, Green
Beany	Beany				
1-octen-3-one	3-methyl-1-butanol	Cardboard	Beany	Sour, Chemical	
1-octen-3-one	Acetophenone	Beany		Lye, Leather	
1-octen-3-one	1-octen-3-ol (octenol)	Slight odor	Beany		Dill
3-methyl-1-butanol, 1 ppm	1-octen-3-one	Unidentified		Beany	Sour, Dill, Vegetation, Green bean
3-methyl-1-butanol, 1 ppm	Acetophenone	Lye	Beany		Hominy, Lye
3-methyl-1-butanol, 1 ppm	1-octen-3-ol (octenol)	Beany			Musty/Earthy, Musty/Dusty, Dill
Acetophenone	1-octen-3-one	Unidentified	Beany		Mushroom, Green, Sour
Non-Beany	Non-Beany				
Hexanal	Trans-2-nonenal	Beany			Cucumber, Green, Leather
Hexanal	Trans, trans-2,4-nonadienal	Beany			Cucumber, Musty/Earthy, Nutty
Hexanal	Trans-2-hexenal	Beany			Nutty, Cherry almond, Sunflower seed, Brown
Trans-2-octenal	Trans, trans-2,4-decadienal	Beany			Vegetation, Woody, Green Bean
Trans-2-octenal	Trans-2-hexenal	Beany			Green, Sweet, Almond, Rancid nuts, Floral
Trans-2-octenal	Pentanal (valeraldehyde)	Beany		Sour, Musty, Cheesy, Green	

Ainsi, l'origine des molécules responsables de la perception beany est en partie intrinsèque au pois mais également en partie développée lors de la récolte, le conditionnement et le stockage (Roland *et al.*, 2017). Un très grand nombre de molécules volatiles appartenant à différentes familles chimiques ont été identifiées comme pouvant être responsables de cette note « beany » dans le pois : aldéhydes, cétones, alcools, etc. (Tab4). L'origine de ces molécules est principalement expliquée par les mécanismes d'oxydation enzymatique des acides linoléique et linolénique présents dans les graines (Barra *et al.*, 2007; Oomah *et al.*, 2007).

La perception des notes « beany » apparaît comme très complexe dans la littérature et reste encore non totalement comprise et maîtrisée.

1.2.1.2. Perception de l'amertume

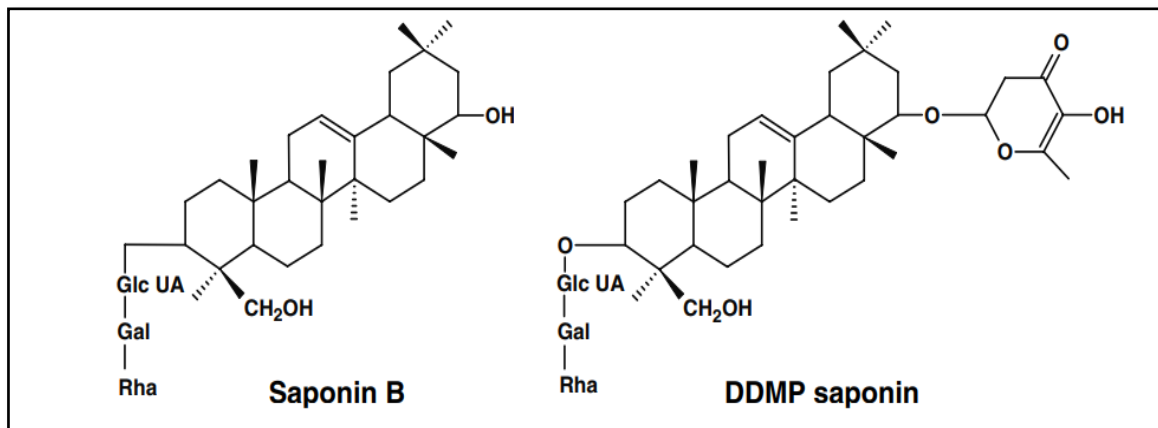
a. Définition

L'amertume est largement décrite comme un des défauts de nombreuses légumineuses et notamment le pois (Roland *et al.*, 2017). Elle peut causer le rejet de certains aliments. Il s'agit d'une perception complexe du fait de la multiplicité des récepteurs et molécules impliquées. En effet, 36 récepteurs, pouvant reconnaître une grande variété de molécules, ont été recensés (Meyerhof *et al.*, 2010). Il s'agit de récepteurs de type TAS2Rs aussi appelés T2Rs qui sont couplés à la sous-unité α de la protéine G. La forte variabilité interindividuelle peut être expliquée par les variations génétiques ou/et

environnementales (âge ou certaines pathologies) (Hansen, 2006).

b. Origine

D’une façon générale, la plupart des acides aminés hydrophobes sont caractérisés par une saveur amère. Les peptides formés par ces acides aminés (principalement L-Phe, L-Tyr, L-Trp, L-Leu, L-Val, L-Ile) sont également amers (Roudot-Algaron, 1996). Ainsi, l'amertume d'un peptide est dépendante des propriétés hydrophobes des acides aminés le constituant (Kato et al., 1989). L’amertume peut être liée également à la structure du peptide, par exemple, le blocage d'une extrémité C- ou N- terminale (formation d'une liaison peptidique) augmente l'amertume (Roudot-Algaron, 1996). Toutefois, au-delà des peptides et acides aminés, d’autres molécules ont été identifiées comme responsables de l’amertume dans le soja. Il s’agit des composés phénoliques (tels que les isoflavones, les acides phénoliques et les saponines) (Damodaran and Arora, 2013) et les acides chlorogéniques (Arai et al., 1966). Il a été montré dans plusieurs études que les saponines pourraient jouer un rôle sur la perception de l’amertume dans le pois comme le soja (Heng et al., 2006; Price et al., 1985; Price and Roger Fenwick, 1984). Ce sont des hétérosides complexes appartenant aux terpènes cycliques ou aux stéroïdes. Deux types de saponines, décrites comme amères, ont été isolés du pois ; saponine β ou DDMP (2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4Hpyran-4-one) et saponine B (Fig7).



‘Glc UA’, ‘Gal’ et ‘Rha’ sont l’acide gluconique, galactose et rhamnose respectivement – (Heng et al., 2006)

Figure 7. Structure des saponines B et DDMP présentes dans le pois.

Price et collaborateurs (Price et al., 1985) ont évalué en 1985 les défauts sensoriels de la farine de pois à l’aide d’un panel entraîné de 60 juges. 73% des juges ont trouvé les produits amers (Tab5). Ces auteurs ont aussi montré que l’amertume était détectée rapidement (après 30s de début du test) alors que l’astringence, autre défaut identifié, se développe après 1 à 3min.

Tableau 5. Descripteurs de saveurs et d’arômes indésirables dans la farine de pois (Price *et al.*, 1985)

<i>Description du gout</i>	<i>Pourcentage des juges qui ont noté ces descripteurs (60 juges au total)</i>
<i>Pea</i>	100
<i>Amer</i>	73
<i>Astringent</i>	70
<i>Métallique</i>	12
<i>Autres</i>	32

L’origine des notes « beany » et de l’amertume dans les produits à base de protéines végétales est diverse et pas encore clairement identifiée. L’intérêt croissant d’utiliser des protéines de pois dans les produits alimentaires, nécessite d’étudier des solutions pour réduire ou masquer ces goûts non souhaités. Ainsi, une transformation des protéines végétales est souvent nécessaire qu’il s’agisse d’optimiser leurs propriétés techno-fonctionnelles, leurs bénéfices santé, mais aussi, pour avoir des produits acceptés par les consommateurs (Cao-Hoang *et al.*, 2013).

1.2.2. Les solutions proposées pour réduire les défauts dans des produits à base de pois

Pour favoriser le développement des protéines végétales dans l’alimentation, il est nécessaire de proposer différentes solutions pour masquer les défauts et ainsi favoriser leur acceptation par les consommateurs. On peut améliorer les caractéristiques sensorielles des protéines végétales en réalisant par exemple un traitement thermique préalable de la graine qui permet la destruction des facteurs antinutritionnels, mais aussi l’inactivation des enzymes qui sont responsables de la production des molécules indésirables telles que les aldéhydes (Chango *et al.*, 1995), ou bien encore via la formulation du produit (composition mais aussi procédé de transformation). C’est ce dernier point que nous allons traiter ici.

1.2.2.1. La formulation des aliments pour améliorer sensoriellement les produits à base de protéines végétales

La formulation qui intègre à la fois la composition des produits (nature et concentration des ingrédients) et leur procédé de fabrication (mode d’incorporation des ingrédients en mélange et procédé associé), est une étape déterminante du développement de nouveaux aliments ayant des fonctionnalités cibles, sensorielles ou nutritionnelles. Elle conduit à l’élaboration des caractéristiques sensorielles qui conditionnent principalement l’acceptabilité et l’appréciation par le consommateur. La formulation a su apporter aux entreprises de l’alimentation une flexibilité qui leur permet d’ajuster, en temps réel, la composition des mélanges alimentaires en prenant en compte les contraintes qui peuvent exister comme par exemple des notes indésirables présentes dans certains ingrédients ou générées lors des procédés.

Quelques publications montrent l'intérêt de la formulation pour masquer les défauts sensoriels des protéines de pois en ajoutant par exemple dans la formule, d'autres types de protéines (protéines de lait) ou de la matière grasse ou bien encore en ajoutant du sucre ou des arômes (Drake *et al.*, 2000; Gharsallaoui *et al.*, 2012; Youssef *et al.*, 2016).

Aujourd'hui, le consommateur est attentif à son alimentation et souhaite à la fois des recettes simples (moins d'additifs) et des procédés de transformation élémentaires (notion de « minimal processing »). La fermentation permet de répondre à ces deux contraintes. C'est donc cette voie que nous avons explorée dans le cadre de ce travail de thèse.

1.2.2.2. Transformation des aliments par voie fermentaire

Définition de la fermentation : Une réaction biochimique sous l'action de micro-organismes.

La fermentation est un phénomène naturel, se produisant lors de la décomposition de la matière organique (Tamang *et al.*, 2016a,b). C'est un des plus vieux procédés biologiques utilisés par l'homme, depuis des milliers d'années, qui tire partie des micro-organismes présents sur/ou dans les matières premières leur servant de substrat. Ainsi, elle permet la conservation des aliments tout en améliorant les qualités nutritionnelles des produits et en augmentant les qualités organoleptiques des aliments (Steinkraus, 2002). La fermentation peut contribuer à libérer sous forme de peptides et d'acides aminés, des métabolites susceptibles d'avoir à la fois des effets santé et nutritifs (Chen *et al.*, 2012, Feng *et al.*, 2017).

Utilisation de la fermentation pour masquer les défauts sensoriels des protéines végétales

Quelques études portent sur l'effet de la fermentation dans des produits à base de protéines de pois. Schindler et collaborateurs (Schindler *et al.*, 2012) ont ainsi étudié les composés volatils aromatiques des protéines de pois, avant et après fermentation, quantifiés et caractérisés en terme d'odeurs perçues par chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) et par chromatographie couplée à l'olfactométrie (GC-O). Ils ont montré que la fermentation permettait de masquer les notes indésirables des protéines de pois en générant en particulier de la 2,3-octanedione, de la 2-nonanone, de la 3-octen-2-one, du 2,4-heptadienal, du 2-nonenal, de la 2-undecanone, de l'2-octen-1-ol, du 2,4-nonadienal et du 1-decanol. Dans une autre étude, Youssef et collaborateurs (Youssef *et al.*, 2016) ont montré que les produits fermentés enrichis en protéines de pois avaient tendance à avoir des intensités plus élevées pour les descripteurs positifs tels que crémeux, laitiers et doux, et des intensités inférieures pour les descripteurs négatifs tels que le végétal, la terre et le vinaigre par rapport au produit non fermenté. Le même type d'observation a été trouvé pour d'autres protéines que le pois (Meinlschmidt *et al.*, 2016a,b), mettant clairement en avant l'intérêt de la fermentation pour réduire les défauts sensoriels olfactifs des protéines végétales.

1.2.3. Démarche sensorielle et méthodes pour caractériser les produits

L'analyse sensorielle consiste à étudier d'une manière ordonnée et structurée les propriétés organoleptiques d'un produit, afin de pouvoir le décrire, le classer ou l'améliorer d'une façon objective. Elle permet de venir en complément de l'analyse physico-chimique et peut permettre d'interpréter les différences que l'on peut apercevoir. On peut distinguer deux types de méthodologies pour décrire et quantifier les propriétés sensorielles : (i) les méthodes descriptives, qui permettent d'obtenir une image sensorielle globale du produit et (ii) les méthodes discriminatives, qui permettent de mettre en évidence des différences de perception entre des produits. Le choix de la méthode sensorielle dépend non seulement de l'objectif de l'étude et de son contexte mais également du type de produit à étudier.

Selon un sondage réalisé en 2011 auprès de 104 professionnels de l'analyse sensorielle, la méthode descriptive la plus utilisée dans les études sensorielles est le profil conventionnel (de type QDA[®], Quantitative Descriptive Analysis) (Delarue, Lawlor, Rogeaux, 2014). Il est reconnu également comme étant la méthode de référence pour caractériser un produit (NF ISO 13299, Mai 2010). En plus du profil quantitatif, il existe d'autres méthodes descriptives qui sont présentées dans le **tableau 6**.

Dans la majorité des études sur les légumineuses, la méthode utilisée est le profil quantitatif. Il a l'avantage de permettre la description et la quantification de tous les aspects sensoriels du produit (texture, arômes, odeur, etc.) (Ang and Boatright, 2003; Bott and Chambers, 2006; VARA-UBOL *et al.*, 2004; Youssef *et al.*, 2016). Les panélistes sont amenés à noter l'intensité d'un descripteur sur une échelle structurée après avoir senti ou mangé le produit. Les données quantitatives obtenues sont utilisées pour comparer des produits entre eux, ou peuvent être mises en relation avec des mesures instrumentales. Sa mise en place nécessite un panel de juges, entraînés à utiliser un vocabulaire commun. En effet il convient que le vocabulaire choisi puisse couvrir tout l'univers produit et soit compris de tous. Pour cela il est souhaitable de familiariser les sujets par des références qualifiant les différents descripteurs d'intérêt. Il est également nécessaire de les familiariser vis-à-vis des différents types d'échelles utilisées. Il est donc difficile de caractériser des nouveaux produits ayant des caractéristiques sensorielles différentes non connues à l'avance.

Tableau 6. Exemples de méthodes sensorielles descriptives et discriminatives

	Questions	Type d'essai	Préconisations
Essais discriminatifs - Différences - Similitudes	Existe-il des différences ? (Suivi de production, temps de stockage...)	Triangulaire	Sujets: 18 minimum. Produits : 3 dont 2 identiques
		Duo trio	Sujets: 18 minimum. Produits : 3 dont 2 identiques
		2 sur 5	Sujets: 10 minimum. Produits : 5 dont 2 d'un type et 3 d'autre
Essais de positionnement (sur une seule caractéristique)	Quelle est l'intensité d'une caractéristique ? (concentration d'arôme, apparition de gout parasite...)	Comparaison par paires	Sujets: 18 minimum au moins initiés Produits : 2 (avec 2 combinaisons)
		Classement	Sujets: 12 minimum au moins initiés Produits : >2 (série d'échantillons)
		Notation	Sujets: 10 minimum au moins qualifiés Produits : 2 à 6
Essais de positionnement global	Quelles sont les ressemblances globales entre produits ? (développement de produit...)	Tri libre	Sujets: 18 minimum Produits : <12, présentation simultanée
		Napping [®]	Sujets: 18 minimum Produits : <12, présentation simultanée
		Polarized sensory positioning (PSP)	Sujets: 18 minimum Produits : <12, présentation simultanée
Essais descriptifs (sur un ensemble de caractéristiques)	Quelle est la carte d'identité sensorielle du produit ? (Formuler, développer, suivre l'évolution d'un produit...)	Profil quantitatif descriptif (global ou partiel) QDA [®]	Sujets: 8 à 15 préconisé entraînés Produits : 2 à 6 par séance
		Profil libre	
		Profil qualitatif	
		Spectrum [®]	
		Call All That Apply (CATA)	Sujets: minimum 10 non entraînés Produits : pas de nombre limitant
Essais descriptifs « dynamiques » (Intégrant la perception dans le temps)	Quelle est la carte d'identité sensorielle du produit au cours de sa consommation (mode dynamique)? (Formuler, développer, suivre l'évolution d'un produit...)	Profil temps intensité (sur une caractéristique à la fois)	Sujets: 12 préconisé (10 minimum) entraînés Produits : 2 à 6 par séance
		Profil DTS (sur un ensemble de caractéristiques en simultané)	

L'analyse de ce tableau montre clairement que toutes les méthodes ne sont pas équivalentes et le choix d'une méthode dépend de l'objectif fixé. On peut noter que certaines méthodes demandent un entraînement important du panel et imposent un nombre de produit limité au sein d'une même séance. La méthode CATA présente l'avantage de ne pas trop limiter le nombre de produits au sein d'une séance et de ne pas demander d'entraînement spécifique du panel ce qui est un réel atout pour caractériser les différentes étapes lors de la formulation de nouveaux produits.

I.2.4. Synthèse : Les défauts sensoriels des protéines de pois et leur origine

De cette deuxième partie de l'analyse de la littérature, nous pouvons retenir que les freins majeurs à l'utilisation des protéines de pois dans les produits alimentaires concernent leurs défauts sensoriels avec en particulier les notes « beany » et l'amertume. Il s'agit de perceptions complexes pour lesquelles une grande diversité de molécules volatiles et non-volatiles pourrait être impliquée. Il semble possible de contrôler les défauts sensoriels par la formulation des produits, mais des travaux sur la fermentation de protéines végétales mettent clairement en avant le potentiel de ce procédé pour améliorer les propriétés sensorielles de ces produits. En effet, des études récentes montrent que la fermentation de protéines de pois peut être une solution tout à fait intéressante permettant de proposer des produits plus adaptés aux exigences des consommateurs. Il est donc nécessaire de faire un état des lieux des connaissances sur les différents types de produits fermentés à base de protéines végétales, ainsi que sur les techniques utilisées et les micro-organismes impliqués.

I.3. Les produits fermentés : origines et diversité microbienne

I.3.1. Introduction

Actuellement, plus de 3500 aliments fermentés traditionnels existent de par le monde. Ils sont d'origine animale ou végétale et ils font partie de notre diète quotidienne (ex: produits laitiers comme les yaourts ou les fromages ; produits carnés comme le saucisson ; pain et viennoiseries ; légumes fermentés comme la choucroute ou les olives) (Tamang *et al.*, 2016b). Les boissons alcoolisées ne sont pas les seules boissons fermentées puisque le cacao, le café et le thé en font également partie : les fèves, les graines ou les feuilles dont ils sont issus sont mises à fermenter après récolte afin de développer des arômes caractéristiques. De plus, les produits de fermentation revêtent une spécificité géographique : si en Europe le fromage et le pain sont particulièrement appréciés, en Afrique, les aliments fabriqués à partir de féculents fermentés (igname ou manioc) tiennent une place importante dans l'alimentation tandis qu'en Asie, les produits dérivés de soja ou d'autres matières premières comme le chou (duamuoi), le porc (nemchua) et les crevettes (tom chua) sont consommés quotidiennement (Lan *et al.*, 2013; Tamang *et al.*, 2016b; Yao *et al.*, 2009).

Les différents types de fermentation

Au cours de la fermentation, bactéries, levures et moisissures dégradent des substrats organiques et produisent des métabolites d'intérêt pour l'alimentation (Holzapfel, 1997). On distingue différents types de fermentation selon les molécules produites et les ferments utilisés (Steinkraus, 1997, 2002) :

- la fermentation lactique : la plus fréquemment rencontrée dans les produits fermentés (Tamang *et al.*, 2016a,b), elle met en œuvre des bactéries lactiques conduisant à la production d'acide lactique à partir de sucres utilisés comme source de carbone. Elle est dite "homolactique" quand elle est réalisée par des bactéries homofermentaires appartenant aux genres *Lactococcus*, *Lactobacillus* (certaines espèces) et *Streptococcus* et donne majoritairement naissance à de l'acide lactique. Elle est qualifiée d'"hétérolactique" quand elle est assurée par des bactéries hétérofermentaires appartenant aux genres *Leuconostoc* et *Lactobacillus*; elle permet la production d'acide lactique et d'autres produits tels que l'alcool, le CO₂ et l'acide acétique. Elle intervient dans la production de yaourts, laits fermentés, fromages, saucissons, choucroute, et de nombreux autres produits alimentaires africains (Tab7). Cette fermentation se produit également dans les levains en présence également de levures et moisissures. En Afrique de l'Ouest, ce type de fermentation a été traditionnellement développée pour une large gamme de matières premières essentiellement constituée d'amidon (>80% de matière sèche) comme le manioc, le sorgho et le mil (Yao *et al.*, 2009).
- La fermentation alcaline : elle est à l'origine de la dégradation des protéines en peptides et en acides aminés sous l'action de micro-organismes essentiellement du genre *Bacillus*. Au cours de ce type de fermentation, de l'ammoniac est libéré et le pH augmente pour atteindre des valeurs supérieures ou

égales à 8. Ce type de fermentation a été traditionnellement développé en Asie pour une large gamme de matières premières essentiellement des légumineuses (**Tab7**) (ex: Ugba, Dawadawa, Ogiri)

- La fermentation alcoolique : elle est réalisée généralement par des levures du genre *Saccharomyces* et conduit à la libération d'éthanol et de CO₂ suite à la fermentation des sucres. Elle est à la base de la production du cidre, du pain, du vin et de la bière. Dans des produits asiatiques comme la bière de sorgho- kaffir en Indonésie, pulque au Mexique, lao-chao en Chine, sake au Japon, on peut trouver des levures (*Amylomyces rouxii*), des bactéries (*Zymomonas mobilis*) ou encore des moisissures (*Endomycopsis fibuliger*).
- La fermentation malolactique est associée à la transformation de l'acide malique en acide lactique et CO₂ sous l'action de bactéries lactiques essentiellement du genre *Oenococcus*. Elle entraîne une désacidification du vin et permet d'éliminer l'acide malique qui donne au vin une verdeur indésirable dans les vins de qualité.
- La fermentation propionique est réalisée à partir de l'acide lactique par des bactéries appartenant au genre *Propionibacterium* et conduit à la production majoritaire d'acide propionique mais également d'acide acétique et de CO₂; elle intervient dans la fabrication de certains fromages à pâte pressée comme le leerdamer et pressée cuite comme l'emmental auxquels elle donne un goût caractéristique.
- La Fermentation acétique se produit quand les conditions d'anaérobiose de la fermentation alcoolique ne sont pas conservées. Les bactéries de type *Acetobacter* présentes dans l'environnement oxydent une partie de l'éthanol en acide acétique. Le vinaigre de vin dans les pays occidentaux, le vinaigre de vin de palme en Afrique ou encore le nata de coco dans les Philippines sont des produits issus de la fermentation acétique.

Tableau 7. Quelques produits fermentés africains (Franz *et al.*, 2014)

Categories				
A	B	C	D	E
Ogi ^{1,2,3}	Kenkey	Dawadawa ⁵	Palmwines ¹³	
Uji ^{1,2,3,4}	Uji ^{1,2,3}	Soumbala ⁵		Injera ^{1,2,3}
Mawe ¹	Ben saalga ²	Ugba ⁵	Traditional beers ^{3,2,1}	
Mahewu ¹		Ogiri ¹¹	Tej ¹²	Kisra ³
Gari ⁴		Okpehe ⁵	Sherbote ¹⁴	Kocho ⁹
Kivunde ⁴			Mwenge ^{3,15}	
Kule naoto ¹⁰				Kishk ¹⁰⁺⁷
Ergo ¹⁰				
Hulumur ³				

Raw materials: 1 = maize; 2 = millet; 3 = sorghum; 4 = cassava; 5 = legumes; 6 = tef; 7 = wheat; 8 = vegetables; 9 = ensete; 10 = milk; 11 = water melon seeds; 12 = honey; 13 = palm juice; 14 = dates; 15 = bananas.

A = single-step LAB fermentation; B = soaking followed by lactic fermentation; C = alkaline, bacterial fermentation dominated by *Bacillus subtilis*; D = lactic/alcoholic fermentation; E = dough with LAB dominant.

Les différents types de produits fermentés

Les aliments fermentés sont produits à partir de flores fermentaires « sauvages », parfaitement adaptées à la matière première ou de cultures de levains ensemencées de façon dirigée dans la matière première. Selon le type de procédé d'inoculation, on peut distinguer les aliments fermentés traditionnels des nouveaux produits fermentés qui apparaissent sur le marché, tels que les yaourts au soja par exemple (Fig8). Les opérations de prétraitement de la matière première sont très importantes pour la production d'un aliment de qualité, telles que la pasteurisation du lait ou le tri, le nettoyage et le blanchiment des fruits et légumes par exemple (Feng *et al.*, 2017).

- La fermentation spontanée : Cette fermentation se produit suite à l'action combinée de communautés microbiennes naturellement présentes dans la matière première ou dans l'environnement ou encore sur le matériel utilisé (Demarigny and Gerber, 2014). Les souches qui co-interagissent généralement ensemble de façon positive et présentent les développements les plus élevés, sont les mieux adaptées à ces matières premières (Holzapfel, 1997). Une méthode dite "backslopping" permet de favoriser ou de maintenir le développement de ces communautés microbiennes spontanées. Elle consiste à rajouter une petite portion d'un lot précédent d'aliments fermentés au début du processus de fabrication d'un nouveau lot d'aliments à fermenter (Demarigny and Gerber, 2014). Ce type de fermentation est utilisé pour différents types de produits tels que certains fromages, le pain, la viande, les végétaux. Une large diversité de micro-organismes est mise en jeu, ce qui dépend principalement de l'origine de la matière première, de l'environnement et de la technologie utilisée. Une étude récente (Coda *et al.*, 2017) a utilisé cette méthode pour fabriquer des levains de féveroles fermentées pendant 14 jours; ils ont montré que les espèces dominantes pendant cette fermentation étaient *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides* et *Weissella koreensis*.
- La fermentation raisonnée avec l'inoculation de starters autochtones : Pour pallier les problèmes de la fermentation spontanée, dont la qualité des produits est souvent inégale et peut présenter des risques sanitaires et d'altération, des études sont de plus en plus consacrées à l'isolement et à l'identification, au cours de la fermentation spontanée, des micro-organismes ayant des caractéristiques physiologiques et technologiques particulières en vue de leur utilisation comme cultures autochtones (Di Cagno *et al.*, 2013). La fermentation raisonnée permet de réaliser un meilleur contrôle de la fermentation ainsi qu'une standardisation du procédé de fabrication, dont le but, à terme, est de fournir au consommateur un produit traditionnel sain, de qualité organoleptique constante et acceptable. Ce type d'écosystème peut générer des produits fermentés traditionnels mais aussi de nouveaux aliments fermentés (Fig8).
- La fermentation raisonnée avec des starters allochtones : ce type de fermentation consiste à utiliser des levains qui sont d'une origine autre que celle de la matière première dans laquelle ils sont inoculés

(Di Cagno *et al.*, 2013). Ces levains sont généralement utilisés pour la fermentation de nouveaux aliments fermentés (de novo) : le yaourt au soja (produit Sojasun™), les « faux-mage » (fromages Vegan) également appelés « vromage »

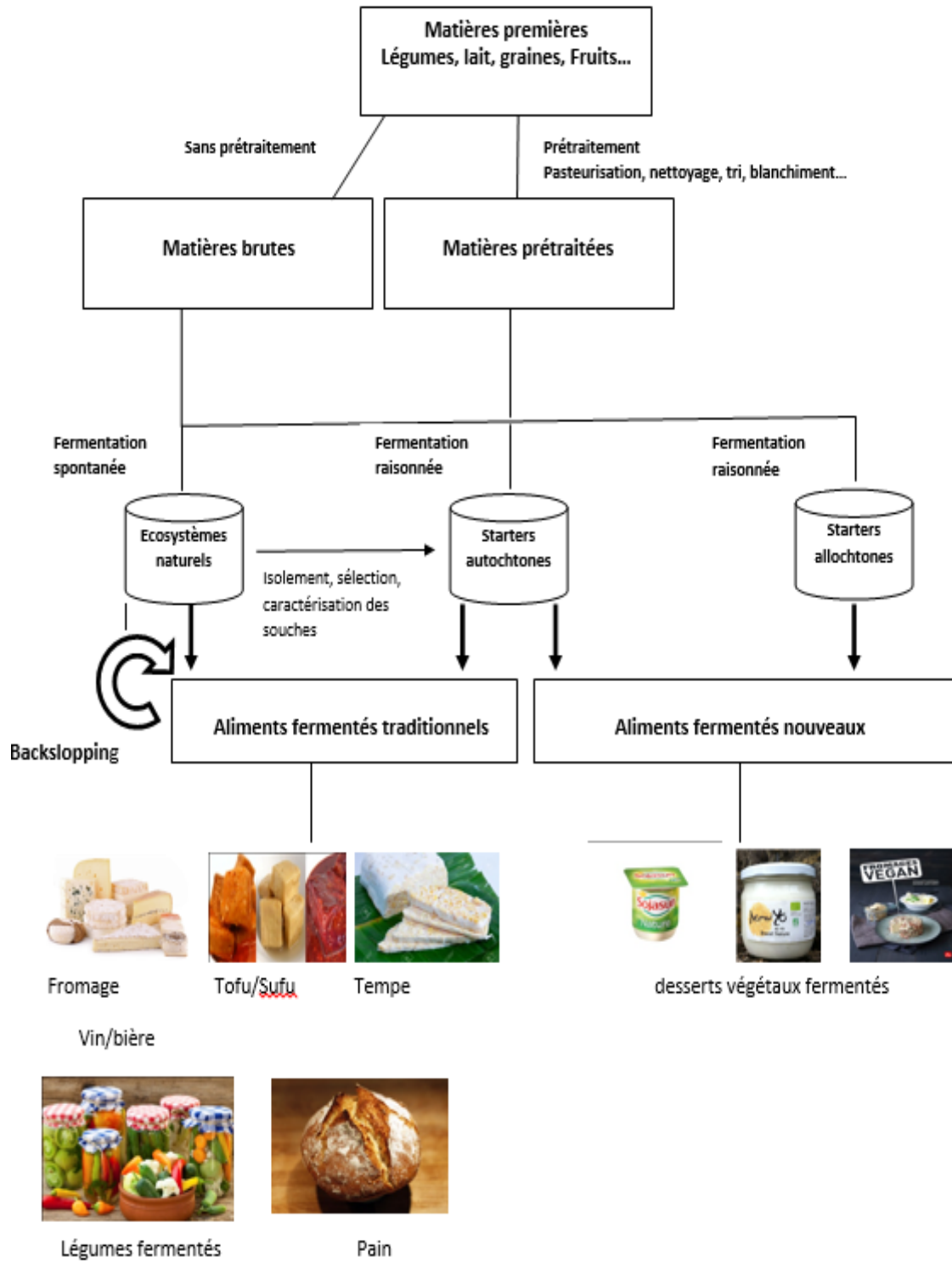


Figure 8. Différents types de produits fermentés (D'après Feng *et al.*, 2017)

1.3.2. Les aliments fermentés issus de la fermentation spontanée et "back-slopping"

1.3.2.1. Les produits fermentés à base de légumineuses

Plusieurs études ont porté sur la biodiversité des produits fermentés traditionnels à base de légumineuses obtenus par fermentation spontanée (**Tab8**). Le soja est la légumineuse la plus utilisée pour fabriquer des produits fermentés traditionnels. Deux types d'aliments fermentés à base de soja se distinguent : les aliments fermentés avec *Bacillus spp.*, principalement *B.subtilis*, (espèce fonctionnelle dominante dans les produits fermentés asiatiques) avec une texture particulière (viscosité importante avec descripteur « sticky ») et les aliments fermentés avec des moisissures, principalement *Aspergillus*, *Mucor* et *Rhizopus* ([Tamang et al., 2016b](#)). Les aliments fermentés à base de soja, non salés et collants, sont présentés dans un triangle imaginaire avec trois points géographiques situés au Japon (**natto**), Népal et nord-est de l'Inde (**kinema** et ses produits similaires), et le nord de la Thaïlande (**thua-nao**), appelé "triangle natto » ou « kinema-Natto-Thuaniao (**KNT**) -triangle". Dans les pays liés au triangle KNT, ces aliments sont fermentés avec *Bacillus* : le natto au Japon, le chungkokjang en Corée, le kinema, le tungrymbai, l'akhune, le bekgang, le hawaijar, et le perayaan en Inde. Les produits de soja fermentés avec des filamenteux sont le miso et le shoyu du Japon, le tempe d'Indonésie, le douchi et le sufu de Chine, et le doenjang de Corée ([Sugawara, 2010](#)).

D'autres légumineuses sont fermentées d'une façon traditionnelle générant ainsi une gamme de produits, comme le caroube (dawadawa, iru, kinda, soumbala) le haricot urd appelé aussi soja noir (wari en Inde ([Nagai et Tamang, 2010](#)), et maseura en Inde et au Nepal ([Tamang, 2015](#)), pois chiche (dhokla en Inde) ([Tamang, 2015](#)) et pois de l'herbe (tempeh en Indonésie) ([Starzyńska-Janiszewska et al., 2012](#)).

La fermentation de ces types de produits s'effectue en général d'une manière spontanée. L'essor récent des techniques à haut débit, telles que les nouvelles générations de séquençage (NGS) a permis d'identifier un très grand nombre d'espèces microbiennes impliquées dans la transformation de ces produits (**Tab8**). Cette diversité microbienne s'explique par la complexité dans la composition du substrat et par les différents procédés mis en œuvre. Prenons l'exemple des produits à base de soja : la méthode de préparation varie selon le pays, les pratiques traditionnelles et le matériel utilisé. Cependant, les principales étapes (le trempage, l'ébullition, la fermentation, l'incubation et l'emballage) restent plus ou moins identiques ([Shrestha et al., 2013](#)).

Chapitre I – Etude bibliographique

Tableau 8. Quelques exemples de produits fermentés traditionnels à base de légumineuses et les micro-organismes identifiés/utilisés

Produits	Substrat	Micro-organismes		Origine	Références
		Bactéries	Levures/Moisissures		
Doenjang	soja	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacilluslicheniformis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Leuconostoc. mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus sp</i>	<i>Mucor. plumbeus</i> , <i>Aspergillus. oryzae</i> , <i>Debariomyces. hansenii</i>	Korea	(Jung <i>et al.</i> , 2014; Kim <i>et al.</i> , 2009)
Bekang	Soja	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus brevis</i> , <i>Bacillus circulans</i> , <i>Bacillus coagulans</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus sphaericus</i> , <i>Lysinibacillus fusiformis</i>		India	(Chettri and Tamang, 2015)
Hawaijar	Soja	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus. sciuri</i> , <i>Alkaligenessp.</i> , <i>Providenciarettgers</i> , <i>Proteus mirabilisf</i>		India	(Chettri and Tamang, 2015; Jeyaram <i>et al.</i> , 2008)
Kinema	Soja	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus circulans</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Bacillus sphaericus</i> , <i>Enterobacter. faecium</i> ,	<i>Candida. parapsilosis</i> , <i>Geotrichum candidum</i>	India	(Sarkar <i>et al.</i> , 1994; Tamang, 2003)
Perayaan	Soja	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Vagococcuslutrae</i> , <i>Pediococcus. acidilactici</i> , <i>Enterobacter. Faecalis</i>		India	(Singh <i>et al.</i> , 2014)
Tungrymbai	Soja	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus pumilus</i>		India	(Chettri and Tamang, 2015)
Tempe	Soja	<i>Citrobacter freundii</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Klebsiella. pneumoniae subsp. ozaenae</i> , <i>Pseudomas fluorescens</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus lactis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillusreuteri</i>	<i>Rhizopus. oligisporus</i> , <i>Rhizopus arrhizus</i> , <i>Rhizopus. oryzae</i> , <i>Rhiopusz. stolonifer</i> , <i>Aspergillus. niger</i>	Indonesia, Netherlands, Japan, USA	(Feng <i>et al.</i> , 2005)
Douchi	Soja	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	<i>Aspergillus. Oryzae</i>	China, Taiwan	(Wang <i>et al.</i> , 2006)
Thua-nao	Soja	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Lactobacillus sp</i>		Thailand	(Chunhachart <i>et al.</i> , 2006; Visessanguan <i>et al.</i> , 2005)
Sufu	Soja	<i>Kocuria</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Enterocoques</i> , <i>Staphylocoques</i> , <i>Proteus</i> , <i>Bactéries Lactiques</i>	<i>Actinomucor elenans</i> , <i>Mucor. silvatixus</i> , <i>Mucor. corticolus</i> , <i>Mucor. hiemalis</i> , <i>Mucor. praini</i> , <i>Mucor. racemosus</i> , <i>Mucor. subtilissimus</i> , <i>Rhizopus. Chinensis</i> ,	Chine, Taiwan	(Chao <i>et al.</i> , 2008; Feng <i>et al.</i> , 2013; Han <i>et al.</i> , 2001)
Natto	Soja	<i>Bacillus subtilis (natto)</i>		japan	(Nagai and Tamang, 2010)
chungkokjang	Soja	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Pantoea agglomerans</i> ,		Korea	(Nam <i>et al.</i> , 2012)

Chapitre I – Etude bibliographique

		<i>Pantoeaga ananatis, Enterococcus sp., Pseudomonas sp., Rhodococcus sp.</i>			
Miso	Soja	<i>Pediococcus. acidilactici, Leuconostoc. paramesenteroides, Micrococcus halobius, Pediococcus. halophilus, Streptococcus sp.,</i>	<i>Sacchromyces. rouxii, Zygosaccharomyces rouxii, Aspergillus. Oryzae</i>	Japan	(Tamang <i>et al.</i> , 2016b)
Dawadawa	Caroube	<i>Bacillus pumilus, Bacillus licheniformis, Bacillus subtilis, Bacillusfirmus, Bacillus atrophaeus, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus mojavensis, Lysinibacillus sphaericus</i>		Ghana, Nigeria	(Amoa-Awua <i>et al.</i> , 2006)
Iru	Caroube	<i>Bacillus subtilis, Bacillus pumilus, Bacillus licheniformis, Bacillus megaterium, Bacillus fumus, Bacillus atrophaeus, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus mojavensis, Lysinibacillus sphaericus, Staphylococcus saprophyticus</i>		Nigeria	(Maerak <i>et al.</i> , 2008)
Kinda	Caroube	<i>Bacillus pumilus, Bacillus licheniformis, Baccillus. subtilis, Bacillus atrophaeus, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus mojavensis, Lysinibacillus sphaericus</i>		Sierra Leone	(Maerak <i>et al.</i> , 2008)
Soumbala	Caroube	<i>Bacillus pumilus, Bacillus atrophaeus, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus mojavensis, Lysinibacillus sphaericus. Bacillus subtilis, Bacillus thuringiensis, Bacillus licheniformis, Bacillus cereus, Bacillus badius, Bacillus firmus, Bacillus megaterium, Bacillus mycoides, Bacillus sphaericus, Peanibacillus alvei, Peanibacillus larvae, Brevibacillus laterosporus</i>		Burkina Faso	(Ouoba <i>et al.</i> , 2004)
Wari	Haricot urd	<i>Bacillus subtilis,</i>	<i>Candida. curvata, Candida. famata, Candida. krusei, Candida. parapsilosis, Candida. vartiovaarai, Cryptococcus humicolus, Debaryomyces. hansenii, Debaryomyces. tamarai, Geotrichum candidum, Hansenula anomala, Klyveromyces. marxianus, Saccharomyces. cerevisiae, Rhizopus. lactosa,</i>	India	Rani and Soni, 2007
Maseura	Haricot urd	<i>Bacillus subtilis, Bacillus mycoides, Bacillus pumilus, Bacillus laterosporus, Pediococcus. acidilactici, Pediococcus. pentosaceous, Enterobacter. durans, Lactobacillus fermentum,</i>	<i>Saccharomyces. cerevisiae, Candida. Castellii</i>	Nepal, India	(Chettri and Tamang, 2008)

Chapitre I – Etude bibliographique

Dhokla	Pois chiche	<i>Lactobacillus salivarius,</i>	Inde	(Blandino <i>et al.</i> , 2003)
		<i>Leuconostoc mesenteroides, Lactobacillus fermenti, Enterobacterfaecalis,</i>		
Tempeh	Pois de l'herbe	<i>Rhizopus. oligosporus</i>	Indonésie	(Starzyńska-Janiszewska <i>et al.</i> , 2012)

1.3.2.2. Les produits fermentés à base de lait

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés principalement à la technologie fromagère et les espèces identifiées. Le fromage est l'un des plus anciens aliments fermentés créé par l'homme : il a été produit et consommé depuis des milliers d'années. Cet aliment à haute teneur protéique, contient en moyenne 22.5g de protéines pour 100g de fromage (Renner *et al.*, 1993). La fabrication des fromages affinés résulte de la succession de cinq opérations obligatoires (Irlinger *et al.*, 2007) :

- La coagulation du lait : la formation du caillé résulte de la coagulation des caséines du lait sous l'action de bactéries lactiques et/ou d'enzymes protéolytiques (présure). Ces enzymes protéolytiques déstabilisent les caséines du lait provoquant ainsi leur coagulation. La formation du caillé sous l'action des bactéries lactiques est la conséquence de la fermentation du lactose en acide lactique. En effet, la production d'acide lactique provoque une chute de pH qui entraîne la coagulation des caséines.
- L'égouttage : cette étape se traduit par une expulsion spontanée du lactosérum par synérèse et par gravité, qui définit la teneur en eau du caillé, et ainsi le type de fromage obtenu.
- Le moulage (associé à l'égouttage réalisé en faisselle ou sous presse) qui donne sa forme au fromage
- Le salage : l'incorporation du sel au fromage peut être réalisée soit par salage à sec (dans le caillé ou en surface) soit par saumurage (immersion dans une solution saturée en sel ou en surface). Le salage permet non seulement de compléter l'égouttage, mais conduit aussi à la formation de la croûte en créant une zone riche en sel et à plus faible teneur en eau. Hormis son importance dans le développement des qualités organoleptiques fromagères, le salage joue aussi un rôle dans l'inhibition de la flore indésirable telle que *Listeria*, tout en favorisant le développement de la communauté microbienne nécessaire à l'affinage. En général, la teneur en sel d'un fromage est comprise entre 1.5 et 1.7%.
- L'affinage : il se fait généralement en cave, étant donné que la température et le degré d'humidité doivent être maîtrisés. La durée de l'affinage peut varier de quelques semaines à plusieurs années selon le fromage fabriqué. Les conditions d'affinage vont avoir un impact crucial sur le développement de la communauté microbienne d'affinage. Or, la composition et l'évolution de cette flore joue un rôle primordial dans la typicité et la qualité du produit obtenu. En effet, lors de l'affinage, les fromages subissent des transformations biochimiques profondes dues au développement de l'écosystème fromager et ont un fort impact sur la texture, la flaveur et les qualités sensorielles et/ou nutritionnelles du produit fini.

I.3.3. Les ferments microbiens inoculés dans la fermentation de produits à base de lait et de légumineuses : de la composition microbienne aux fonctionnalités

I.3.3.1. Ferments autochtones et allochtones/commerciaux

a. Utilisation dans le cas des produits à base de légumineuses

L'évolution des techniques de séquençage a permis d'identifier différentes espèces qui sont présentes dans les produits fermentés traditionnels à base de légumineuses. Cela a permis de développer les méthodes de préparation de ces produits en ajoutant des starters sélectionnés pour fabriquer des produits fermentés traditionnels ou créer des produits fermentés nouveaux. La sélection des souches et leur assemblage au sein d'un consortium fonctionnel doit tenir compte i) du type d'interactions générées entre elles (ex: compétition, coopération, amensalisme), ii) leur capacité à utiliser les sources d'énergie de la matière première et à croître, iii) leur effet barrière vis-à-vis d'agents pathogènes et de la flore microbienne d'altération vi) leur capacité à produire des molécules d'intérêt, technologiques, sensorielles, organoleptiques ou à fort potentiel effet santé (Holzapfel, 1997).

Plusieurs travaux ont étudié l'utilisation des starters pour fabriquer des produits fermentés à base de légumineuses. Le **tableau 9** présente quelques aliments fermentés traditionnels inoculés avec des levains pour leurs propriétés sensorielles. Dans le cas du sufu, l'ajout de champignons (*Mucor* et *Rhizopus*) permet d'avoir une texture plus crémeuse avec des saveurs plus prononcées similaires à celles du fromage (Han *et al.*, 2001).

Quelques travaux ont étudié la fermentation des nouveaux produits avec des starters autochtones/allochtones. Chandra-Hioe *et al.*, (2016) ont mis en évidence l'intérêt des bactéries lactiques (*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*) pour la production de yaourts à base de féverole et de pois chiche. Ils ont montré que la fermentation permettait i) d'augmenter la digestibilité des protéines (*in vitro*) en diminuant les inhibiteurs tryptiques présents, et ii) d'améliorer les propriétés fonctionnelles telles que la solubilité, le pouvoir moussant et la capacité d'absorption d'huile.

Tableau 9. Micro-organismes ensemencés dans la fermentation de produits traditionnels et leur effet bénéfique

Micro-organismes	Produits	Objectif	Références
<i>Aspergillus oryzae, Aspergillus soyae</i>	Sauce de soja (soja et blé)	Plus d'antioxydants : prévenir les maladies cardiovasculaires	(Su, 1999)
	Pate de soja noir	Améliorer l'activité de l'aglycone, de la vitamine K2 et de la superoxyde dismutase	(Wu and Chou, 2009)
<i>Bacillus subtilis</i>	Natto	Produire une odeur distinctive, un peu semblable à un fromage piquant. La nattokinase est disponible sous forme de supplément alimentaire	(Shurtleff <i>et al.</i> , 2012)
	Boisson de soja noir	Améliorer l'activité des isoflavones (aglycones)	(Kuo <i>et al.</i> , 2006)
<i>Actinomucor sp., Mucor sp., Rhizopus sp.</i>	Sufu	Créer un produit semblable à un fromage avec une consistance crémeuse et une saveur prononcée	(Han <i>et al.</i> , 2001)
<i>Rhizopusmicrosporus, Rhizopus. microsporus, Rhizopus. oligosporus, Rhizopus. rhizopodiformis, Rhizopus. chinensis</i>	Tempeh	Améliorer l'hydrolyse des protéines avec des propriétés sensorielles intéressantes	(Nout and Rombouts 1990)
<i>Bacillus longum, ty Bacillus animalis Bacillus breve</i>	Lait de soja	Améliorer l'activité des isoflavones (aglycones)	(Pham and Shah, 2007)

Fermentation des protéines de pois (*Pisium sativium*)

La fermentation du pois a été peu étudiée si l'on fait référence au nombre très faible d'articles portant sur ce sujet dans la littérature, contrairement à d'autres légumineuses fermentées telles que le soja. [Schindler *et al.*, en 2012](#) ont étudié la fermentation des extraits protéiques de pois jaunepar deux bactéries lactiques : *Lactobacillus plantarum* et *Pediococcus pentosaceus* afin de réduire les défauts sensoriels liés aux notes « vertes » du pois. Après fermentation (48h à 37°C), lacroissance et l'activité des deux bactéries lactiques permettent une meilleure dégradation des acides aminés et des acides gras contenus dans la préparation, entraînant ainsi la production de

notes aromatiques diverses : amande, fruité-floral, savon, lactique, noisette, céréales, ayant pour conséquence de masquer les notes "vertes". Une autre étude plus récente (Yousseef *et al.*, 2016) a étudié la fermentation des yaourts enrichis en protéines de pois (24h/37°C). Ils ont étudié la fermentation de 5 mélanges de protéines de lait/protéines de pois (0 à 40 g de protéines de pois/protéines totales) avec 10 consortia différents composés de 7 bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei subsp. casei*) dans l'objectif de sélectionner le produit le plus intéressant du point de vue sensoriel présentant des caractéristiques proches d'un yaourt standard.

b. Utilisation dans le cas des produits à base de lait (fromage)

Au cours de la fabrication d'un fromage, l'importance relative des différents groupes microbiens est en constante évolution. Ainsi, au cours de la fabrication, puis de l'affinage, les modifications physico-chimiques du milieu vont jouer un rôle déterminant dans la multiplication active ou, au contraire, la disparition d'un groupe de micro-organismes. La succession des populations microbiennes suit ainsi la succession des caractéristiques du caillé et de l'atmosphère, la dynamique et le type d'affinage étant fortement impactée par ces activités microbiennes et les actions du fromager (Irlinger *et al.*, 2007).

La **figure 9** montre la succession des populations au cours de la fabrication de fromages à pâte molle. Trois phases principales peuvent être distinguées :

- En début de fabrication, les bactéries lactiques acidifiantes se multiplient et atteignent environ un milliard de cellules par gramme au bout de 24 heures. Elles transforment le lactose en glucose et en galactose, qui sont dégradés à leur tour en acide lactique essentiellement. Elles assurent donc la phase d'acidification cruciale dans le processus technologique.
- Durant les cinq premiers jours d'affinage, les levures, acidophiles, se développent en surface (par exemple *Debaryomyces*, *Geotrichum*) pour atteindre une population proche de 10^8 d'individus par gramme de fromage. En consommant l'acide lactique du milieu, elles vont permettre la neutralisation du caillé.
- Enfin, la remontée du pH permet, au bout d'une dizaine de jours, le développement d'une flore bactérienne acido-sensible et aérobie. Cette flore bactérienne halotolérante est composée d'une vingtaine de genres différents (ex: *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Glutamicibacter*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*).

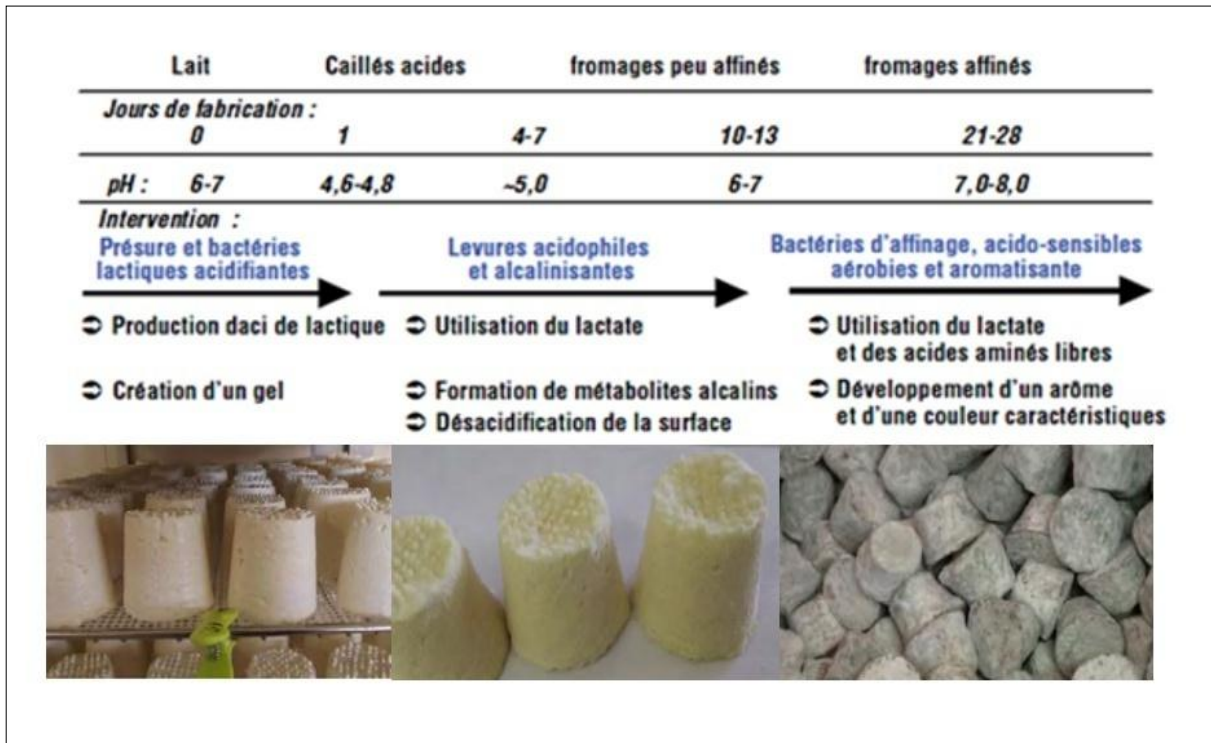


Figure 9. Succession des flores microbiennes au cours de la fabrication d'un fromage à pâte molle croûte lavée. (Irlinger et al., 2007)

Diversité des micro-organismes dans l'écosystème fromager

La revue de Irlinger et al., (2015) a recensé les études portant sur la biodiversité microbienne de la surface de 33 fromages différents et répertorié 104 genres de bactéries (1 Acidobactérie, 28 Actinobactéries, 5 Bactéroidetes, 24 Firmicutes et 46 Protéobactéries) et 39 genres de champignons (21 moisissures et 18 levures) présents dans ces fromages. En moyenne, 102 genres bactériens et 45 genres de champignons ont été détectés sur les croûtes de fromage. Parmi les levures, *Debaryomyces*, *Yarrowia*, *Candida* et *Geotrichum* sont les genres les plus fréquemment détectés (présents respectivement dans 86%, 57%, 54% et 49% des fromages), suivis de *Kluyveromyces* (32%) et *Pichia* (22%). Parmi les champignons filamenteux, *Penicillium* est le plus souvent détecté (dans 19% des fromages) suivi par *Scopulariopsis* et *Fusarium* (tous les deux à 8%).

En surface des fromages, *Staphylococcus* est le genre bactérien appartenant au phylum des Firmicutes le plus fréquemment trouvé (présent dans 78% des fromages). D'autres Firmicutes abondants sont les bactéries lactiques, tels que les genres *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Vagococcus*, présents respectivement dans 50%, 41%, 25%, 22% et 16% des fromages et les bactéries lactiques halophiles comme *Marinilactibacillus* et *Facklamia* (22% et 16% des fromages, respectivement). En ce qui concerne les Actinobactéries, *Brevibacterium*, *Corynebacterium* et *Arthrobacter*, sont les genres les plus fréquents (présents respectivement dans

75%, 75% et 66% des fromages), suivis de *Brachybacterium*, *Microbacterium*, *Agrococcus* et *Micrococcus* (38%, 19% et 19% des fromages, respectivement). Au cœur des fromages, on retrouve surtout des bactéries lactiques (les Firmicutes) telles que les espèces *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc lactis* et *Streptococcus thermophilus* qui constituent la majorité des ferments lactiques intervenant dans l'acidification du lait. D'autres bactéries lactiques comme les Lactobacilles hétérofermentaires facultatives (ex: *L. casei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*) permettent d'accélérer l'affinage par une forte protéolyse ce qui conduit à la production de peptides et d'acides aminés libres.

Une des conclusions de cette partie est que certaines communautés microbiennes d'origine végétale sont également très similaires à celles des produits laitiers fermentés (**Tab10**) à l'exception des espèces *Bacillus* (*Bacillus subtilis* et *Bacillus licheniformis* principalement) qui sont majoritaires dans les produits fermentés à base de soja ([Shrestha et al., 2013](#)).

I.3.3.2. Propriétés fonctionnelles des ferments microbiens

a. Les propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont classées en différents genres, selon la composition de leur paroi cellulaire, leurs caractéristiques biochimiques et génétiques (Stiles and Holzapfel, 1997): *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus*. Du point de vue phylogénique, ces micro-organismes sont des bactéries à Gram-positif, catalase-négatives, asporulées, microaérophiles ou anaérobies facultatives, en forme de coques ou de bâtonnets. Les bactéries lactiques utilisées comme ferment dans la fabrication fromagère ou dans les produits végétaux fermentés ont plusieurs fonctionnalités (Tab12). Les principales activités métaboliques impliquées sont la glycolyse, la lipolyse et la protéolyse (Leroy and De Vuyst, 2004; Smit *et al.*, 2005). Ils ont pour principale fonction de produire de l'acide lactique et, dans certains cas, de contribuer à la production de composés d'arôme, en libérant des précurseurs (ex: acides aminés, acides gras) de ces composés.

La Glycolyse

La glycolyse reste la voie métabolique dominante mise en œuvre par les bactéries lactiques. La dégradation du lactose en acide lactique par la flore lactique comporte plusieurs étapes : le transport du lactose à travers la membrane cellulaire, le catabolisme du lactose selon une voie homofermentaire (donnant lieu à l'acide lactique comme unique produit de dégradation du glucose via la voie de Embden-Meyerhof-Parnas) ou hétérofermentaire (produisant des quantités équimolaires de lactate, éthanol et CO₂ à partir du glucose par la voie des pentoses phosphates) et, enfin, la formation et l'expulsion extracellulaire de l'acide lactique (Fig10). *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* et quelques *Lactobacillus* sont homofermentaires alors que *Weissella*, *Leuconostoc* et quelques *Lactobacillus* sont hétérofermentaires (Caplice and Fitzgerald, 1999; Leroy and De Vuyst, 2004). Les bifidobactéries ont un métabolisme qui leur est propre, à savoir qu'elles produisent un mélange d'acide lactique et d'acide acétique. Certaines espèces peuvent produire de l'acide formique ou de l'acide succinique.

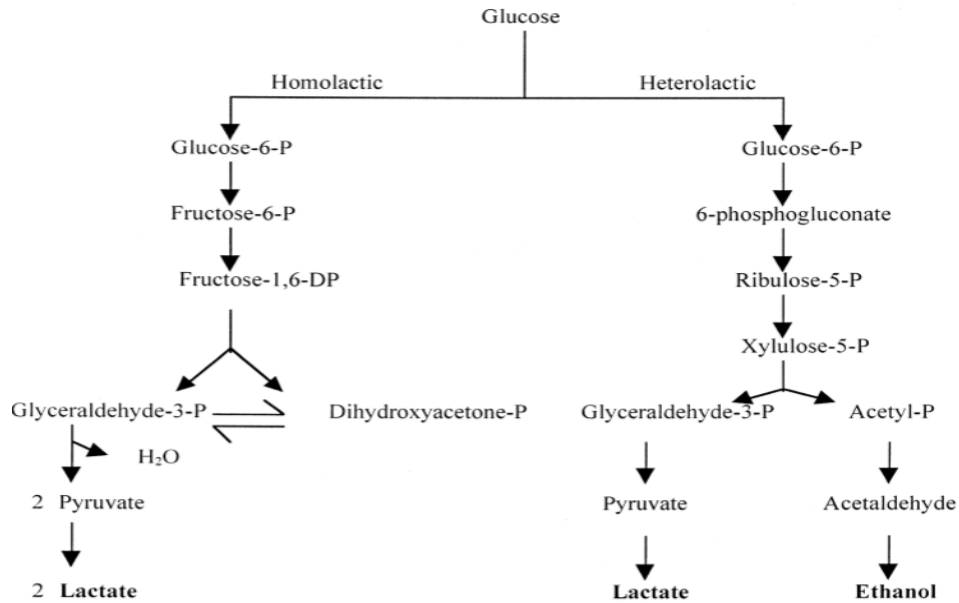


Figure 10. Fermentation du glucose par les bactéries lactiques (Caplice and Fitzgerald, 1999)

La protéolyse : production de composés d'arôme

De nombreux travaux ont démontré le rôle majeur du catabolisme des acides aminés dans l'aromatization des fromages, notamment celui des acides aminés aromatiques, des acides aminés à chaîne carbonée ramifiée et de la L-méthionine. Chez les bactéries lactiques, une voie est principalement impliquée dans la conversion de ces acides aminés en composés d'arôme. Il s'agit de la réaction de transamination catalysée par des aminotransférases. Les aminotransférases (ou transaminases) sont les enzymes responsables de la réaction de transamination des acides aminés. Elles catalysent le transfert d'un groupement NH₂ d'un acide aminé vers un cétoacide et utilisent le phosphate de pyridoxal (PLP) comme cofacteur. L'acide aminé est donc transformé en α-cétoacide, alors que l'α-cétoacide accepteur (le plus fréquemment l'α-cétoglutarate) est converti en l'acide aminé correspondant (Helinck *et al.*, 2004; Yvon and Rijnen, 2001).

Le **tableau 11** présente quelques exemples de catabolisme d'acides aminés sous l'action de la transaminase et les molécules produites. Ces molécules aromatiques présentent des odeurs intéressantes, par exemple : le 2-méthylpropanal présente des notes banane, chocolat, le 3-méthylbutanal présente des notes malt, fromage, le benzaldéhyde a des notes amande cerise, l'acétaldéhyde plutôt des notes yaourt, acre et vert et les esters présentent des notes plutôt fruitées (Smit *et al.*, 2005).

Une étude a mis en évidence le potentiel d'adaptation de 9 souches de *Lactobacillus* dans des suspensions de protéines de pois ainsi que leur pouvoir protéolytique pour produire certains peptides avec un pouvoir antioxydant. Cette étude a montré que *Lactobacillus rhamnosus* BGT10 est la souche la plus intéressante du point de vue de la production de peptides bioactifs (Stanisavljevic et al., 2015)

Tableau 11. Molécules produites par le catabolisme d'acides aminés sous l'action des transaminases (Smit et al., 2005)

Amino acid	Keto acid	Aldehyde	Organic acid	Alcohol (thiol)	Esters (example)
Ile	α -Keto-3-methyl-pentanoic acid	2-Methylbutanal	2-Methyl butyric acid	2-Methylbutanol	
Leu	α -Ketoisocaproic acid	3-Methylbutanal	3-Methylbutyric acid	3-Methylbutanol	Ethyl-3-methylbutanoate
		<i>2-Methylpropanal</i>	2-Methyl propanoic acid	2-Methylpropanol	
Val	α -Ketoisovaleric acid	2-Methylpropanal	2-Methyl propanoic acid	2-Methylpropanol	Ethyl isobutanoate
Phe	Phenyl pyruvate	<i>Benzaldehyde</i>	Benzoic acid	Phenylmethanol	Ethyl benzoate
		Phenylacetaldehyde	Phenylacetic acid	Phenylethanol	Phenylethyl acetate
Trp	Indole-3-pyruvate	Indole-3-acetaldehyde	Indole-3-acetic acid		
Met	α -Keto methylthio butyrate	Methional	Methylthiobutyric acid	Methionol	Ethyl-3-methylthio propionate
		<i>Methylthio-acetaldehyde</i>		Methanethiol	Methylthioacetate

Catabolisme du citrate

La fermentation du citrate est associée principalement aux genres *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus* et *Lactobacillus* et principalement aux espèces *Lactococcus lactis subsp. lactis* et *Lactococcus mesenteroides subsp. Cremoris* qui sont largement utilisées dans les produits laitiers. Ce métabolisme est déclenché suite à la présence d'excès de molécules de pyruvate dans les cellules. Le pyruvate est converti en α -acétolactate puis en diacetyl, molécule responsable de l'arôme beurre, crème et noisette (Caplice and Fitzgerald, 1999). Cependant, le pyruvate peut aussi conduire à la génération de nombreux autres métabolites tels que l'acétate, l'éthanol, et l'acétaldéhyde (Fig11).

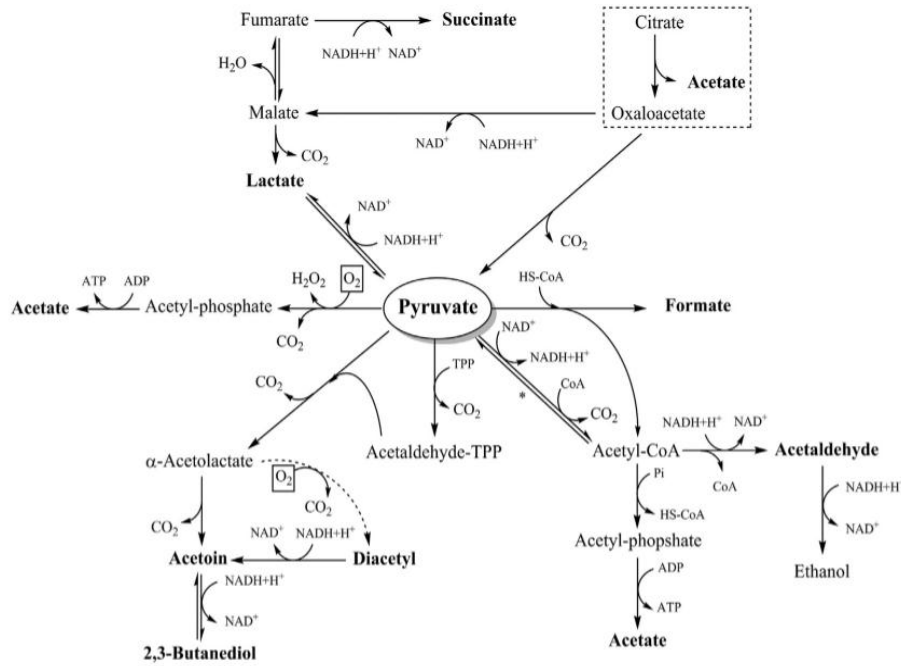


Figure 11. Métabolisme du pyruvate par les bactéries lactiques et les produits formés (Peyer et al., 2016)

La production d'exopolysaccharides (EPS)

Deux types d'EPS sont produits par les bactéries lactiques : les homopolysaccharides (HoPS) comme les polymères glucane et fructane, et les hétéropolysaccharides (HePS) qui sont des unités composées de galactose, glucose, fructose et rhamnose. Pendant la fabrication des levains, les bactéries lactiques produisent un nombre de composés comme les acides organiques et les exopolysaccharides (EPS), qui affectent de manière positive la texture (Ketabi et al., 2008). Ils sont utilisés pour remplacer ou réduire l'utilisation d'additifs. La production des EPS par les bactéries lactiques a également un impact sur le paramètre d'absorption d'eau, la stabilité pendant le stockage et les propriétés rhéologiques du levain. Dans le cas des yaourts, les HePS sont produits principalement par *Streptococcus thermophilus* ainsi que par certaines souches de *Lactobacillus bulgaricus*. Ces yaourts présentent une texture plus crémeuse et plus agréable, un gel plus ferme ainsi qu'une faible synérèse en comparaison avec des yaourts sans EPS (Ravyts et al., 2012).

Effet antimicrobien

La conversion du lactose en lactate entraîne une baisse du pH d'environ 2 unités et la solubilisation des minéraux liés aux caséines dans le cas des produits laitiers. Cette acidification peut donc constituer une barrière pour le développement des flores acido-sensibles dont certaines espèces comme *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ou *E. coli* sont potentiellement pathogènes.

(Ravyts *et al.*, 2012). En outre, certaines souches isolées de produits laitiers fermentés et appartenant aux genres microbiens *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, et *Pediococcus*, produisent des bactériocines comme la nisine et la lacticine (Sobrino-López and Martín-Belloso, 2008).

Dans les levains de pain, on note généralement la présence de forme sporulée principalement *B. subtilis*, *B. licheniformis* et *B. cereus* provenant de la matière première, qui sont capables de survivre pendant tout le procédé de cuisson de pain. Les bactéries lactiques dominent généralement l'écosystème des levains et permettent d'inhiber la croissance de ces espèces indésirables. De plus, la conversion de la L-phénylalanine par les bactéries lactiques génèrent la production de l'acide L-phényl-3-lactique, composé antimicrobien (Lavermicocca *et al.*, 2003). Un autre exemple de composé est la reutericycline, un antibiotique produit par *Lactobacillus reuteri* (Ravyts *et al.*, 2012).

Différentes espèces de bactéries lactiques isolées du kimchi, aliment fermenté coréen à base de légumes, produisent des composés antimicrobiens comme les bactériocines (*L. lactis* BH5 et *L. citreum* GJ7) et les pédiocines (*P. pentosaeus*). Cette activité antimicrobienne lutte contre des formes pathogènes telles que *L. monocytogenes*, *S. aureus* et *E. coli*.

Propriétés probiotiques

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit les probiotiques comme des micro-organismes vivants, qui, lorsqu'ils sont consommés en quantité suffisante dans l'alimentation, ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte. Les souches de bactéries lactiques probiotiques proviennent des aliments et appartiennent principalement aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. Les effets bénéfiques de ces souches probiotiques sur la santé du consommateur, notamment l'amélioration de la digestion du lactose, la reconstitution de la flore intestinale, la prévention ou la réduction de la durée de la diarrhée (notamment les diarrhées provoquées par le rotavirus et par *Clostridium difficile*), la diminution du risque d'allergie alimentaire, la stimulation et la modulation du système immunitaire, l'amélioration de la maladie inflammatoire intestinale et la prévention du cancer n'ont toutefois été démontrés que pour un nombre limité de souches. Ces effets sur la santé peuvent s'expliquer par des mécanismes tels que certaines activités microbiennes spécifiques (production de certaines enzymes ou facteurs de croissance), des interactions microbiennes (production de peroxyde d'hydrogène, acides organiques et peptides antibactériens), des interactions avec l'épithélium intestinal (concurrence pour les récepteurs situés sur l'épithélium intestinal) et des interactions avec le système immunitaire (Yao *et al.*, 2009). Ces propriétés intéressantes ont été mises en évidence dans différents produits fermentés tels que le yaourt, les produits amylicés

alcoolisés ou non ainsi que les produits à base de végétaux (comme le kimchi) (Tamang *et al.*, 2009).

b. Les propriétés fonctionnelles des bactéries autres que lactiques

Cette flore est généralement aérobie, mésophile et halotolérante mais acido-sensible. Ces bactéries appartiennent principalement à trois groupes : Proteobacteria, Firmicutes (*Staphylococcus* et *Bacillus*), et Actinobacteria (Mounier *et al.*, 2009).

Le genre *Staphylococcus* appartient à la sous-branche des *Clostridium-Bacillus* qui comprend toutes les espèces à Gram-positif. Certaines espèces, productrices de coagulase et/ou d'entérotoxines, sont potentiellement pathogènes (ex. *Staphylococcus aureus*). Par contre, les espèces à coagulase-négative ne sont pas pathogènes ou alors uniquement de façon opportuniste, et sont retrouvées le plus fréquemment dans les écosystèmes fromagers mais aussi dans des produits à base de soja (Tab12). *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus vitulinus* et *Staphylococcus xylosus* sont les espèces les plus fréquemment retrouvées sur les fromages à croûte lavée (Irlinger *et al.*, 1997). Ces bactéries jouent un rôle majeur dans l'affinage des fromages, par leurs activités protéolytiques, lipolytiques et estérasiques conduisant à la formation de nombreux composés d'arôme dans la matrice fromagère et à la coloration de la croûte.

Bacillus

Les *Bacillus* sont présents dans les produits fermentés alcalins en Asie et en Afrique. Les espèces de *Bacillus* les plus présentes dans les produits à base de légumineuses sont *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus subtilis var. natto*, et *Bacillus thuringiensis* (Shrestha *et al.*, 2013; Tamang *et al.*, 2016a). Dans certains cas, *Bacillus cereus* est détecté. Certaines espèces de *B. subtilis* ou *B. licheniformis* produisent à partir du glucose ou du glycérol de l'acide λ -polyglutamic (PGA), un acide aminé polymère qui n'est pas toxique, complètement biodégradable et soluble dans l'eau (Tamang *et al.*, 2016a). Le PGA possède un caractère pseudoplastique fort, lui conférant des propriétés rhéologiques particulières, dépendantes de la force d'agitation. L'importance de la valeur de sa viscosité sera aussi liée à son poids moléculaire (PM). Plus ce PM est important, plus le mélange sera visqueux. La préparation peut toutefois être fluidifiée par des adjuvants tels que le CaCl_2 . Cette fluidité est nécessaire pour l'accès de la souche aux différents nutriments et à l'oxygène. Le PGA confère le caractère collant du tofu fermenté, par exemple le sufu (Shrestha *et al.*, 2013; Tamang *et al.*, 2016a).

Au cours de la fermentation, les *Bacillus* produisent également des enzymes pour décomposer les molécules complexes en simples molécules, qui ont plusieurs activités biologiques

telles que : protéinase, amylase, mannase, cellulase, et catalase. Certains peptides ou acides aminés produits peuvent avoir des effets bénéfiques pour la santé. L'ammoniac est libéré et le pH atteint rapidement des valeurs proches de 8,0, voire supérieures (Steinkraus K.H, 2002; Visessanguan *et al.*, 2005).

Dans le natto, *Bacillus subtilis subsp. natto* produit des nattokinases qui ont une activité fibrinolytique. Il génère aussi l'augmentation des saponines qui présentent des effets bénéfiques pour la santé tels que: la prévention contre l'hypercholestérolémie ou la prolifération du cancer du côlon, effet anti-peroxydation des lipides (Tamang *et al.*, 2016a). Il a aussi été montré que les *Bacillus* peuvent hydrolyser des isoflavones glucosidiques en aglycones pendant la fermentation de certains produits asiatiques à base de soja tels que le natto, le sufu, le douchi. Ces composés augmentent l'activation des récepteurs LDL-C qui préviennent contre les maladies cardiovasculaires. Dans certains cas, les *Bacillus* présentent des propriétés antioxydantes intéressantes et leur activité permet d'augmenter la présence de l'acide folique et de la riboflavine (Tamang *et al.*, 2016a)..

c. Les propriétés fonctionnelles des moisissures/levures

Les levures sont des champignons unicellulaires pour tout ou une partie de leur cycle végétatif. De nombreux genres de levures sont retrouvés dans le fromage et autres produits fermentés (Tab12). Ces micro-organismes sont particulièrement adaptés à ces types de produits, car ils ont la capacité de se développer à basse température, à pH acide et, pour certaines espèces, à de fortes concentrations en sel (Fleet, 1993). Les espèces les plus fréquemment isolées et identifiées en industrie appartiennent aux genres *Candida*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, et *Yarrowia* mais on détecte aussi la présence de moisissures telles que *Rhizopus* et *Aspergillus* dans les produits fermentés, en particulier asiatiques.

Toutes les levures peuvent assimiler les sucres en présence d'oxygène, c'est la respiration. Certaines levures sont capables de fermenter les sucres en éthanol CO₂. C'est le cas, par exemple de *Saccharomyces cerevisiae*, ou, dans une moindre mesure, de *Geotrichum candidum* ou de certaines levures du genre *Candida* ou *Kluyveromyces*. Le rôle le plus largement décrit des levures dans la fabrication fromagère est la consommation de l'acide lactique, qui provoque la désacidification du caillé rendant possible le développement des bactéries d'affinage acido-sensibles. Les levures sont aussi impliquées dans de nombreux phénomènes, tels que l'inhibition de micro-organismes indésirables (principalement *Mucor* et *Penicillium*) et l'excrétion de facteurs de croissance (vitamines-B, acide pantothénique, acide nicotinique, riboflavine et biotine) (Fleet, 1993). Dans le tempeh à base de pois, il a été montré que les moisissures des genres *Rhizopus* et *Aspergillus*, génèrent l'augmentation de la teneur de thiamine et riboflavine dans le produit, ainsi que la biodisponibilité

des protéines (Starzyńska-Janiszewska *et al.*, 2012).

Dans le tempeh (à base de soja), *Rhizopus oligosporus* permet l'augmentation de l'acide folique, la niacine, la riboflavine, la nicotinamide et la pyridoxine (Tamang *et al.*, 2016a). Certaines levures possèdent également des enzymes intéressantes capables d'intervenir dans la protéolyse, la lipolyse ou encore dans le catabolisme des acides aminés ou des acides gras. Ces activités se traduisent notamment par la libération de composés aromatiques, et contribuent donc directement à l'élaboration des caractéristiques sensorielles des produits. Certaines souches de *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis* et *Pichia manschuria* isolées de produits fermentés à base de céréales tels que l'idli et le jalebi, produisent de la vitamine B12 (Tamang *et al.*, 2016a).

Le rôle de chaque levure varie d'une espèce à l'autre. Par exemple *Kluyveromyces lactis* et *Kluyveromyces marxianus* sont deux levures très utilisées en industrie laitière et dans d'autres produits fermentés comme le pulque et le wari (Tab12) pour leur capacité à consommer le lactate (Cholet *et al.*, 2007). Ce genre est aussi capable de produire des composés d'arôme variés, principalement des esters, dont l'acétate d'éthyle, aux notes fruitées et des alcools. Cette production suit la croissance de cette levure et provient du métabolisme de l'éthanol et du lactose. Les acides aminés sont également les précurseurs de nombreux composés aromatiques produits par les levures. Une désamination des acides aminés, acide glutamique ou aspartique, leucine ou phénylalanine, conduit à la formation d'aldéhydes. Une déshydrogénase peut alors convertir l'aldéhyde en alcool.

La présence de moisissures internes ou superficielles caractérise divers types de fromages. Sur le plan technologique, les espèces les plus étudiées appartiennent au genre *Penicillium*. Elles contribuent, en métabolisant l'acide lactique, à la neutralisation de la pâte et produisent de nombreuses enzymes qui participent à la maturation du fromage. *Penicillium camemberti* est le champignon des fromages à pâte molle et à croûte fleurie, type camembert, brie, coulommier ou Carré de l'Est. Il recouvre ensuite toute la surface du fromage d'un feutrage blanc. Sa croissance est rapide. Ce champignon possède un système protéolytique complexe et une activité lipasique importante, ce qui lui confère un rôle important dans l'aromatisation des fromages. *P. camemberti* joue également un rôle majeur dans la maturation des fromages à croûte fleurie, notamment en consommant le lactate et en produisant de grandes quantités de CO₂ qui changent l'environnement gazeux des hâloirs. De plus, en se développant, le mycélium de *P. camemberti* forme une barrière qui empêche la prolifération de bactéries pathogènes et de moisissures indésirables. Il possède donc certaines caractéristiques biochimiques qui en font un micro-organisme indispensable à la maturation des fromages à pâte molle et à croûte fleurie. Certaines moisissures des genres *Actinomucor*, *Amylomyces*, *Aspergillus*, *Monascus*, *Mucor*, et *Neurospora* ont été identifiées dans les

produits fermentés asiatiques et les boissons alcoolisées. Elles produisent des enzymes telles que l' α -amylase, l'amyloglucosidase, le maltase, l'invertase, la pectinase, la β -galactosidase, la cellulase, l'hemi-cellulase, les protéases acides et basiques, et les lipases (Tamang *et al.*, 2016a) leur permettant de dégrader efficacement une grande variété de substrats végétaux. A titre d'exemple, on peut citer la Taka-amylase A (TAA), une enzyme produite par *Aspergillus oryzae* dans le koji qui est très utilisée en industrie.

Chapitre I – Etude bibliographique

Tableau 12. Utilisation des bactéries, levures dans les produits alimentaires

Bleu : aliment à base de protéines laitières
Rouge : aliment à base de protéines animales autres que laitière
Jaune : aliment à base de protéines végétales autres que légumineuses

Genre	Espèces	Aliments	Références
<i>Arthrobacter</i>	<i>arilaitensis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Fromages • Viande fermentée 	<ul style="list-style-type: none"> • Monnet et Irlinger 2012; Dugat-Bony <i>et al.</i>, 2015; Mounier <i>et al.</i>, 2006; Irlinger <i>et al.</i>, 2015
<i>Brevibacterium</i>		Belacan : crevettes fermentées	Salampessy <i>et al.</i> , 2010
<i>Brevibacterium</i>	<i>aurantiacum</i>	Fromages	Dugat-Bony <i>et al.</i> , 2015, ; Monnet <i>et al.</i> , 2015
<i>Brevibacterium</i>	<i>casei</i>	Cheddar	Monnet <i>et al.</i> , 2015
<i>Brevibacterium</i>	<i>antiquum</i>	Pâte pressée	Monnet <i>et al.</i> , 2015
<i>Corynebacterium</i>		<ul style="list-style-type: none"> • Lait • Doenjang-meju : soja fermenté • Gari : gingembre mariné • Manioc fermenté • Ogi: maïs fermenté 	<ul style="list-style-type: none"> • Irlinger <i>et al.</i>, 2007 • Jung <i>et al.</i>, 2014 • Demarigny Gerber, 2014
<i>Corynebacterium</i>	<i>variabile et stationis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Fromages variés • Kedong sufu: tofu fermenté 	<ul style="list-style-type: none"> • Dugat-Bony <i>et al.</i>, 2016 • Feng et Gao, 2013
<i>Corynebacterium</i>	<i>casei</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Fromages 	Dugat-Bony <i>et al.</i> , 2016, 2015; Irlinger <i>et al.</i> , 2015; Mounier <i>et al.</i> , 2006; Bokulich <i>et al.</i> , 2013; Monnet <i>et al.</i> , 2015; Irlinger <i>et al.</i> , 2007
<i>Hafnia</i>	<i>alvei</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Fromages • Viande fermentée • Pulque : sève d'agave fermentée 	<ul style="list-style-type: none"> • Dugat-Bony <i>et al.</i>, 2016, 2015; Irlinger <i>et al.</i>, 2012; Monnet <i>et al.</i>, 2015 • Escalante <i>et al.</i>, 2008

Chapitre I – Etude bibliographique

Genre	Espèces	Aliments	Références
<i>Bacillus</i>	spp.	<ul style="list-style-type: none"> • Fufu, Lafun, Chikwangue : manioc • Belacan : crevettes fermentées • Doenjang : soja fermenté 	<ul style="list-style-type: none"> • Odunfa and Oyewole, 1997; Demarigny et Gerber 2014 • Salampessy <i>et al.</i>, 2010 • Jung <i>et al.</i>, 2014; Kim <i>et al.</i>, 2009
<i>Bacillus</i>	<i>altitudinis</i>	Fromages	Monnet <i>et al.</i> , 2015
<i>Lactobacillus</i>	spp.	<ul style="list-style-type: none"> • Lait • Doenjang, Cheonggukjang : soja fermenté • Kimchi : légumes fermentés 	<ul style="list-style-type: none"> • Irlinger <i>et al.</i>, 2007 • Kim <i>et al.</i>, 2009; Jung <i>et al.</i>, 2014; Nam <i>et al.</i>, 2012 • Jung <i>et al.</i>, 2011
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Kivunde : manioc fermenté • Olives • Ekung : bambou fermenté 	<ul style="list-style-type: none"> • Kimaryo <i>et al.</i>, 2000 • Chammen <i>et al.</i>, 2005; Aponte <i>et al.</i>, 2012 • Tamang <i>et al.</i>, 2009
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhammosus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Fromages • Viande fermentée 	<ul style="list-style-type: none"> • Demarigny et Gerber 2014; Irlinger <i>et al.</i>, 2015 • Liu <i>et al.</i>, 2011
<i>Lactococcus</i>	spp.	<ul style="list-style-type: none"> • Produits de manioc • Lait 	Irlinger <i>et al.</i> , 2007
<i>Lactococcus</i>	<i>lactis subsp. lactis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Fromages • Kimchi : légumes fermentés • Tofu : fromage de soja • Pulque : sève d'agave fermenté • Jambon taiwanais fermenté 	<ul style="list-style-type: none"> • Dugat-Bonyet <i>et al.</i>, 2015; Irlinger <i>et al.</i>, 2015 • Chang <i>et al.</i>, 2008 • Chao <i>et al.</i>, 2008 • Escalante <i>et al.</i>, 2008 • Chao <i>et al.</i>, 2008
<i>Leuconostoc</i>	spp.	• Lait	• Irlinger <i>et al.</i> , 2007
<i>Leuconostoc</i>	<i>pseudo-mesenteroides</i>	Kimchi : légumes fermentés	Chang <i>et al.</i> , 2008
<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Soja fermenté : Doenjang, sufu... • Idli, Dosa : lentilles noires fermentées 	<ul style="list-style-type: none"> • Feng <i>et al.</i>, 2013 ; Kim <i>et al.</i>, 2009 • Steinkraus, 2002
<i>Leuconostoc</i>	<i>lactis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Fromages • Soja fermenté : Tauco, Tofu... 	<ul style="list-style-type: none"> • Irlinger <i>et al.</i>, 2015; Irlinger <i>et al.</i>, 2007; Monnet <i>et al.</i>, 2015 • Chao <i>et al.</i>, 2008
<i>Staphylococcus</i>	spp.	<ul style="list-style-type: none"> • Lait • Kecap : sauce soja 	<ul style="list-style-type: none"> • Irlinger <i>et al.</i>, 2007 • Alexandraki <i>et al.</i>, 2013
<i>Staphylococcus</i>	<i>sciuri, carnosus, saprophyticus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Fromages • Kedong sufu : tofu fermenté 	<ul style="list-style-type: none"> • Dugat-Bony <i>et al.</i>, 2016 • Feng <i>et al.</i>, 2013
<i>Staphylococcus</i>	<i>equorum</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Fromages • Doenjang : soja fermenté 	<ul style="list-style-type: none"> • Dugat-Bony <i>et al.</i>, 2016, 2015; Monnet <i>et al.</i>, 2015 • Jung <i>et al.</i>, 2014

Chapitre I – Etude bibliographique

Genre	Espèces	Aliments	Références
<i>Candida</i>	spp.	<ul style="list-style-type: none"> • Lait • Fromages • Doenjang, Kecap: soja fermenté • Pulque: sève d'agave fermenté • Fufu, Lafun: manioc fermenté 	<ul style="list-style-type: none"> • Irlinger <i>et al.</i>, 2015; 2007 • Kim <i>et al.</i>, 2009; Alexandraki <i>et al.</i>, 2013 • Demarigny et Gerber 2014
<i>Candida</i>	<i>krusei</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Cacao fermenté • Agbelina: manioc fermenté 	<ul style="list-style-type: none"> • Nielsen <i>et al.</i>, 2007 • Demarigny et Gerber 2014
<i>Candida</i>	<i>famata</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Fromages • Viande 	<ul style="list-style-type: none"> • Tamang <i>et al.</i>, 2016a,b
<i>Debaryomyces</i>	spp.	<ul style="list-style-type: none"> • Kecap : sauce soja • Fruits 	<ul style="list-style-type: none"> • Alexandraki <i>et al.</i>, 2013 • Nielsen <i>et al.</i>, 2007; Di Cogno <i>et al.</i>, 2013
<i>Debaryomyces</i>	<i>hansenii</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Seltori : pain de riz • Idli, Wari, Bhallae : lentilles noires fermentées • Kisra : galette de blé • Fromages • Doenjang : soja fermenté • Lait de vache • Viande 	<ul style="list-style-type: none"> • Demarigny et Gerber, 2014 • Sridevi <i>et al.</i>, 2010; Rani et Soni, 2007 • Dugat-Bony <i>et al.</i>, 2015; Irlinger <i>et al.</i>, 2007; Irlinger <i>et al.</i>, 2015; Tamang <i>et al.</i>, 2016a • Kim <i>et al.</i>, 2009 • Tamang <i>et al.</i>, 2016
<i>Geotrichum</i>		Doenjang : soja fermenté	Jung <i>et al.</i> , 2014
<i>Geotrichum</i>	<i>candidum</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Fromages • Aliments à base de lentilles noires : wari, bhallae... • Kinema : soja fermenté • Viande 	<ul style="list-style-type: none"> • Dugat-Bony <i>et al.</i>, 2015; Irlinger <i>et al.</i>, 2007; Boutrou et Gueguen, 2005; Irlinger <i>et al.</i>, 2015; Tamang <i>et al.</i>, 2016a. • Rani et Soni, 2007 • Sarkar <i>et al.</i>, 1994 • Tamang <i>et al.</i>, 2016a
<i>Kluyveromyces</i>		Cacao fermenté	Nielsen <i>et al.</i> , 2007
<i>Kluyveromyces</i>	<i>marxianus</i>	Wari : lentilles noires fermentés	Rani et Soni, 2007
<i>Kluyveromyces</i>	<i>lactis</i>	• Fromages	• Dugat-Bony <i>et al.</i> , 2015 ; Irlinger <i>et al.</i> , 2007
<i>Yarrowia</i>	<i>lipolytica</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Lait de vache • Fromages 	<ul style="list-style-type: none"> • Irlinger <i>et al.</i>, 2007 • Mounier <i>et al.</i>, 2008; Irlinger <i>et al.</i>, 2015

1.3.4. Les stratégies d'assemblage raisonné pour l'élaboration d'écosystèmes microbiens efficaces et innovants

1.3.4.1. Notion d'écosystème

Un écosystème est un système fonctionnel formé par un groupement ou une communauté d'organismes (bactéries, levures, moisissures), en l'occurrence de micro-organismes (biocénose) en constante interaction avec un environnement abiotique (biotop) dont les facteurs physiques, chimiques ou biologiques agissent sur la biocénose (l'ensemble des êtres vivants d'un biotope, d'un milieu donné). Les écosystèmes microbiens peuvent être naturels ou sélectionnés (Demarigny and Gerber, 2014). La composition physico-chimique de la matière première, son évolution (ex: pH, activité de l'eau (aw), métabolites), les conditions environnementales de fabrication sont des éléments essentiels du biotope. Le fonctionnement des écosystèmes « microbiens » est la clef de voûte de la construction des différentes dimensions (sanitaire, sensorielle, santé) de la qualité des produits finis.

1.3.4.2. Approches empiriques

Toute matière première comestible pour l'homme, animale ou végétale, se transforme sous l'action des écosystèmes microbiens ambiants. L'homme a donc été confronté très tôt à la compétition avec les micro-organismes pour préserver les matières premières qu'il récoltait, issues de la cueillette ou de la chasse, et donc à la difficulté de sécuriser dans le temps son alimentation. Non seulement celle-ci peut être altérée, mais elle peut aussi comprendre des germes dangereux. Tout son génie a été, par l'observation et via des procédés simples, de sélectionner, d'orienter les écosystèmes microbiens présents vers une évolution plus conforme à ses besoins.

A partir des découvertes de Pasteur en 1865, des approches biochimiques et d'isolement microbien se développent et permettent ainsi de décrire les principaux acteurs microbiens cultivables impliqués, amenant à des pratiques d'ensemencement volontaire. La pertinence de la méthode pasteurienne tient du choix des milieux sur lesquels le maximum de populations microbiennes doit se développer (Montel *et al.*, 2012). Ces milieux doivent être assez sélectifs pour faciliter la quantification a minima des grands groupes microbiens (bactéries lactiques, bactéries d'affinage, levures, Gram négatif) et pouvoir fournir une image de la communauté par le calcul de leur pourcentage respectif. L'approche pasteurienne, avec des études portant sur des cultures pures, n'a pas permis de répondre à certaines questions écologiques et complexes (arômes, couleur, texture :en général, une souche ne peut pas apporter, seule, les services écosystémiques attendus). Comment dessiner des consortia microbiens avec des fonctionnalités écologiques, sensorielles et sanitaires souhaitées ?

1.3.4.3. Approches scientifiques par simplification de communautés naturelles complexes : consortia naturels simplifiés

Une méthode originale de (Bonaïti *et al.*, 2005) a été développée permettant l'étude dynamique et fonctionnelle de l'écosystème fromager. Une réduction progressive de l'écosystème complexe d'un fromage, a été réalisée en cherchant à maintenir une de ses fonctionnalités essentielles : la production de l'odeur. Le principe est le suivant : à partir de la caractérisation de plus de 900 micro-organismes isolés de la surface du fromage, les chercheurs ont sélectionné 82 souches (49 bactéries et 33 levures). Par une approche dichotomique, des sous-groupes comportant un nombre de plus en plus réduit de souches (42, puis 21, et enfin 11 souches) ont été constitués, avec, à chaque réduction, une sélection - par un test olfactif - des associations qui apportent les propriétés sensorielles les plus proches de l'association la plus complexe (82 souches). Au final, il a été possible de diminuer jusqu'à 11, le nombre de souches, tout en conservant les propriétés technologiques de l'écosystème d'origine. Cette méthode a ouvert de nouvelles perspectives pour la maîtrise de l'affinage des fromages. Les sous-écosystèmes simplifiés adaptés et fonctionnels, ainsi obtenus ont facilité l'étude de certaines fonctions cibles et de leur expression. D'autres études ont suivi cette approche de simplification des écosystèmes. Ainsi, des écosystèmes simplifiés ont été conçus avec les mêmes propriétés anti-*Listeria* qu'un consortium plus complexe (Callon *et al.*, 2011; Imran *et al.*, 2013, 2010) ou produisant des molécules d'intérêt comme la bioconversion de l'éthanol (Shong *et al.*, 2012).

1.3.5. Synthèse

Cette troisième partie de la synthèse bibliographique a permis d'acquérir des connaissances sur les différents types de produits fermentés à base de légumineuses en particulier le soja ainsi que les communautés microbiennes présentes et leurs fonctionnalités. Certaines de ces communautés microbiennes d'origine végétale sont également très similaires à celles des produits laitiers fermentés, notamment le fromage. De plus, cette synthèse met en lumière le manque de connaissances sur les capacités de colonisation et d'adaptation des acteurs microbiens, qui se développent dans les différents produits fermentés à base de protéines de pois. En se basant sur les connaissances acquises (littératures, gènes présents dans le génome, phénotypie, fonctionnalités de chaque micro-organisme, compositions fines des substrats), l'objectif est d'assembler des souches avec des fonctionnalités complémentaires et recherchées pour développer un produit à base de protéines de pois avec des propriétés sensorielles intéressantes.

I.4. Objectifs des travaux de thèse et démarche expérimentale

Comme souligné dans la synthèse bibliographique, les protéines de pois sont responsables de multiples défauts sensoriels, notamment aromatiques et sapides. Or ces défauts sont un réel frein à l'acceptabilité des produits formulés à base de pois par les consommateurs. La fermentation des produits alimentaires est un procédé ancien qui pourrait être utilisée pour lever ces verrous sensoriels. La fermentation présente de nombreux bénéfices sensoriels et nutritionnels, largement démontrés dans la littérature. Il s'agit d'un procédé parfaitement maîtrisé par la filière des industries laitières, et qui pourrait donc être transposé à des matrices végétales. L'analyse de la littérature fait ressortir que certaines communautés microbiennes d'origine végétale sont similaires à celle des produits laitiers fermentés et notamment le fromage.

Dans ce contexte, les travaux réalisés dans ce projet de thèse ont visé à répondre à la question de recherche suivante : « **Quels sont les bénéfices sensoriels liés à la fermentation d'un aliment enrichi en protéines de pois ?** ».

Pour cela, des aliments fermentés enrichis en protéines de pois ont été développés, avec pour cible d'améliorer leurs qualités sensorielles en jouant sur la formulation, tant au niveau de la matrice c'est-à-dire sa composition et sa structure, que des associations microbiennes pour les fermenter.

Ainsi ce projet de thèse peut être décliné par différentes questions de recherche :

- quel est l'impact de consortia microbiens laitiers sur les qualités sensorielles des gels protéiques contenant des protéines végétales ?
- quels leviers de formulation (fermentation et/ou composition des gels) permettent de moduler ou réduire les défauts d'arômes et de saveurs ?
- quelles sont les stratégies qui permettent à un écosystème microbien synthétique de s'adapter à un autre environnement que celui d'origine ?

Pour répondre à ces questions de recherche, une démarche expérimentale en 5 phases a été entreprise. Les objectifs respectifs des différentes phases sont détaillés dans le **tableau 13**.

Tableau 13.Démarche de la thèse, présentée en 5 phases, avec leur objectif et le type de produit utilisé pour y répondre

Phase	Objectifs/Questions de recherche	Produits support pour l'étude
1	Quel type de matrice (type de protéines / MG) et quels micro-organismes ?	Sans a priori-(travail expert, étude bibliographique)
2	Comment obtenir des gels enrichis en protéines de pois avec une forte teneur en protéines ?	Gels obtenus à partir de suspensions protéiques et émulsions protéiques
3	Quels micro-organismes/communautés microbiennes s'adaptent aux émulsions enrichies en protéines de pois ?	Emulsions protéiques fermentées
4	Comment s'adaptent les communautés microbiennes sélectionnées aux gels enrichis en protéines de pois ?	Gels protéiques fermentés
5	Quels sont les caractéristiques sensorielles (défauts) des gels enrichis en protéines de pois ?	Gels protéiques fermentés

La première phase du travail s'est appuyée sur les connaissances issues de la littérature et la connaissance des experts, aussi bien sur le volet caractéristique des matières premières, que sur le volet transformation (structuration et fermentation), ou que sur le volet connaissances des micro-organismes. Ce travail préliminaire avait pour objectif de sélectionner la composition des matrices support de l'ensemble de l'étude : la nature et la teneur en protéines végétales, la nature et la teneur en matière grasse, les ingrédients et additifs nécessaires pour la gélification des produits et enfin, le choix des micro-organismes ainsi que la stratégie d'association de ces derniers en consortia. Cette première phase est organisée en deux sous parties :

- a. **Choix des matières premières** : Nous avons choisi de travailler sur deux types de matrices : une matrice végétale (100% protéines de pois) et une matrice mixte (50% protéines de pois/50% protéines de lait) contenant 10% d'huile de colza.
- b. **Sélection des micro-organismes** : A partir de la connaissance des fonctions des micro-organismes, de leur proximité phylogénétique et de la composition des matrices, des micro-organismes ont été sélectionnés pour des fonctions cibles identifiées, comme leurs activités protéolytique, lipolytique, aromatisante, désamérisante ou encore texturante. En se basant sur la littérature, d'autres micro-organismes utilisés dans la fermentation des produits végétaux ont également été sélectionnés. Le choix de

l'ensemble des micro-organismes a été réalisé dans l'objectif de mimer la structure et le fonctionnement de consortia microbiens de type "affinage de fromage", permettant de classer les micro-organismes en groupes fonctionnels.

La deuxième phase du projet avait pour objectif d'obtenir des gels enrichis en protéines végétales. Sur la base des choix réalisés dans la phase 1, et les informations disponibles dans la littérature sur la coagulation des protéines végétales et des protéines de lait, différents types de coagulation (chimique, enzymatique et thermique) ont été réalisés afin d'obtenir des gels de structures variées. La structuration des systèmes assemblés de protéines végétales seules et en mélange avec les protéines de lait ont été caractérisées avant, puis pendant la formation des gels.

La troisième phase avait pour objectif de sélectionner les communautés microbiennes simplifiées adaptées à la fermentation de produits enrichis en protéines végétales. Dans cette partie, la fermentation a été réalisée sur des matrices non gélifiées (émulsions) ceci afin de permettre la mise en place d'une stratégie la plus rapide possible pour la sélection des communautés microbiennes d'une part, mais aussi pour nous permettre de découpler l'impact de la composition et de la structure des matrices sur la fermentation d'autre part. Les fermentations des deux émulsions contenant 100% de protéines de pois ou le mélange 50/50 protéines de pois et protéines de lait, ont été réalisées pendant 3 jours à 25°C en cultures pures et en association (3, 6 et 9 souches). La croissance des populations microbiennes, le pH ainsi que les descripteurs sensoriels liés à l'arôme des produits ont été mesurés et ont été les critères de sélection des cocktails microbiens. Un écosystème microbien par matrice, présentant des descripteurs sensoriels spécifiques et différents du témoin non fermenté, a été choisi pour chaque type d'émulsion : VEGAN pour la matrice végétale (100% protéines de pois) et MEGAN pour la matrice mixte (50/50 protéines de pois et lait).

La quatrième phase avait pour objectif d'étudier le potentiel d'adaptation et de fonctionnement des écosystèmes sélectionnés sur les deux types de gels formulés dans la phase 2. Un gelet un consortium microbien de référence ont été rajoutés (gel 100% protéines de lait et consortium ExeCo : un écosystème modèle microbien simplifié type fromage à pâte molle). Dans cette partie, les différents consortia microbiens ont été testés dans les 3 types de gels (100% lait, 100% pois et 50/50 lait+pois). Des dénombrements microbiens sur chaque matrice et écosystème pour suivre l'évolution de la diversité microbienne, complétés par une analyse métagénomique (type metabarcoding), à différents temps d'affinage (3 et 7 jours), ont été effectués. Ces analyses ont été complétés par des mesures de pH, et une caractérisation des composés d'arôme par analyses instrumentale (GC-MS) et sensorielle (profil CATA). Enfin, la dernière étape de cette phase du travail s'est intéressée à l'étude du potentiel d'adaptation de deux communautés microbiennes composées des mêmes espèces mais de souches différentes et dont l'origine sera pour l'une laitière et pour

l'autre végétale. Ainsi les consortia MEGAN d'origine animale (MEGAN_A) et d'origine végétale (MEGAN_V) ont été testés sur les différentes matrices (gel végétal, gel mixte et gel lait).

Enfin, la dernière phase de ce travail avait pour objectif de caractériser les défauts/bénéfices sensoriels de la fermentation dans les matrices enrichies en protéines de pois du point de vue analytique et sensoriel. Dans cette partie, seuls les gels végétaux et mixtes ont été étudiés. Dans un premier temps, nous avons identifié et quantifié les perceptions d'arômes et de saveurs des produits fermentés et non-fermentés (perception au nez et en bouche). Dans un second temps, nous avons tenté de comprendre et mettre en lien les composés identifiés d'un point de vue analytique (GC-MS et LC-MS) et les caractéristiques sensorielles (GC-O-MS et profil sensoriel).

La **figure 12** résume l'ensemble de ces étapes. Les étapes 2, 3, 4, 5 constituent les 4 parties du chapitre résultats de ce manuscrit. Certaines de ces parties sont des articles ou des projets d'articles, d'autres sont seulement des compléments de résultats.

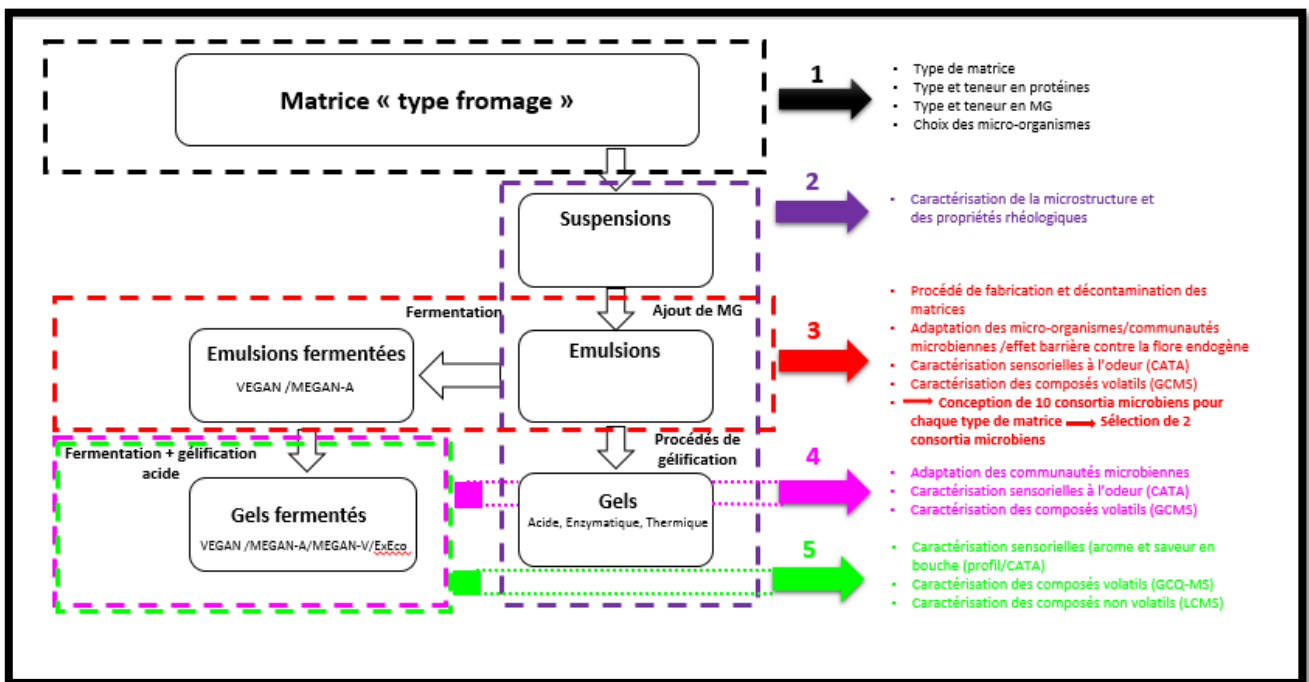


Figure 12. Schéma présentant la démarche du projet de thèse en 5 phases

- MEGAN-A** : consortium microbien sélectionné pour la matrice mixte dont les souches sont d'origine animale
- MEGAN-V** : consortium microbien sélectionné pour la matrice mixte dont les souches sont d'origine végétale
- VEGAN** : consortium microbien sélectionné pour la matrice végétale
- ExEco** : consortium microbien référence (module du fromage munster)

Chapitre II. Résultats

Ce chapitre présente les résultats issus de ces travaux de thèse sous forme de quatre articles scientifiques rédigés en anglais. Un résumé en français de l'article est proposé au début de chaque partie.

II.1. Propriétés rhéologiques et de microstructure des gels/émulsions de pois, mixte et lait formés avec différents types de coagulations : thermique, enzymatique et chimique

II.1.1. Résumé

La gélification est l'une des propriétés fonctionnelles la plus intéressante des protéines de pois. La synthèse bibliographique a permis de mettre en évidence qu'un petit nombre de travaux scientifiques s'est intéressé à l'étude de la gélification des protéines de pois seules et en particulier en mélange avec d'autres types de protéines comme les protéines de lait et à leur teneur en protéines.

Dans ce contexte, l'objectif de cette première partie des travaux de thèse était de comparer et décrire les propriétés rhéologiques et de microstructure des gels obtenus par coagulation enzymatique (0,3% transglutaminase + 0,5% chymosine), chimique (2% Glucono-delta-lactone) et thermique (90°C/1h). Trois types de gels, ayant la même teneur en protéines totales (14,8%), ont été étudiés : un gel végétal (100% de protéines de pois), un gel mixte (50% protéines de pois/ 50% protéines de lait) et un gel laitier (100% protéines de lait). La cinétique de gélification des différents types de coagulation a été suivie ainsi que les propriétés des gels, avec et sans matière grasse, ont été étudiées. La microstructure des suspensions, émulsions et gels protéiques a été également caractérisée par microscopie confocale. Ces travaux constituent une première étape dans la compréhension des mécanismes de gélification des matrices enrichies en protéines de pois en se focalisant sur le rôle de chaque type de protéines dans la formation de gel et l'impact de l'ajout de la matière grasse dans ce type de matrices. Pour cela, nous avons ajouté deux types de matrices, végétale et lait, ayant la même concentration de protéines que dans la matrice mixte, soit 7,4%.

L'étude des propriétés rhéologiques et de microstructure des gels protéiques a permis de mettre en évidence des différences considérables qui dépendent principalement du type de protéines, la présence ou non de la matière grasse et du mécanisme de gélification utilisé. La coagulation thermique permet d'avoir des gels 100% pois et mixtes (50% pois/50% lait) avec des propriétés rhéologiques et de microstructure comparable, suggérant l'existence d'interactions (liaisons covalentes) entre les protéines de pois et celles de lactosérum. Tous les gels enzymatiques obtenus, se caractérisent par une contrainte à la rupture importante, une propriété qui était associée à la présence d'agrégats grossiers. Parmi les gels acides, les gels de pois étaient beaucoup plus rigides

que le gel laitier ou les gels mixtes, probablement parce que leur pH final était plus bas. Ces travaux ont également montré que la présence de matière grasse renforce les propriétés mécaniques des différents types de gel étudiés.

En conclusion, des structures de gels offrant un large spectre de textures (crème dessert à pâte "ferme") ont été obtenus par les trois types de gélification étudiés. Les protéines de pois sont de bons candidats pour créer des produits avec des propriétés rhéologiques désirables. Ainsi, le mélange protéines de pois et protéines de lait peut être une voie pour intégrer ce type de protéines dans les aliments innovants.

II.1.2. Publication

Publication n°1 parue dans Food Hydrocolloids, 2017

The rheological and microstructural properties of pea, milk, mixed pea/milk gels and gelled emulsions designed by thermal, acid, and enzyme treatments

S. Ben-Harb, M. Panouillé, D. Huc-Mathis, G. Moulin, A. Saint-Eve, F. Irlinger, P. Bonnarme, C. Michon, I. Souchon

^a UMR GMPA, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, 78850, Thiverval-Grignon, France

^b UMR Ingénierie Procédés Aliments, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, 91300, Massy, France

Abstract

The rheological and microstructural properties of pure pea, pure milk, and mixed pea/milk gels were investigated and compared. Three gelation techniques were used: a thermal treatment, an acid treatment employing glucono delta-lactone, and an enzyme treatment employing chymosin and transglutaminase. Considerable differences in the gels' rheological and microstructural properties were observed. The thermally induced pure pea and mixed gels had comparable rheological and microstructural properties, suggesting the existence of interactions between pea and whey proteins. The enzyme-induced gels had a higher strain at rupture, a property that was associated with the presence of coarse aggregates. Within this gel type, mixed gels displayed a lower storage modulus than did pure pea or pure milk gels. Among acid-induced gels, pure pea gels were much stiffer than pure milk or mixed gels, probably because their final pH was lower. The addition of fat strengthens the mechanical properties of all pea gels studied, in particular in the mixed gels obtained by acid and enzyme gelation. The microstructural differences were consistent with the rheological differences. These results provide insight into the formation of gels via these gelation techniques and could inform the formulation of new food products that are enriched in plant protein.

Keywords: gels, plant protein, dairy products, rheology, confocal microscopy

Highlights

- Gels were obtained from pea and milk proteins using thermal, acid, and enzyme treatments
- The rheological and microstructural properties of gels were treatment dependent
- Interactions occurred between pea and whey proteins during the thermal treatment
- Enzyme-induced gels had a higher strain at rupture
- The acid-induced pure pea gel was the stiffest

1. Introduction

The demand for animal proteins, such as those contained in meat, dairy, and fish products, is ever increasing and out of balance with supply. Diets heavy in animal proteins have severe environmental impacts and cannot be produced sustainably. Unfortunately, parts of the world with increased demographic growth are also showing a dietary shift towards animal proteins. Whether because of the environmental consequences, soaring food prices, or more likely a combination of the two, consumers in Western countries are being encouraged to eat less animal protein and more plant protein; indeed, this outcome may actually be inevitable (Aiking, 2011; Pimentel and Pimentel, 2003). From a nutritional perspective, pulse legumes have high protein content, ranging from 18 to 32% (dry weight basis). In addition to acting as a source of essential amino acids and bioactive peptides, pulse legume proteins can serve important functions because they have water-holding, fat-binding, foaming, and gelation properties—they could be used to help develop a wide variety of foods (Boye *et al.*, 2010). Designing food products that contain protein mixtures is a way in which to introduce plant proteins into existing foods and meet the increasing demand for versatile protein sources. The pea (*Pisum sativum* L.) produces storage proteins that have great potential in the food industry, including in the formulation of new food products. Pea proteins are readily accessible and represent a sustainable alternative to animal proteins because they have a high nutritional value and are non-allergenic (Sabate and Soret, 2014). The most common pea proteins are globulins (~70%), which are usually classified, according to the sedimentation coefficient (S), into two fractions: 7S and 11S. The primary components of these fractions are legumin (11S protein), vicilin, and convicilin (7S protein). These proteins differ significantly in amino acid composition, structure (Gueguen *et al.*, 1988), and consequently have different functional properties (Boye *et al.*, 2010; O’Kane *et al.*, 2004).

Protein’s gelling properties are based on the ability to form three-dimensional networks. Different mechanisms underlie gelation induced by thermal, acid, or enzyme treatments, particularly in the case of pea and milk proteins (Table 14). First, thermal treatment can lead to the unfolding of globulin’s native compact structure, resulting in the exposure of otherwise buried hydrophobic residues and the subsequent aggregation of denatured proteins. Pea protein type and composition as well as specific treatment conditions affect gel properties. It has been frequently observed that commercial pea protein isolates (PPIc) exhibit poor gelling properties because the proteins are extensively denatured during the extraction performed as part of large-scale production. The optimal conditions for forming strong heat-set gels from PPIc are a protein concentration of 19.6% (w/w), a pH of 7.1, the use of a 2% NaCl solution, and a heating temperature of 93°C (Shand *et al.*, 2007). Thermally induced pea gels can also be produced by exposing concentrated pea suspensions (14.5%) to high salt concentrations (0.3M) (Sun and Arntfield, 2012, 2011a, 2010).

Little information, however, is available on the cogelation of pea and milk proteins. One study has investigated how to enhance gel properties when salt-soluble pea proteins are cogelled with whey proteins under different thermal conditions (Wong *et al.*, 2013). The researchers showed that the thermal cogelation (92°C for 30 min and a 4°C cooling step) of pea and whey proteins mixed in a 2:8 ratio in an NaCl solution synergistically enhanced the storage modulus, gel hardness, paste viscosity, and the minimum gelation concentration. The best results were obtained with a pH of 6, a total protein concentration of 10%, and an NaCl concentration of 0.5%. Another study explored the influence of a thermal treatment (85°C for 60min) on the formation of protein aggregates (2% wt) from β -lactoglobulin-pea globulin (β lg-Glob) mixtures when pH was 7.2 and a 5 mM NaCl solution was used (Chihi *et al.*, 2016). It was found that the production of β lg-Glob thermal aggregates involved the formation of new disulfide bonds and non-covalent interactions between the denatured protein subunits.

Cold gelation techniques can also be used to produce pea gels. They rely on decreasing interprotein repulsion. The most common strategies employ progressive acidification using agents such as glucono delta-lactone (GDL), which slowly hydrolyzes in solution to form gluconic acid, releasing protons in the process. Initially, this method was employed with milk proteins (Lucey *et al.*, 1998) and whey proteins (Bryant and McClements, 2000; Remondetto and Subirade, 2003) after denaturation due to heat treatment; however, more recently, it has also been used with pea proteins (Mession *et al.*, 2015). Lactic fermentation, during which lactose is converted to lactic acid, is another acid-based technique. It has been exploited, for example, to coagulate casein micelles in milk and produce acid-curd cheese. However, little is known about how pea proteins respond to fermentation. Youssef *et al.*, (2016) screened 10 starter cultures of 7 species of lactic acid bacteria for fermentation activity using 5 different ratios of milk to pea proteins heat treated (i.e., range of 0 to 40 g of pea protein for 100 g of total protein). They showed that an increase in pea protein concentration resulted in products with higher acidity, greater syneresis, and lower firmness than the reference (i.e., yogurt).

A third gelation approach employs enzymes and involves diverse mechanisms. Rennet, whose key protease is chymosin, is commonly used in the production of dairy products such as cheese. More specifically, rennet hydrolyzes the Phe¹⁰⁵–Met¹⁰⁶ bond in κ -casein, a compound found at the periphery of casein micelles. It thus eliminates electrostatic repulsion and creates a hydrophobic patch on the surface of the micelles that allows aggregation and gelation. Enzymes can also be used to create gels by forming covalent bonds between protein chains. Transglutaminase (TGase) is a protein-glutamine gamma-glutamyltransferase that can modify proteins by catalyzing the acyl transfer between a λ -carboxamide of a protein-bound glutamine and lysine, forming an ϵ -(λ -

glutamyl)-lysine crosslink (Gaspar and de Góes-Favoni, 2015). Different proteins can be covalently linked by this TGase, producing aggregates with desirable functional properties. Its use can overcome the problem of syneresis in dairy products, because the enzyme improves water-holding capacity. Other studies have shown that pea proteins are good substrates and that this TGase can yield gels with improved functional properties (Djoullah *et al.*, 2016; Djoullah *et al.*, 2015; Pelgrom *et al.*, 2015)

Table14. Different gelation and aggregation techniques used on pure pea and pea/milk mixtures

	Composition (Protein concentration)	Gelation and aggregation conditions	Gel properties	References
Thermal treatments	Pure Pea			
	10 – 15%	95°C/30min; pH 3-4.2; 0.02M NaCl	Storage modulus 500–4000Pa Fracture stress≈5000–20000 Pa Fracture strain≈0.4–0.5 Young’s modulus≈5000–65000 Pa	Munialo <i>et al.</i> , 2015
	30%	90°C/30 min; natural Ph	Gel strength≈50 N	Pelgrom <i>et al.</i> , 2015
	14.5%	25°C to 95° C; pH 5.65; 0.3M NaCl	Storage modulus≈349.5–4500 Pa Loss modulus’≈253.5–700 Pa Tgδ≈0.73–1.75	Sun and Arntfield, 2012, 2011a, 2010; Wang and Arntfield, 2015
	19.6%	heated at 93°C; pH 7.1; 1–2% NaCl	Shear stress≈10290–12450Pa Shear strain≈0.57–0.62	Shand <i>et al.</i> , 2007
	Pea/Milk Mixture			
	2% in total; ratios: 30/70, 50/50, and 70/30	85°C/30min; pH 7.2; 5 mM NaCl	Hydrodynamic diameter D _h ≈69.3–151.9nm	Chihi <i>et al.</i> , 2016
	10, 16, and 22% in total; ratios: 8:2, 5:5, and 2:8)	92°C/30min; pH 4, 6, and 8; (0.5–3 % NaCl)	G’≈5680–9690Pa TPA hardness≈373–316g	Wong <i>et al.</i> , 2013
Acid treatments	Pure Pea			
	1, 2, 4%	Heat-treated pea-protein(85°C/30min) GDL 0.19; 0.21; 0.22%	Storage modulus of gels at 4%≈1000Pa Loss modulus of gels at 4%≈100Pa Tgδ of gels at 4%≈0.2	Mession <i>et al.</i> , 2015
Pea/Milk Mixture				

Chapitre II – Résultats

	4.5%;ratios:10/90, 20/80, 30/70, 40/60	Heat-treated pea-protein(121°C/15min) Heat-treated milk protein (90°C/10min) Fermentation with LAB bacteria, incubated at 37°C for 24 h, and then stored 14 days at 4°C at a pH of 6.5	Firmness of samples 4%≈0.10–0.15 N	Yousseef <i>et al.</i> , 2016
Enzyme treatments	Pure Pea			
	14.5%	Native pea-protein pH 5.65-5.66; 0.3M NaCl; 40°C/30mn	Storage modulus ≈2000 Pa Loss modulus≈1000Pa	(Sun and Arntfield, 2011c)
	(pea albumin fraction) (0.01–0.1%)	Native pea-protein pH 7; 250 units/g MTGase; 40°C/1 to 5h	Mean particle diameter≈39.1–138.1 nm	Djoullah <i>et al.</i> , 2016
	1–10%	Native pea-protein pH 7; 20mM NaCl, 10 units/g MTGase; 40°C/5h	Minimum gel concentration=6% Degree of crosslinking=25%	Djoullah <i>et al.</i> , 2015
	19.6%	Native pea-protein 1% NaCl; pH 6.5; 0–0.7% MTGase; 22–78°C/10–80 min	Storage modulus ≈130 Pa Loss modulus≈20Pa	Shand <i>et al.</i> , 2008
	30%	Native pea-protein Enzyme to protein ratio of 1:17,3; 50°C/35 min	Gel strength=20 N	Pelgrom <i>et al.</i> , 2015

Although the behaviors of pea and milkproteins have largely been examined separately, a few studies have focused on the properties of mixtures. In particular, little is known about how pea and milk proteins behave and interact during thermal, acid, and enzyme treatments. Therefore, it would be helpful to have a better understanding of the interactions between pea and milk proteins and the assembly dynamics of the gels they form. The main objective of this study was to describe and compare the rheological and microstructural properties of gels created by thermal, acid, and enzyme treatments. Three types of protein gels were studied: pure pea gels, pure milk gels, and mixed gels, which contained a 1:1 ratio of pea proteins to milk proteins; the effect of the fat was also studied for pea and mixed gels. Gelation kinetics and gel rheological properties were studied, and the microstructures of pure pea gels and mixed gels created from suspensions and emulsions were characterized using confocal laser scanning microscopy (CLSM).

2. Materials and methods

2.1 Materials

Pea protein isolates (PPI) (NUTRALYS® S85F) were obtained from Roquette (Lestrem, France). Skim milk powder (SMP) was purchased from Lactalis (Bourgbarré, France), and rapeseed oil (Fleur de Colza, Lessieur, France) was purchased from a local supermarket. Glucono delta-lactone (GDL; Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) was used in the acid treatment. Transglutaminase Activa® WM (activity rate of 200 units.g-1; Ajinomoto Inc., Tokyo, Japan), chymosin (CHY-MAX®200, CHR HANSEN), and calcium sulfate dihydrate (CaSO₄; Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) were used in the enzyme treatment.

2.2 Methods

2.2.1 Preliminary tests

Preliminary tests were performed to choose the experimental conditions (protein concentration and gelation conditions). The objective was to create gels with high protein content, to get as close as possible to cheese-type gel.

Regarding protein concentration, 14.8% was the highest pea protein concentration we were able to suspend in a visually acceptable way. We decided to use the same protein concentration for mixed and milk gels.

Regarding gelation conditions, different tests were performed to select conditions leading to gel formation for the pea, mixed and milk suspensions:

- Enzyme gelation: an experimental design was elaborated to test chymosin (0.1; 0.5; 1 and 2%), transglutaminase (0.05; 0.1 and 0.3%) and CaSO₄ (0.3; and 1%), alone or in combination. The combined use of chymosin, transglutaminase and CaSO₄ was necessary to obtain gels from the three protein compositions: pea mixed and milk suspensions.
- Acid gelation: GDL (1 and 2%)
- Thermal gelation: (80°C for 1h, and cooled to 20°C 90°C for 1 h, and cooled to 20°C)''

For all gelation modes, we selected the best conditions leading visually to gels, but no further optimization was done.

2.2.2 Preparation of suspensions

Three types of suspensions with protein concentrations of 14.8% were prepared under the same conditions. The term suspension is used because the proteins are only partially soluble. The pure pea suspension contained 100% pea proteins, the pure milk suspension contained 100% milk

proteins, and the mixed suspension contained a 1:1 ratio of pea to milk proteins. To make all three suspensions, proteins were added to a 1% NaCl solution and stirred at room temperature for 1 h. To generate the mixed suspension, the pea and milk proteins were mixed together and then stirred for 1 h. Emulsions were then created from the pure pea suspension and mixed suspension by adding fat at the end of the solution preparation process; the emulsions were homogenized using a rotor-stator homogenizer run at 15,000 rpm for 5 min (IKA®T25 Digital Ultra-Turax). To further explore protein behavior within gels, low-concentration (LC) pea and milk suspensions (7.4% protein content) were also prepared under the same conditions. The composition of the different suspensions prior to gelation is summarized in **Table 15**.

Table 15. Composition of pea, milk, and mixed suspensions (g protein/100 g)

	Milk protein concentration (%)	Pea protein concentration (%)	Fat concentration (%)
Pea suspension	-	14.8	-
Pea emulsion	-	14,8	10
Milk suspension	14.8	-	-
Mixed suspension	7.4	7.4	-
Mixed emulsion	7.4	7.4	10
LC pea suspension	-	7.4	-
LC milk suspension	7.4	-	-

2.2.3 Solubility

The percentage of soluble protein present in the pea, milk, and mixed suspensions was determined; measurements were performed at natural pH levels (7.17 ± 0.02 , 6.33 ± 0.01 , and 6.55 ± 0.01 , respectively). The suspensions were stirred at room temperature for 1 h and then centrifuged at 15,000 rpm at 20°C for 30 min (Beckman Coulter). The amounts of protein in the supernatant and the pellet were measured using the Kjeldahl method. This allowed protein content to be determined using a protein-specific conversion factor (N). The conversion factors for pea proteins and milk proteins are 5.60 (Boye et al., 2010) and 6.38 (Maubois and Lorient, 2016), respectively. For the mixed suspension, we used a factor of 5.99.

Protein solubility was then calculated with the following equation:

$$\text{Solubility (\%)} = (\text{protein content in supernatant} / \text{total protein content}) \times 100$$

2.2.4 Gelation techniques

Gels were created from the pea, milk, and mixed suspensions and the pea and mixed emulsions using thermal, acid, and enzyme treatments. The following treatment-specific conditions were employed:

1. Thermal treatment—the suspensions or emulsions were placed directly in the rheometer cup, heated at 90°C for 1 h, and cooled to 20°C
2. Acid treatment—the suspensions or emulsions were mixed with GDL (2% w/v) and incubated at 30°C for 20 h
3. Enzyme treatment—the suspensions or emulsions were mixed with CaSO₄ (0.3%), chymosin (0.5%), and TGase (0.3%) and incubated at 30°C for 20 h

2.2.5 Evaluation of gel properties

2.2.5.1 Rheological properties

A rheometer (MCR301, Anton Paar, Graz, Austria) equipped with sanded coaxial cylinders (diameter of 27 mm) was used to test the gels' rheological properties. The suspensions and the emulsions were carefully poured into the cup, which was kept at 20°C, and then covered with a thin layer of paraffin oil to prevent water evaporation. Different tests were subsequently carried out on the samples:

- a. Strain sweeps (at a constant frequency of 1 Hz) and frequency sweeps (at a constant strain of 1%) were performed on suspensions and emulsions at 20°C.
- b. Samples were coagulated in the rheometer using each treatment type in the linear viscoelastic domain (1 Hz, 1%).
- c. Strain sweeps (0.001–100%, 1 Hz) and frequency sweeps (10–0.01 Hz, 1%) were performed on the gels after they had cooled to 20°C.

2.2.5.2 Confocal laser scanning microscopy

CLSM is a highly useful microscopy technique for studying the microstructure of a wide variety of food products and, in particular, dairy products. The microstructure of the pea and mixed suspensions, emulsions, and gels was examined using a CLS microscope (TCS SP2 AOBS; Leica, Solm, Germany) equipped with two He-Ne lasers with excitation wavelengths of 543 nm and 633 nm, and one argon laser with excitation wavelengths of 488 nm. First, the samples were labeled. A small piece of the sample was placed on a cavity slide, and two dyes were allowed to diffuse in for at least 1 h (in accordance with the procedure described in [Huc et al., 2014](#)). The fats were labeled with BODIPY 665/676 (Invitrogen, Carlsbad, NM, USA), and the proteins were labeled with DyLight 488 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). All of the fluorescent images were thus obtained at the same

time. The overlay images made it possible to visualize the colocation of fats and proteins. The fats dyed with BODIPY appeared in red, whereas the proteins dyed with DyLight 488 appeared in green. Several images were obtained at two magnifications (20 and 40); those included in this paper are representative of the rest.

3. Results and discussion

3.1 Properties of non-gelled suspensions

3.1.1 Solubility

Protein solubility values for the pea, milk, and mixed suspensions were 26%, 90%, and 48%, respectively. Even though the solubility of the pea suspension was measured at a pH (7.17 ± 0.02) far above the proteins' isoelectric point, solubility was found to be low. Indeed, the isoelectric point, and thus minimum solubility, for pea proteins occurs at a pH of 4.5 (Boye *et al.*, 2010). Solubility gradually increases above and below this pH and reaches its maxima under highly alkaline (pH 8) and highly acidic (pH 2) conditions (Djoullah *et al.*, 2016; Ladjal-Ettoumi *et al.*, 2016; Mession *et al.*, 2012). The lower solubility observed could be explained by the extraction procedure used. More specifically, solubility is a function of protein quality and is therefore enhanced when a low-denaturation extraction procedure is used (Mession *et al.*, 2012; Shand *et al.*, 2007). Therefore, our results concur with findings obtained by Shand (2007), who reported that, at a pH of 7, native pea protein attained 80% solubility while the value for commercial pea protein was just 20%. The value we observed also matches the value reported by Pelgrom *et al.*, (2015). Milk proteins are known to be soluble, which explains the high solubility value seen in this study (90%). However, the solubility for the mixed suspension was only 49%. This value is actually lower than the mean of the pea and milk solubility values, suggesting a negative synergistic effect.

3.1.2 Rheological properties

Before gelation, the samples had different rheological patterns, ranging from liquid (loss modulus [G''] > storage modulus [G'] for all frequencies) to weak gel behaviour ($G' > G''$ for all frequencies and an almost constant G') (Fig. 13). The pea emulsion behaved like a weak gel even before treatment (Fig. 13a), which might have been the result of jamming due to the high concentration of insoluble protein aggregates and fat globules. The pea suspension (Fig. 13a) as well as the mixed suspension and emulsion (Fig. 13b) appeared to form viscous liquids.

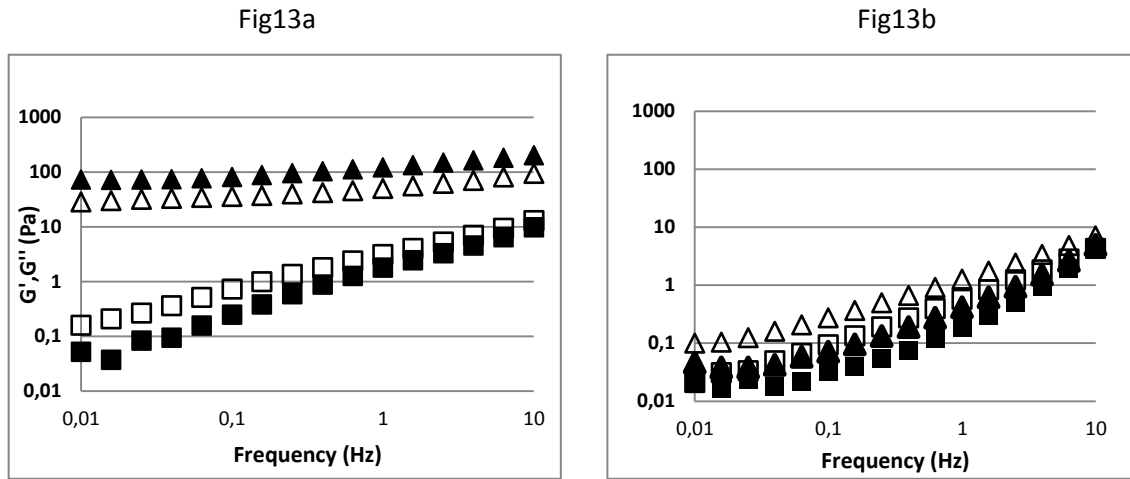


Figure 13. Storage modulus (G') and loss modulus (G'') across different frequencies for non-gelled samples of the a) pea suspension and emulsion as well as the b) mixed suspension and emulsion. G' : closed symbols; G'' : open symbols; suspensions: squares; emulsions

3.1.3 Suspension microstructure

In the representative CLSM images of the non-gelled suspensions (**Fig. 14**), it can be seen that the pea and milk proteins (in green) are dispersed throughout the water phase. The green spots likely correspond to clusters of undissolved proteins of different sizes (up to 50 μm). These aggregates seem to be the consequence of the limited solubility of pea proteins. In the emulsions (**Fig. 14**), the fat globules are also well distributed throughout the matrix. Some evidence of globule aggregation can be seen in the pea emulsion, and the droplets are slightly larger than those in the mixed emulsion. No yellow areas can be seen in the emulsions, which mean there was no fat-protein colocalization or that it was not very apparent.

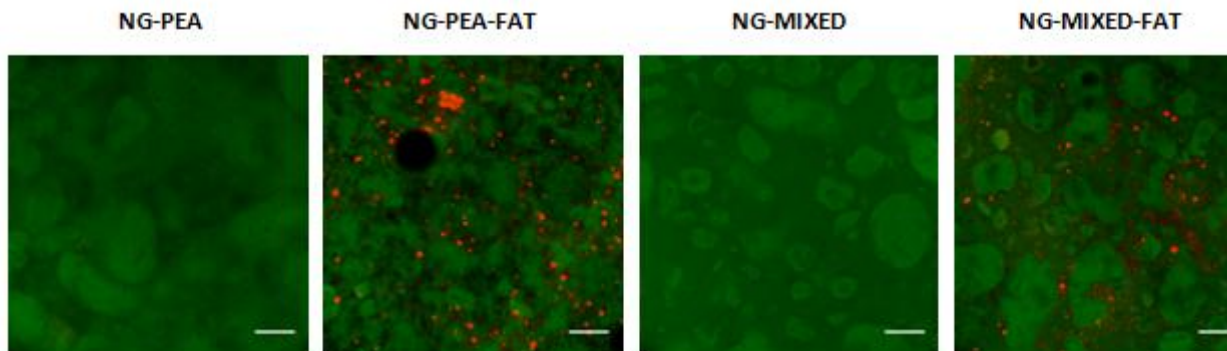


Figure 14. Microstructure of non-gelled suspensions. Fats are labeled in red, and proteins are labeled in green; scale bar = 50 μm

3.2 Gelation kinetics and gel microstructure

3.2.1 Gelation kinetics and gel rheological properties

The behavior of pea and milk proteins was observed during gelation induced by thermal, acid, and enzyme treatments. Gels created from five suspension types were examined: the regular pea, milk, and mixed suspensions (containing 14.8% protein) and the LC pea and milk suspensions (containing 7.4% protein, which was equal to the percentage of each protein type in the mixed suspension). For all the suspensions, small-amplitude oscillation tests were used to evaluate gelation kinetics and gel rheological properties. The gelation kinetics observed (**Fig. 15**) were typical of those resulting from biopolymer gelation ([Clark et al., 2001](#)) and were similar for all the gels: G' increased rapidly at first and then increased more slowly before plateauing. High G' plateau values are indicative of a stronger intermolecular network and increased interactions among proteins. Strain sweeps were also performed on the gels to study their behavior at high levels of strain (**Fig. 16**). Interestingly, gels were obtained from all five suspension types using all three treatments, except in the case of the thermally treated LC milk suspension. However, the gels' viscoelastic properties varied depending on suspension and treatment type.

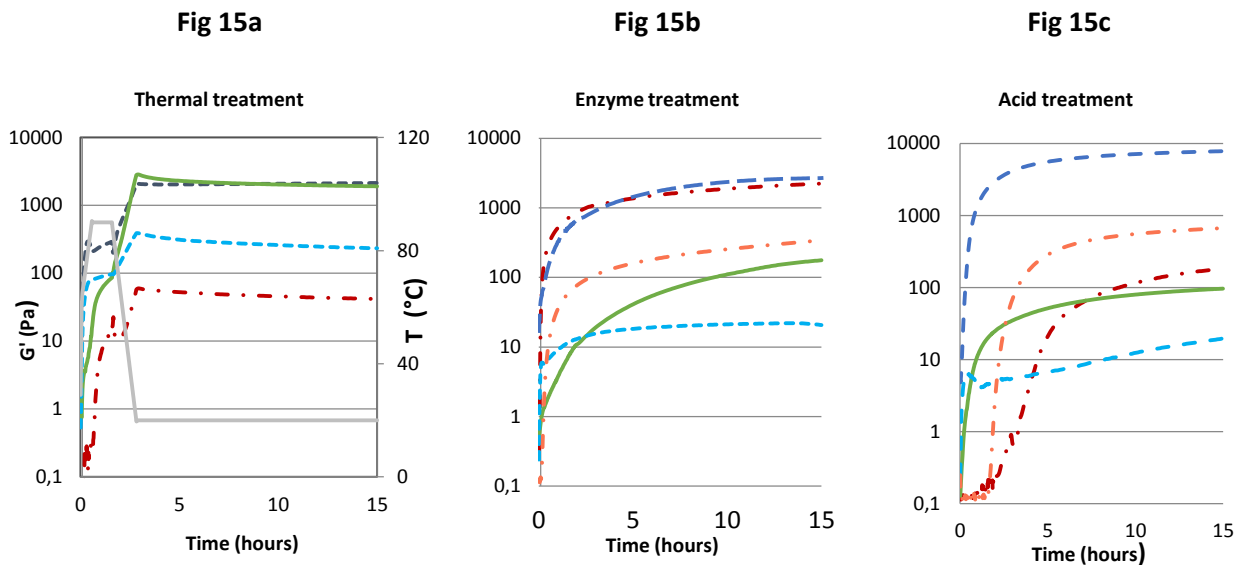


Figure 15. Storage modulus (G') as a function of time for the regular pea, milk, and mixed suspensions and the LC pea and milk suspensions subject to a) thermal, b) enzyme, and c) acid treatments. The dark colors represent the regular suspensions (14.8% protein); the clear colors represent the LC suspensions (7.4% protein). Pea, milk, and mixed suspensions are depicted using dashed, dash-dot, and solid lines, respectively. Pea, milk and mixed gels are depicted using blue, red and green respectively. The temperature is depicted in grey

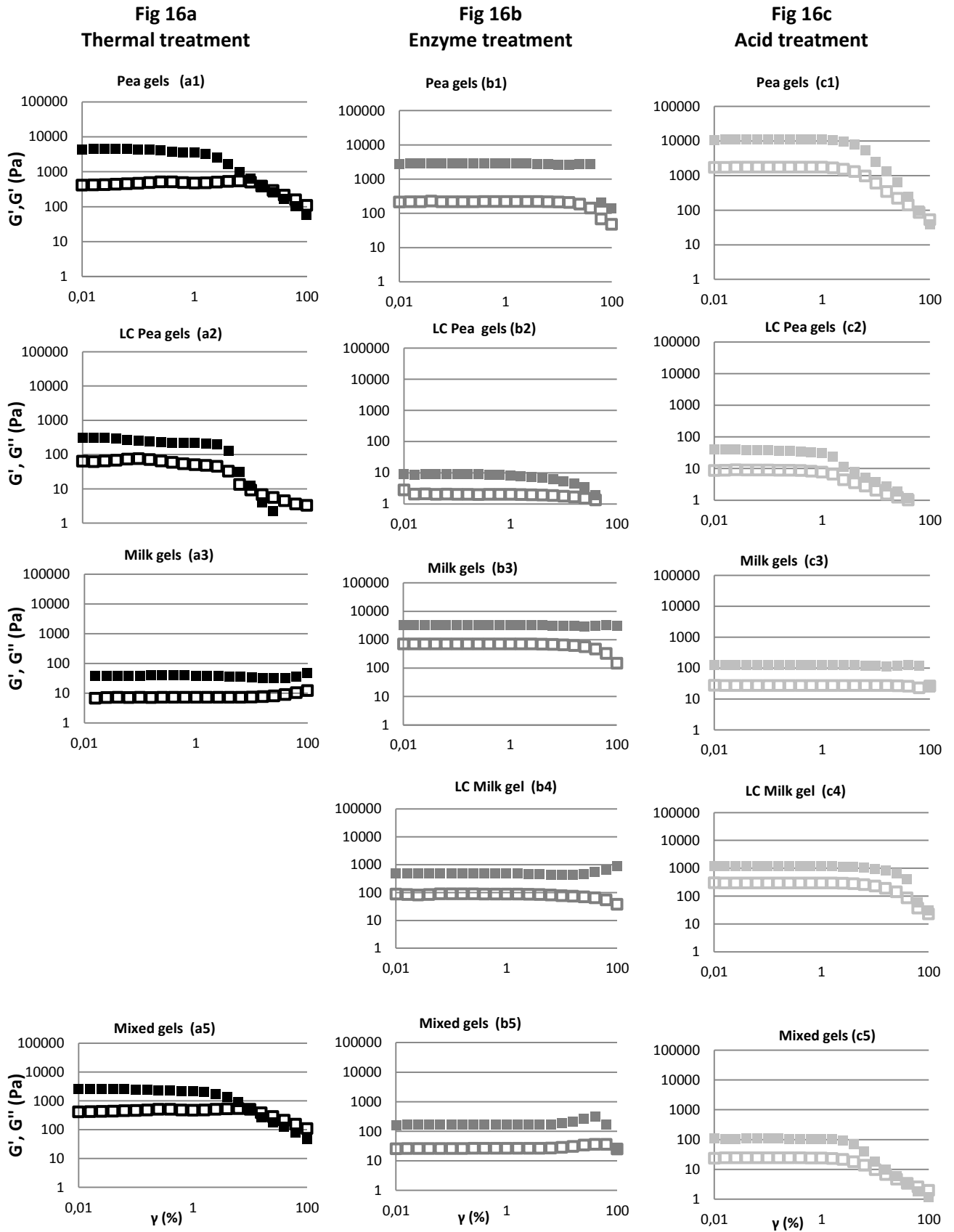


Figure 16. Storage modulus (G') and loss modulus (G'') as function of strain at rupture γ (%) for regular pea, milk, and mixed gels and low-concentration (LC) pea and milk gels created using a) thermal, b) acid, and c) enzyme treatments. G' : closed symbols; G'' : open symbols

Thermally induced gelation

There were differences in the kinetics and mechanical properties of different suspensions and the gels they formed (**Fig. 15a, Fig. 16a**) as a result of the thermal treatment. For example, the storage modulus (G') and loss modulus (G'') increased when pea protein concentration was higher, presumably due to the increase in crosslinking among protein molecules. Higher pea protein concentrations also resulted in stiffer gels. Similar results were reported by [Sun and Arntfield \(2010\)](#) (4–18% PPI content, 0.3 M NaCl, pH 5.7, 95°C–25°C). Few differences in rheological properties (G' , $\gamma_{rupture}$) were observed between pea and mixed gels (**Fig.16**). The high-concentrated milk gel was weaker than the regular pea or mixed gels (**Fig.15a**), and the low-concentration milk suspension was unable to gel. Although casein is known to be insensitive to thermal treatments, whey proteins are globular proteins that can denature, aggregate, and form gels. Here, the whey protein content of the high and low-concentration suspensions was 3% and 1.5%, respectively. Since these concentrations were relatively low in general, it could explain why a weaker gel was obtained from the regular milk suspension and why the low-concentration milk suspension did not gel at all. However, it should be noted that the high-concentrated milk gel was more resistant to strain than were the pea and mixed gels. While it can be assumed the pea proteins were largely responsible for creating protein networks in the mixed gel, they probably also interacted with milk proteins and especially whey proteins. In gel networks, the bonds between denatured protein molecules vary in nature. Presumably, disulfide bridges and hydrophobic interactions often play major roles ([Chihi et al., 2016](#)), and hydrogen bonds may also be present. Covalent interactions have been shown to occur between soy and whey proteins during heating ([Roesch and Corredig, 2005](#)). In this study, the mixed gel—which had an equal ratio of pea to milk proteins—had greater elasticity. This finding fits with previous results showing that mixing whey protein with certain plant proteins, like soy protein, in specific ratios can produce significantly stronger gels following thermal treatments ([Roesch and Corredig, 2005](#)). Recently, [Wong et al., \(2013\)](#) found that a 2:8 ratio of pea to whey protein could result in thermally induced gels whose stiffness was significantly synergistically enhanced compared to that of pure pea or whey protein gels with the same total protein concentrations (10%, 16%, and 22%; at a pH of 6 and 8). After cooling, a more structured network is also usually observed ([Munialo et al., 2015; Sun and Arntfield, 2011a](#)).

In summary, our results indicate that the mixed suspension, which had an equal ratio of pea to milk proteins, resulted in firmer gels than the milk gel, which had the same total protein content (14.8%); the mixed gel was as firm as the pea gel. Also, the mixed gel and the pea gel responded similarly to strain.

Enzyme-induced gelation

When gels were formed using enzymes, protein content mattered. The storage modulus (G') of the high-concentrated pea gel was similar to that of the regular milk gel; however, the same pattern was not observed in the low-concentration gels (**Fig.15b**). In the enzyme treatment, chymosin and TGase mediated gelation, and their respective roles probably varied depending on protein type. It is likely that chymosin mostly acted on the milk casein micelles and that TGase affected pea proteins as well as caseins and perhaps even whey proteins. Casein represents 80% of the proteins found in milk and is a good substrate for TGase; in contrast, whey proteins are much less common (20%) and, in their native globular structure, are far less likely to participate in crosslinking reactions, mainly because the disulfide bonds underlying the stability of the globular conformation restrict access to crosslinking sites (Gaspar and de Góes-Favoni, 2015). Indeed, it is likely that chymosin and TGase both acted on milk proteins.

Consequently, it could be that the relationship between protein content and gel strength would be more positive in the context of TGase activity than that of chymosin activity (Gaspar and de Góes-Favoni, 2015). The storage modulus of the mixed gel was lower than that of the pea or milk gels. As observed by Djoullah et al. (2016), TGase more easily catalyzes the formation of G-L bonds between the same proteins than between different proteins. The presence of pea proteins might also have impaired chymosin-mediated casein gelation, as suggested by the lower storage modulus for the mixed gel compared to the milk gel.

The elasticity ($Tan\delta$) of enzyme-induced gels was greater ($Tg\delta_{pea}=0.07$; $Tg\delta_{mixed}=0.12$), likely as a result of the large water volume inside the gel network (Munialo et al., 2014). However, the differences between the pea and mixed gels were mainly related to TGase crosslinking. Enzyme-induced gels were more resistant to strain than were acid-induced or thermally induced gels. Also, the regular pea gel had similar properties to those of the regular milk gel, although the former was more susceptible to strain. Therefore, when using enzyme-based gelation, mixing pea proteins with milk proteins can decrease the gel storage modulus while maintaining gel deformability.

Acid-induced gelation

The pea and milk suspensions both formed gels following the acid treatment, although gelation occurred more rapidly for the pea and mixed suspensions than for the milk suspension (**Fig. 15c**). Surprisingly, the low-concentration milk suspension created a stronger gel than did the high-concentrated milk suspension. These differences may stem from differences in the final pH (**Table 16**). The final pH of the pea gels was lower (4.6 and 4.1 for the regular and low-concentration suspensions, respectively) than that of the milk gels (5.1 and 4.5, respectively), probably because milk has a greater buffering capacity. The differences in the final pH values could partly explain the

differences in the gels' rheological properties. The regular pea gel reached its isoelectric point of 4.6 and had a higher storage modulus than did the milk and mixed gels, whose final pH values were 5.05 and 4.78, respectively.

Table16. Final pH values of the different acid-induced gels

	pH before gelation	pH after gelation
<i>Pea gel</i>	7.17±0.02	4.60±0.02
<i>Milk gel</i>	6.33±0.01	5.05±0.01
<i>Mixed gel</i>	6.55±0.01	4.78±0.26
<i>LC pea gel</i>	7.13±0.04	4.07±0.07
<i>LC milk gel</i>	6.51±0.01	4.50±0.01

Similarly, the differences in strength between the regular and low-concentration milk gels could also be due to the final pH (Martin *et al.*, 2016). It has been suggested that competitive dynamics among proteins occur in casein-soy protein mixtures and that aggregate formation is therefore not the same as in pure suspensions (Roesch *et al.*, 2004). This interpretation would fit with our results and could explain the decreased firmness of the mixed gel compared to the pea and milk gels. As in the case of the thermal treatment, the acid treatment created a milk gel that was more resistant to strain than were the pea and mixed gels (Fig.16c). Also, gelation occurred more rapidly in the low-concentration pea suspension than in the low-concentration milk suspension, suggesting that pea proteins play a major role in network formation in mixed gels, at least in the first stages.

Taken together, these results show that, as compared to the thermal and enzyme treatments, the acid treatment resulted in a pea gel with a higher storage modulus (G'). However, the storage modulus was greatest for the mixed gel that came out of the thermal treatment, perhaps because of cogelation between pea and milk proteins. In general, gels produced by the enzyme treatment were more elastic ($Tg\delta_{Enzyme} (0.07) < Tg\delta_{Acid} (0.15) < Tg\delta_{Thermal} (0.23)$ for pea gels ; $Tg\delta_{Enzyme}(0.12) < Tg\delta_{Acid}(0.21) < Tg\delta_{Thermal} (0.23)$ for mixed gels) and strain resistant.

3.2.2 Effect of fat

The effect of adding fat was studied only for pea and mixed gels. The values of storage modulus of gels and gelled emulsion are extracted at the end of gelation, i.e. after the cooling step at 20°C (Fig17). After adding fat, the modulus storage (G') increased for all gels, but more particularly in the case of mixed gels. In these gels, the increase of G' can probably be explained by the presence of milk protein at droplets interface, due to their interface-stabilizing action. Fat droplets act in that

case as active fillers in the protein gel network. This phenomenon was more important in the case of acid and enzyme gelation than thermal gelation.

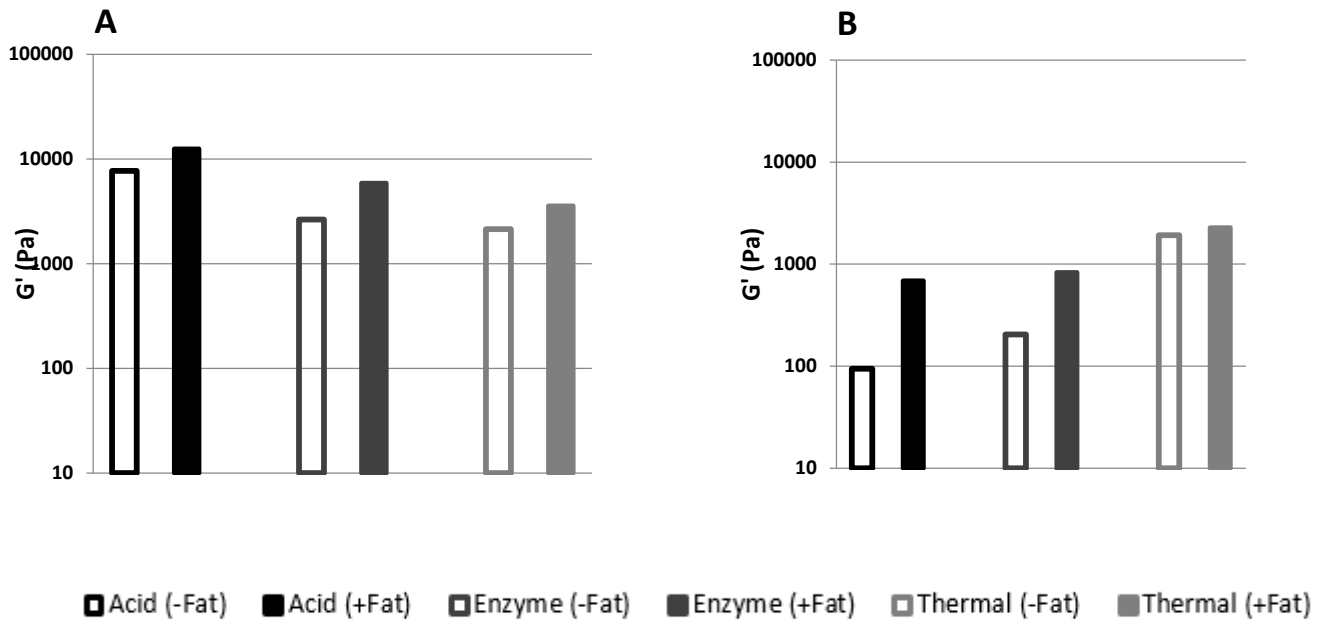


Figure 17. Storage modulus (G') of gels and gels emulsions as a function of the different gelation. A: regular pea gels, B: regular mixed gels.

3.2.3 Gel microstructure

CLSM was used to characterize the microstructures of pea and mixed gels. Gelation is the result of protein aggregation, a process during which polymer and solvent interactions reach an equilibrium and a network is formed. The conditions under which aggregates transform into networks determine gel microstructure. In this study, protein aggregates were still visible after gelation. Fat droplets were also still visible, but their levels varied (i.e., colors on the CLSM images ranged from red to orange). This finding suggests that gelation technique influences interactions between fats and proteins. As expected, microstructure varied considerably based on treatment, suspension type, and emulsion type. The differences could clearly be attributed to the differences in gel formation mechanisms.

The thermal treatment resulted in fewer protein aggregates and therefore a more homogenous protein network in the pea gel (**Fig.18A**). The mixed gel had more aggregates. In the mixed suspension, both types of proteins were denatured, losing their quaternary and tertiary structures. Simultaneously, the exposure of free thiol groups facilitated the formation of disulfide bridges between β -lactoglobulin monomers and/or disassociated legumin subunits ($L\alpha\beta$) (Messiou *et al.*, 2015). The new particles formed could interact and produce primarily soluble, high-molecular-

weight aggregates. In addition, [Roesch and Corredig \(2005\)](#) found that covalent bonds could be formed between soy protein subunits and both β -lactoglobulin and α -lactalbumin. Consequently, these bonds could explain why large aggregates occurred in the mixed suspension. In particular, the disulfide bridges formed by β -lactoglobulins the pea and milk proteins denatured were likely helping create the denser aggregates. In the pea gel, some of the fat droplets were spread out along the continuous protein network (i.e., the orange, cotton-like filaments), meaning the fat droplets and proteins were fully linked. However, there was also evidence of fat aggregation and coalescence (i.e., presence of red dots in the network), which was more pronounced in the non-gelled emulsions. In the mixed gel, less flocculation was observed and fat dispersion was also limited, probably because of the interface-stabilizing properties of milk proteins ([Dickinson, 1997](#)).

Acid-induced gelation functions by decreasing the pH to the isoelectric point. In this study, the acid treatment resulted in an increase in different-sized protein aggregates (**Fig.18B**). This aggregate diversity was associated with the greatest vulnerability to strain, an indication that these gels were brittle ([Munialo et al., 2014](#)). This result is in line with the findings of [Roesch et al.,\(2004\)](#), who showed that, in a soy protein-skim milk mixture subject to acid gelation, microstructure was changed. In addition, there is an increase in initial pH and gel strength when a small amount of skim milk is replaced with soy in the non-gelled mixture. Mixed gels (soy milk/milk) formed by acid treatments had large pores, high connectivity, and a very similar structure to that of pure soy milk gel ([Lin et al., 2012](#)). Not surprisingly, aggregates were coarser in the pea gel than in the mixed gel. This result makes sense, given the greater strength of the pea gel. Fat globules were generally well distributed across the matrices.

The enzyme treatment led to a microstructural pattern of protein aggregation similar to the one seen in the non-gelled samples (**Fig.18C**). In the CLSM images, there is a continuous layer of proteins forming aggregates of different sizes. Gels with coarse aggregates were less susceptible to strain, indicating a rubber-like nature ([Munialo et al., 2014](#)). In the gel formed from the pea emulsion, flocculation was observed, and it was associated the colocation of proteins and fats. Flocculation was less dramatic in the mixed gel, which had more homogeneously distributed fat globules (size and location). This patterns helps confirm the interface-stabilizing action of the milk proteins. The addition of fat strengthened the rheological properties of all the gels studied and those of the pea gel in particular (results not shown).

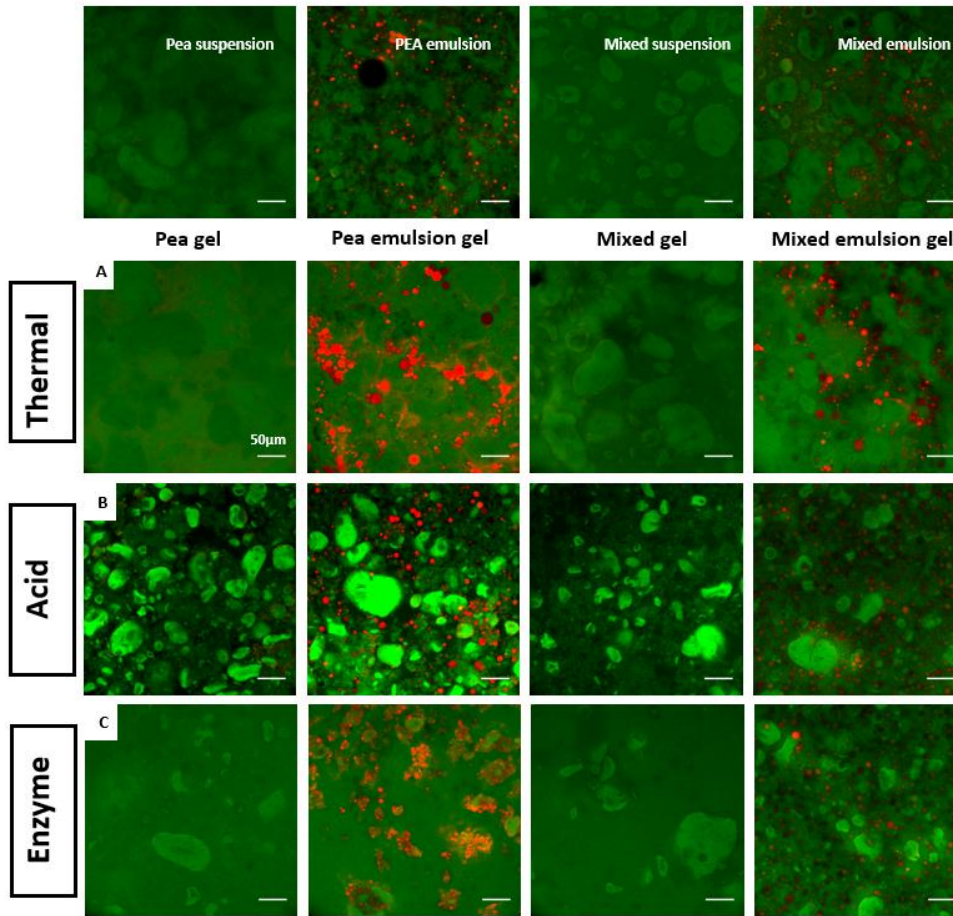


Figure 18. Microstructure of samples before gelation (top row) and after gelation induced by three treatment types (bottom three rows). Fats are labeled in red, and proteins are labeled in green; scale bar = 50 µm.

4. Conclusion

The properties and microstructures of pea and mixed gels varied depending on the gelation technique used. They were also greatly affected by protein type and the presence of fat. Thus, it appears clear that protein aggregation dynamics and the electrostatic interactions between protein aggregates have a major impact on the rheological properties of pea and mixed gels. For example, pea gels had a higher storage modulus (G'), especially those created via acid or enzyme gelation. In the thermal treatment, gel formation was less affected by protein type, suggesting that covalent bonds had formed between pea and milk proteins. The coarse aggregates in enzyme-induced gels were associated with a greater resistance to strain. The addition of fat strengthened the rheological properties of all the gels studied and of the pea gels in particular. Gelation technique influenced the distribution of fat droplets. The results of this study highlight ways in which pea proteins can be used in food products. Indeed, pea proteins can help create products with desirable rheological (i.e., textural) and microstructural properties. Furthermore, mixed gels made from pea and milk proteins could be included in new foods, leading to innovative textures.

5. Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the Carnot Qualiment Institute for its financial support. S. Ben-Harb thankfully acknowledges the Tunisian Ministry of Higher Education for the PhD fellowship that helped fund this research.

II.2. Choix des communautés microbiennes permettant d'avoir des propriétés sensorielles améliorées pour la fermentation des émulsions enrichies en protéines de pois

II.2.1. Résumé

Les résultats de la première partie ont permis de comprendre l'impact du type de coagulation (thermique, enzymatique et acide) et de la nature des protéines utilisées sur les propriétés rhéologiques et de microstructure des gels. En plus des connaissances liées aux mécanismes de gélification, des structures intéressantes (émulsion, et crèmes dessert à gels fermes) ont été obtenues, qui pourront donc être utilisées dans la suite de ce projet, notamment pour être fermentées.

Dans cette deuxième partie de l'étude, l'objectif était de sélectionner des communautés microbiennes pour différents types d'émulsion (végétale et mixte à 14,8% de protéines), présentant des propriétés sensorielles d'intérêt. Cette étape est nécessaire pour sélectionner les microorganismes qui seront utilisés pour fermenter les matrices gélifiées et dont les résultats seront présentés en partie 3 et 4 de ce document.

Cependant, il n'a pas été possible de tester des écosystèmes microbiens directement sur les émulsions développées dans la partie 1 de ce manuscrit. En effet, lors des premières expérimentations de fermentation, un contaminant assigné au genre *Bacillus* et appartenant au groupe *cereus-anthraxis-thuringiensis* a été isolé des suspensions enrichies en protéines de pois. Ce contaminant a la capacité de sporuler et est donc très résistant aux traitements thermiques. Nous avons modifié notre stratégie pour éviter ce problème de contamination. Une des contraintes liées à l'efficacité du traitement thermique à appliquer est liée à la viscosité (trop élevée) des émulsions. Il a donc été nécessaire de réduire la concentration en protéines et passer à 10%. Différents procédés ont été testés, dans le but de décontaminer les protéines de pois en ciblant les formes sporulées de *B.cereus*. La tyndallisation associée à un traitement d'ultrasons a été retenue comme étant la plus efficace pour réduire la charge initiale en microorganismes.

Deux types d'émulsions contenant 10% de protéines et 10% d'huile de colza ont été étudiées : i) la première est constituée de 100% de protéines de pois et ii) la deuxième est constituée d'un mélange de protéines de lait (50%) et de pois (50%). Sur la base des connaissances de la matrice (composition et pH) et des propriétés fonctionnelles des micro-organismes en particulier d'origine fromagère (ex: protéolytique, aromatisante, désamérisante, texturante), 56 souches microbiennes ont été sélectionnées et testées en culture pure et en association microbienne de 3, 6 et 9 souches. La stratégie d'assemblage raisonné de ces souches s'est basée d'une part sur la répartition équilibrée selon leur groupe phylogénétique (firmicutes, eucaryotes, proteobactéries et actinobactéries), mais

aussi sur la connaissance experte des fonctions cibles aromatiques recherchées (experts au sein de l'Unité GMPA). La croissance et l'abondance des micro-organismes dans les émulsions de pois après 3 jours de fermentation à 28°C ont été évaluées sur milieux de culture spécifiques et en étudiant les gènes de l'ADNr 16S par métabarcoding. Le potentiel aromatique des consortia a été caractérisé par un panel sensoriel à l'aide de la méthode Check-All-That-Apply (CATA).

Les résultats de cette étude ont montré que les bactéries lactiques, principalement les espèces *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus casei*, et la majorité des eucaryotes, en particulier *Mucor* and *Geotrichum*, présentent un fort potentiel d'implantation pour la matrice mixte comme pour la matrice végétale. Par contre, une majorité des souches appartenant aux *Actinobacteria* et *Proteobacteria* n'est pas compétitive vis-à-vis de la flore endogène (*Bacillus*). Quelques espèces comme *Hafnia alvei*, *Acinetobacter johnsonii* et *Glutamicibacter arilaitensis*, se développent dans les émulsions de pois seulement quand elles sont associées à d'autres souches.

Des notes aromatiques spécifiques pour chaque matrice ont été générées. Les résultats ont montré qu'il était possible de masquer la note végétale "verte" caractéristique du pois. Ainsi, deux consortia microbiens ont été sélectionnés sur la base de notes torrifiées, fruitées pour l'émulsion végétale, et de notes fruitées/lactiques pour l'émulsion mixte. Cette étude a donc permis de sélectionner des groupes spécifiques de souches, capables de coloniser et de produire des arômes d'intérêt dans des produits à base de pois. Cela montre le fort potentiel des procédés de fermentation pour la conception de produits alimentaires fermentés innovants.

II.2.2. Préparation des matrices avant fermentation (tests préliminaires)

a.Choix de la composition de la matrice et du type de coagulation

Suite à la première partie du travail, des tests préliminaires de fermentation des émulsions protéiques ont été réalisés. Les résultats de ces tests ont mis en évidence la présence de contaminants dans la matière première (protéines de pois) qu'il était essentiel de maîtriser pour l'étude de la fermentation. Un travail a donc été réalisé pour réduire la flore endogène. La concentration en protéines des matrices (14,8%) a dû être revue afin de la rendre compatible avec les traitements thermiques à appliquer pour traiter la matière première. Nous avons donc décidé de diminuer la concentration en protéines à 10%. Les gels ont été reproduits dans les mêmes conditions que décrites précédemment et les comportements des gels de pois et des gels mixtes ont été suivis au cours de la gélification avec les trois types de coagulation (**Fig19**). Des gels ont été obtenus pour toutes les émulsions enrichies en protéines de pois ($G' > G''$). Les cinétiques de gélification observées sont typiques de la cinétique de gélification des bio polymères ([Clark et al., 2001](#)) et similaires pour tous les gels : G' augmente rapidement au début et puis plus lentement avant d'atteindre un plateau. Plus la valeur de G' est importante, plus il y a des interactions entre les protéines, et plus dur devient le gel. La coagulation GDL a conduit à la formation de gels plus durs que les gels obtenus avec la coagulation enzymatique et thermique qui présentaient des valeurs de G' relativement faibles (1000Pa pour les gels de pois et 100Pa pour les gels mixtes). Toutefois, visuellement, une synérèse importante sur ces gels acides était observée.

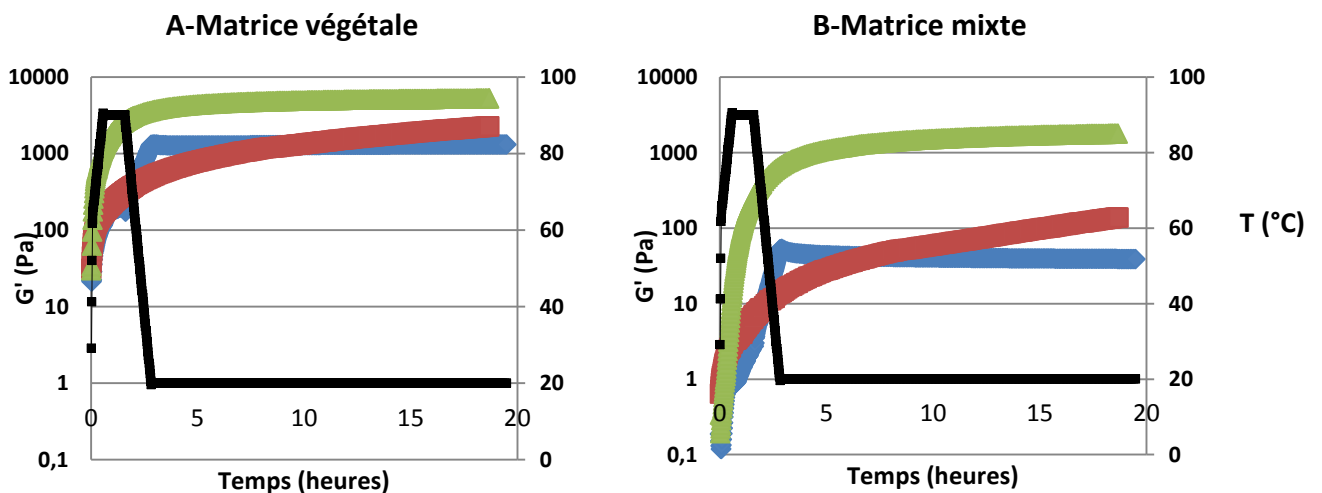


Figure 19. Cinétique de gélification des différents émulsions végétales (100% protéines de pois) et des émulsions mixtes (50% protéines de pois/50% protéines de lait) en fonction du temps. Noir : température (°C), Vert : coagulation acide (2% GDL), rouge : coagulation enzymatique (0,3% TGase+0,3 CaSO₄+0,5% chymosine), bleu (coagulation thermique (90°C/1h))

Pour limiter ce phénomène de synérèse et pour avoir des gels avec des textures acceptables, les conditions de gélification ont dû être réajustées aux teneurs de 10% en protéines. La coagulation thermique n'a pu être retenue car le procédé de décontamination microbienne nécessitait deux traitements thermiques successifs. La coagulation enzymatique n'a pas non plus pu être retenue à cause de la réglementation nationale et européenne sur l'utilisation de cette enzyme. Son emploi est interdit à ce jour pour des produits crus. La transglutaminase (TGase) est active jusqu'à une température d'environ 40°C. Au-delà de 50°C, elle est progressivement dénaturée et devient donc inactive. Son utilisation dans notre produit aurait nécessité un traitement thermique supplémentaire avant la consommation par le panel sensoriel.

La coagulation acide a été donc choisie pour le reste de l'étude. Pour cela nous avons utilisé la Glucono- δ -Lactone (GDL) qui est un produit issu de matières premières végétales, naturellement présent dans de nombreux aliments tels que le miel ou le raisin. Elle est souvent utilisée comme agent acidifiant dans les fromages (affinés et mozzarella), et le tofu par exemple. Une mise au point des conditions de gélification a été effectuée dans le but de mettre la quantité la plus faible possible de GDL pour ne pas trop diminuer le pH - ce qui empêcherait certaines espèces microbiennes acidodsensibles de se développer. Les conditions retenues sont les suivantes :

- Matrice végétale (100% protéines de pois) : 0,1% GDL
- Matrice mixte (50% protéines de pois/50% protéines) : 0,5% GDL
- Matrice lait (100% protéines de lait) : 1,5% GDL

b. Le traitement thermique avant fermentation

Au cours des premières expérimentations de fermentation, plusieurs contaminants microbiens assignés au genre « *Bacillus* » ont été isolés des émulsions de pois fermentées après plusieurs jours de fermentation. Ce contaminant a la capacité de sporuler et est donc très résistant aux traitements thermiques. Ainsi, différents barèmes de traitements thermiques ont été testés, dans le but de réduire la contamination bactérienne issue du pois en ciblant les formes sporulées de *B.cereus* (**Tab17**). Le premier procédé testé est la stérilisation, moyen classique de conservation des aliments, permettant de détruire par une ébullition prolongée à plus de 100°C tous les microorganismes se trouvant dans les aliments. C'est le procédé de décontamination le plus utilisé en industries alimentaires. Dans notre cas, ce procédé a provoqué cependant des changements non souhaitables de la matrice avant la phase de fermentation (ex: changement de couleur de la matrice, présence d'agrégats), indiquant que la conformation des protéines était altérée. La tyndallisation avant ajout de matière grasse a été retenue comme procédé de décontamination. C'est un procédé

de stérilisation fractionnée faisant intervenir deux traitements thermiques modérés (pas plus de 100°C) entre lesquels il y a une période d'incubation des échantillons à une température inférieure à 55°C, température optimale de croissance des cellules végétatives. Ce traitement permet la réduction/élimination des formes sporulées :

- Le premier traitement permet de détruire tous les micro-organismes sous forme végétative et de sélectionner les bactéries résistantes sous forme sporulées
- Une phase d'incubation permet la germination des spores
- Le deuxième traitement thermique permet d'éliminer les formes végétatives qui se sont développées suite à la germination des spores

Les barèmes de tyndallisation sélectionnés sont les suivants : **100°C/30mn** pour le premier traitement thermique, ensuite une phase d'incubation à **37°C pendant 20h** et enfin un dernier traitement thermique à **95°C/30min**. Ce procédé est le meilleur compromis entre une baisse significative de la contamination et le maintien de la structure non gélifiée avant la phase de fermentation.

Tableau 17. Différents procédés de décontamination testés

Type de procédé	(T;t)	Type de matrice	Dénombrement t_0 (UFC/ml)	Dénombrement t_{48h} (UFC/ml)	Aspect de la matrice
Stérilisation	120°C/20min	Avec MG	<10	<10	Couleur grise + Présence de petits agrégats (+++)
		Sans MG			
	110°C/30min	Avec MG	<10	<10	
		Sans MG			
Tyndallisation	95°C/30min	Avec MG	10	10	Formation de petits agrégats
	20h d'incubation/37°C	Sans MG			
	95°C/30min				
	100°C/30min	Avec MG	<10	<10	Formation de petits agrégats + caramélisation
	20h d'incubation/37°C	Sans MG			
	100°C/30min				
	100°C/30min	Avec MG	10	10	Présence de petits agrégats qui disparaissent après homogénéisation
	20h d'incubation/37°C	Sans MG		<10	
95°C/30min					

Une phase d'ultrason a été associée pour optimiser le procédé de décontamination. Les ultrasons à hautes puissances permettent d'obtenir des émulsions plus homogènes et d'inactiver les formes sporulées. Les spores du genre *Bacillus* sont en effet affectées par les ultrasons qui provoquent des changements tels que le gonflement des cellules, l'érosion des parois externes et la stimulation de la germination (Burgos *et al.*, 1972). L'effet combiné de traitement thermique avec les ondes ultrasonores permet en partie l'inactivation des formes sporulées (Evelyn and Silva, 2015). Le procédé de décontamination optimisé est présenté dans la **Figure 20** du deuxième chapitre de la thèse.

II.2.3. Publication

Publication n°2 à soumettre à International Journal of Food Microbiology, 2018

Design of microbial consortia for the fermentation of pea protein enriched emulsions

^a UMR GMPA, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, 78850, Thiverval-Grignon, France

^b UMR Ingénierie Procédés Aliments, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, 91300, Massy, France

S. Ben-Harb, A. Saint-Eve, M. Panouillé, I. Souchon P. Bonnarme, E. Dugat-Bony
F. Irlinger

Abstract

To encourage the occidental population increasing the consumption of legumes, we propose to use legumes into novel and healthy foods, by revisiting a past and popular method of biopreservation in our western world: the fermentation. In the present study, a total of fifty-six strains belonging to different microbial species and isolated from cheese or plant, were investigated for their ability (i) to grow on two suspensions containing respectively 100 % of pea proteins without carbohydrates and 50% of pea proteins - 50% milk proteins with lactose, (ii) to reduce off-flavors and increase aroma interest and (iii) to compete against endogenous flora. The presence of carbohydrates in the mixed emulsions markedly influenced the fermentation, by strongly reducing the pH value of medium through lactic fermentation, whereas absence of carbohydrates in the pea emulsions promoted alkaline or neutral fermentation. Lactic Acid Bacteria, mainly *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus casei* species showed a good ability to grow in pea and mixed emulsions. A majority of the fungal strains, in particular *Mucor* and *Geotrichum*, were also able to grow in both emulsions. While most of bacterial strains assigned to *Actinobacteria* and *Proteobacteria* groups did not compete alone with endogenous flora (*Bacillus*), some species, such as *Hafnia alvei*, *Acinetobacter johnsonii* and *Glutamicibacter arilaitensis*, inoculated with multiple cultures (3 to 9 strains) in the pea emulsions exhibited a strong growth, followed by a decrease of endogenous flora. In the mixed emulsions, the lactic fermentation led to inhibition of most of *Actinobacteria* and *Proteobacteria* groups (e.g. *Brevibacterium casei*, *Corynebacterium casei*, *Staphylococcus lentus*) but also *Bacillus* (e.g. *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*). This procedure allowed the selection of two specific microbial groups, able to colonize and to remarkably influence the generation of volatile compounds in a pea-based product, by generating respectively specific roasted/grilled aroma for the fermented pea emulsion, and fruity and lactic aroma for the mixed emulsions. Moreover, the hexanal level, which led to an undesired green note of pea was highly reduced thanks to fermentation in pea based emulsions. This study showed how assembling multiple microbial cultures can be successfully applied in contexts such as elaboration of innovative food product.

Keywords: legume proteins, fermentation, aroma profile, bacteria, fungi, microbial assembling

1. Introduction

Changing diets and demographic growth at the global scale stand in complete opposition to a sustainable food system. Globally, demand of meat, dairy and fish products and their environmental impacts is still on the rise (Aiking, 2011; Pimentel and Pimentel, 2003). However, the need to develop alternative protein sources of reduced bioenergy and water demands for human diet is necessary. Thus, one crucial challenge for food researchers would be to increase the utilization of sustainable plant proteins, displaying both satisfying nutritional value and functionality (Boland *et al.*, 2013). Legumes provide dietary fiber, high amount of protein (18-32%), minerals and vitamins required for human health. In addition they possess functional properties such as water holding, fat binding, foaming and gelation which could expand their potential use in the development of a wide variety of food products (Boye *et al.*, 2010). Among the sources of plant proteins, the most widely used as a substitute for animal proteins is soy proteins, but soy is not the only source of plant proteins. Owing to excellent yields, availability, and low-price production, the development of alternative plant protein sources such as pea (*Pisum sativum* L.) may account for further prospects concerning a sustainable human food supply. Furthermore, pea proteins can be used in food industry for the formulation of new food products because of their high nutritive value and non-allergenic character (Sabate and Soret, 2014). Its application in food is limited owing to persistent green and beany off-flavors, which are not acceptable by consumers. These defects are either intrinsic to the seed or generated during the various stages of fractionation of the raw materials or during the final transformation of the product (Murat *et al.*, 2013).

Fermentation could be a solution to remove pea off-flavors and improve consumers' acceptance. It is one of the oldest forms of food preservation in the world. During fermentation, functional microorganisms transform the chemical constituents of raw materials thereby enhancing the bio-availability of nutrients, enriching sensory quality of the food, imparting bio-preservative effects and possibly improving food safety, degrading toxic components and anti-nutritive factors, producing antioxidant and antimicrobial compounds, stimulating the probiotic functions, and fortifying with some health-promoting bioactive compounds (Limón *et al.*, 2015; Steinkraus K.H, 2002; Tamang, 2015; Tamang *et al.*, 2016a, 2009). The key element for a successful fermentation and desirable features of products mainly relies on microbial biodiversity and microbial starters used.

The use of selected starters is a common practice to accelerate and steer fermentation process, and, finally, improve the quality of the final products. A large number of species belonging to three important groups have been developed as starters for the fermentation of various food, i.e., lactic acid bacteria, acid-sensitive bacteria and fungi (yeast and molds).

Lactic acid bacteria (LAB) mostly species of *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Weissella*, play pivotal roles in a wide variety of fermented foods (Chumchuere *et al.*, 2000; Peyer *et al.*, 2016; Tamang *et al.*, 2016b). One of the most important applications of such micro-organisms is their use as starters in the production of fermented dairy products, by being in charge of lactose fermentation, protein hydrolysis, formation of organoleptic characteristics of the final product. In fermented soy-based food, (Meinlschmidt *et al.*, 2016) confirmed that fermentation with LAB (*L. helveticus*) can decrease the bitterness and beany off-flavors in samples. Besides, lactic fermentation serves also as a low-cost method for food preservation since LAB exert antagonistic effect by inhibiting pathogenic bacteria and undesirable spoilage microflora such as *Listeria*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, and *Bacillus* species. The antagonistic activities mainly come from decreasing of the pH in the food, competition for nutrients and production of antimicrobial compounds such as bacteriocins (Tamang *et al.*, 2009).

Acid-sensitive bacteria including Actinobacteria as *Corynebacterium* and firmicutes as *Staphylococcus* were detected and considered as the functional groups with abilities to secrete degradative enzymes and consequently to develop numerous volatile compounds and other substances from proteolysis and lipolysis, such as peptides, amino acids and free fatty acids in various fermented food, particularly in cheeses but also in fermented legumes as Doenjang-meju, Kecap and Kedong-sufu (Irlinger *et al.*, 2015, Monnet *et al.*, 2015, Jung *et al.*, 2014, 2016, Alexandraki *et al.*, 2013 Feng and Gao, 2012, Tamang *et al.*, 2016b, 2016a).

High levels of fungi also may play a crucial role in the fermentation of plant and dairy-based foods (Irlinger *et al.*, 2015; Alexandraki *et al.*, 2013, Rani and Soni, 2007). The fermentation of popular soybean foods, such as Koji, uses filamentous fungi, mostly *Aspergillus*, *Mucor* and *Rhizopus* (Zhu and Tramper, 2013). Yeasts and particularly *Geotrichum* and *Debaryomyces* were also detected on soya-bean foods, such as Doenjang, Kecap, black lentils (Bhallae) but also on cheese and are known to use various energy sources and to proteolyse and to produce of volatile compounds (Monnet *et al.*, 2015, Alexandraki *et al.*, 2013, Rani and Soni, 2007; Sridevi *et al.*, 2010).

The *Bacillus* group is known to be a strong coloniser in African and Asiatic fermented plant-based food and specially essential in alkaline fermentation of different soy products (Steinkraus, 1997; Tamang *et al.*, 2016b). Thus, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* are the dominant organisms in *Doenjang*- a traditional fermented soybean food product and play important roles during fermentation (Nam *et al.*, 2012). *Bacillus*-derived enzymes hydrolyze proteins, oligosaccharides and lipids into easily digestible free amino acids to produce flavors. With a

recognized history of safe use in foods, *Bacillus* can also be a good producer of antimicrobial agents against many pathogenic microorganisms (Compaoré *et al.*, 2013).

Alternatively, previous studies on fermentation of agave and sausage have demonstrated that the use of microbial consortia could be the most promising strategy to control the fermentation process and to improve flavor characteristics (Garcia-Aguirre *et al.*, 2009; Pérez-Chabela *et al.*, 2013).

Little is known about the impact of fermentation - particularly by using microbial consortia - on the overall aroma of pea proteins-based products. Ten starter cultures composed of 7 species of LAB (*Streptococcus* and *Lactobacillus*), were inoculated into milk with 5 different ratios of pea proteins (i.e., range of 0 to 40 g of pea protein for 100 g of total protein) for yogurt production (Youssef *et al.*, 2016). The increase of pea protein concentration resulted in products with higher acidity, greater syneresis and lower firmness than the reference (i.e., yogurt). In another study, the lactic fermentation by strains of *L. plantarum* and *P. pentosaceus* improved the aroma of pea protein extracts by decreasing the n-hexanal content and reducing or masking "green note" type off-flavors, (Schindler *et al.*, 2012).

The aim of our study is to design *de novo* microbial consortia by selecting strains representative of diverse phylogenetic groups, isolated from fermented foods and plant and able (i) to colonize pea proteins-based products and (ii) to produce of volatile odorant compounds contributing to reduce or mask off-flavors of pea proteins. Two types of pea-based products were studied: pure pea proteins emulsion and mixed emulsion containing a 1:1 ratio of pea proteins to milk proteins. Fifty-six micro-organisms isolated from dairy and vegetable products, were used alone or in combination to inoculate these suspensions. Total counts, microbial diversity and sensorial analyses were carried out to evaluate the change in the sensory profile and the microbial composition of the different fermented emulsions. To this end, an analysis of produced volatile compounds by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was used to highlight the role played by two microbial consortia in the change of the aromatic composition and decreasing of green notes after fermentation.

2. Materials & Methods

2.1 Ingredients / raw materials

Pea protein isolates (PPI) (NUTRALYS® S85F) were obtained from Roquette Frères (Lestrem, France). Skim milk powder (SMP) was purchased from Lactalis (Bourgarré, France) and Rapeseed oil (Fleur de Colza, Lesieur, France) was purchased from a local supermarket.

2.2 Preparation of two pea protein emulsions

Two types of emulsions were prepared in the same conditions with 10% (w/w) of proteins, the first contained 100% pea proteins (Pea Emulsion: PE) and the second one was a mixture of pea and milk proteins (50/50) (Mixed Emulsion: ME) (**Table18**). For all emulsions, proteins were first dispersed in a solution of 1% NaCl and stirred at room temperature for 1h. For ME, suspensions of pea and milk proteins were mixed together and stirred for 1 h. Then fat was added in each suspension and the emulsion was homogenized with the rotor-stator homogenizer (IKA®T25 Digital Ultra-Turrax) and an ultrasonic homogenizer (Branson-250/450 Sonifier). Pea and mixed emulsions were submitted to a tyndallisation process, involving successive heat treatments in order to inactivate spores (**Figure20**) followed by another decontamination step by ultrasound (ultrasound step 1). This process was pertinent to efficiently reduce environmental Bacilli-type spore-forming bacteria, leading to initial Bacilli counts below 10 cfu/g (data not shown).

Table 18. Composition of pea and mixed emulsions (g /100 g)

	Milk protein	Pea protein	Fat	Lactose	Ash	Sodium	Fiber
Pea Emulsion (PE)	-	10	10	-	0.44	0.44	0.14
Mixed Emulsion (ME)	5	5	10	8	1.41	0.4	0.07

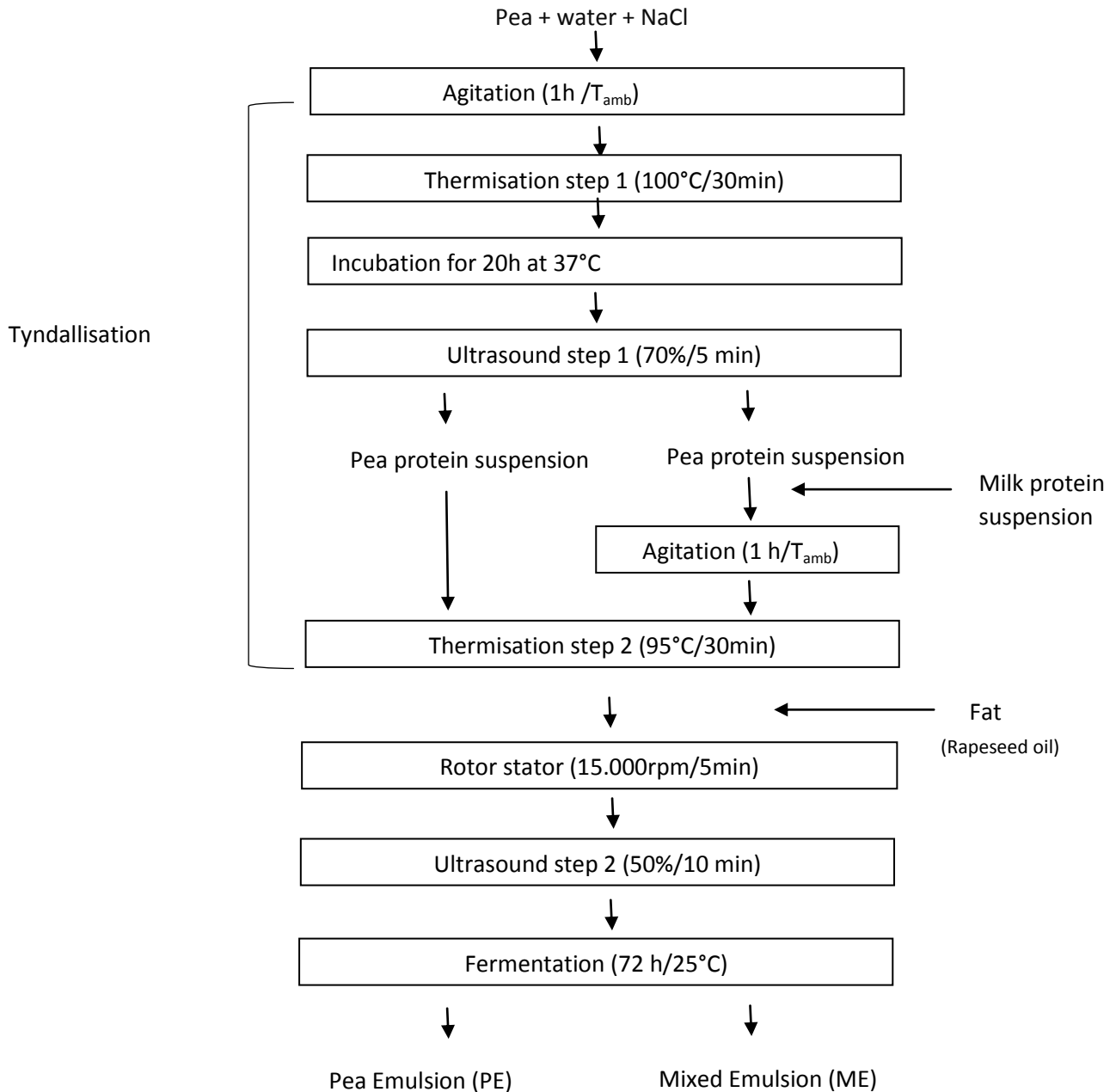
2.3 Strains and inocula preparation

Fifty-six strains assigned to different phylogenetic groups (actinobacteria, firmicutes, proteobacteria, mold and yeasts) belonging to the private collection of our laboratory (GMPA) and LUBEM and isolated from dairy and vegetable products, were used in this study. They were assigned to the following *genera*: *Glutamicibacter* (2 strains), *Brachybacterium* (1), *Brevibacterium* (5), *Citricoccus* (1), *Corynebacterium* (3), *Microbacterium* (1), *Micrococcus* (1), *Acinetobacter* (1), *Advenella* (1), *Alcaligenes* (1), *Hafnia* (1), *Halomonas* (1), *Psychrobacter* (1), *Kocuria* (1) *Bacillus* (3), *Staphylococcus* (3), *Carnobacterium* (1), *Lactobacillus* (4), *Lactococcus* (1), *Leuconostoc* (1), *Streptococcus* (2), *Weissella* (1), *Mucor* (5), *Penicillium* (1), *Rhizopus* (1), *Candida* (1),

Debaryomyces(2), *Geotrichum* (1), *Kluyveromyces* (3), *Pichia* (1), *Saccharomyces* (2), *Yarrowia* (1), and *Zygosaccharomyces* (1).

Strains were cultivated separately at 28°C for 48 h to 72 h on the following broth media: M17 for lactobacilli, lactococci and streptococci, PDB for yeast and fungi and BHI for staphylococci, actinobacteria and proteobacteria. Cells were harvested by centrifugation (5000 g, 10 min, 4°C) until the late exponential phase of growth was reached, then washed in sterile physiological water and re-suspended in physiological water at the cell density of 8.0 log cfu/m.

Figure 20. Preparation of pea and mixed fermented emulsions



2.4 Experimental design of pea and mixed emulsions fermentation

Pea and mixed emulsion were mixed with physiological water containing microbial solutions obtaining an initial cell density in the inoculated solutions of 6.0 log cfu/g for each bacterium and 4.0 log cfu/g for each fungus and incubated at 28°C for 72 h. The fermented emulsions were compared between them and with the control emulsion (without microbial inoculum), obtained under the same conditions. All samples were stored at -20°C before amplicon sequencing analysis, while sensory and microbiological analyses were carried out before freezing.

This study was conducted in 2 steps at four-month interval.

In the first step of the study, fifty-six strains were evaluated for their ability to grow in the pea (PE) and mixed (ME) emulsions and characterized by sensory analyses. All strains were clustered into 3 different groups according to their phylum and/or their phylogenetic affiliation (Eukarya, firmicutes and acid sensitive - Actinobacteria/ Proteobacteria - group). Nine strains, representative of each phylum or phylogenetic groups were then drawn from the pool of 56 strains and a total of 320 combinations of strains at 4 levels of species richness (1, 3, 6 and 9 species) were assembled and inoculated in the PE and ME emulsions. Some monocultures were replicated twice. A summary of the test design is given in Supplementary **Table S1 (Annexe2)**.

In the second step of the study, twenty microbial combinations consisting of 14 fungi, 9 firmicutes, 3 proteobacteria and 5 actinobacteria were selected from 320 combinations investigated in the previous first part on the basis of the best ability to grow on one of the pea and mixed emulsions and to produce noticeable aromatic notes (Supplementary **Table S2**) (Annexe2).

All cultures were obtained in triplicate.

2.5 Microbial analyses and determination of cell count

The fermented pea and mixed emulsions were homogenised and ~1 g was transferred into a sterile container. A sterile saline solution (8.5 g/l NaCl) was added to yield a 1:10 dilution and the mixture was homogenised with an Ultra Turrax® (Labortechnik) at 8000 rpm/min for 1 min. Total bacteria except LAB were enumerated by surface plating in duplicate on BHI agar supplemented with 50 mg/l amphotericin B after 5 days incubation at 25°C. Fungal population was determined by surface plating in duplicate using Yeast-Glucose-Chloramphenicol agar (YGC) supplemented with 0.01 g/l tetrazolium chloride (TTC) after 3 days incubation at 25°C. LAB were enumerated by surface-plating in duplicate on MRS agar after 2 days incubation at 30°C.

Each fungal species had a distinct morphotype on YGC supplemented with TTC, which allowed their direct enumeration.

2.6 Bacterial 16S rRNA gene amplification and barcoded sequencing

DNA extraction was performed on 0.250 g of the fermented solutions using the bead beating-based protocol detailed in a previous work (Monnet *et al.*, 2006). DNA concentration was determined using a Qubit fluorometer (Life Sciences) according to the Broad Range DNA assay kit protocol.

PCR amplification, library preparation and sequencing were performed at GeTPlaGe platform (Toulouse, France). Briefly, the V3-V4 region of the 16S rRNA gene (nearly 460 bp size) was amplified from 10 ng of purified genomic DNA using the primers F343-TACGGRAGGCAGCAG (Liu *et al.*, 2007) and R784-TACCAGGGTATCTAATCCT (Andersson *et al.*, 2008) as previously described (Lazuka *et al.*, 2015). The resulting libraries were purified and loaded onto the Illumina MiSeq cartridge according to the manufacturer's instructions. Each paired-end sequence was assigned to its corresponding sample according to the previously integrated index.

2.7 Analysis of bacterial 16S rRNA gene sequences

For bacteria, paired-end reads were merged using Flash (Magoč and Salzberg, 2011) prior to further analyses. Then, fastq files were quality-filtered and analyzed using QIIME v.1.9.0 (Caporaso *et al.*, 2010b). All sequences <400 bp and >500 bp were discarded. Furthermore, sequences having an average Phred quality score <25, containing at least one ambiguous bases or exhibiting at least one error in primer sequences were discarded. Chimeric sequences were identified using USEARCH (Edgar, 2010) implemented in QIIME's pipeline using both the reference mode against either SILVA LTP database (release 119) (Yarza *et al.*, 2008). Operational taxonomic units (OTUs) were clustered at 97% identity using QIIME's *de novo* OTU-picking pipeline using UCLUST (Edgar, 2010). Any OTU comprising less than 200 reads (almost 0.005% of total sequences for each run) were removed as recommended by Bokulich and co-workers (Bokulich *et al.*, 2013). Representative sequences for each OTU were classified taxonomically using BLAST (Altschul *et al.*, 1990) against the same databases used for chimera checking, and assignments were controlled using EzTaxon database (Kim *et al.*, 2012). When multiple affiliations were possible at the species level we chose one representative species and add the term "group" in the final affiliation. Alpha diversity metrics, corresponding to variables describing diversity within samples, were computed using QIIME. Bacterial 16S rRNA gene sequences were aligned using PyNAST (Caporaso *et al.*, 2010a) and the resulting alignment was used to build a phylogenetic tree using FastTree (Price *et al.*, 2010).

2.8 Determination of pH

The pH values were the arithmetic means of 3 measurements by using a surface electrode Blue line 27 (Schott).

2.9 Sensory evaluation by Check-All-That-Apply (CATA) method

Sensory analysis was performed to characterize the non-fermented and fermented emulsions determined by orthonasal way. The control samples were not inoculated and stored at 4°C for three days. A descriptive analysis was performed according to the CATA method (Check-All-That-Apply) using a panel of 18 to 20 semi-trained judges (22–45 years old). The panelists were familiar with sensory analysis in general, but not specifically trained in evaluation of pea or mixed emulsions. The list of attributes used for CATA questionnaire was established by preliminary test and by literature analyses. A total of 54 descriptors were selected and composed of 7 classes (Supplementary **Table S3**) (Annexe2). In the first step, 10 sessions were performed (36 samples were analyzed by each judge in each session). In the second step, 2 sessions were performed (11 samples were analysed by each judge in each session). The recognition of an attribute on a set of products by a panelist was marked by ticking the corresponding box in the questionnaire. The samples were blind labeled and the order of presentation randomized between subjects and sessions. All sensory analyses were carried out in an air-conditioned room (20°C), in individual booths, under white light. All samples were analyzed in triplicate.

Sensory sessions were performed using the Fizz software (Version 2.47A, Biosystemes, France). In order to estimate the significance of differences between means, CATA test was conducted, followed by Cochran test at the 5% level. Additionally, a CFA was conducted to correlate samples and aromatic descriptors.

2.10 Extraction and identification of volatile flavour components from fermented emulsions

The V10 , M7, VT and MT emulsion samples were subjected to GC/MS analysis in order to identify the volatile organic compounds (VOCs). Before analysis, two duplicates of the same sample were mixed, vigorously shaken and diluted (1/30) with cold Milli-Q water (Merck Milipore, Merck KGaA, Germany) at 4°C. The extraction of VOCs from five milliliters of the mixture were carried out after homogenization with a Polytron© PT 2100 (VWR, Radnor, USA), using a water-jacketed purge and trap apparatus (purge and trap concentrator, Tekmar-Dohrman 3100, Tekmar, USA) at 40 °C (purge: 40°C/15min; Desorb: 225°C/2min) coupled to a gas chromatograph (Agilent technologies 3800) and a mass spectrometer detector (MSD 5975C, Agilent Technologies). The apparatus was equipped with a DB-5 polar capillary column (30 m x 0.25 mm; film thickness of 0.25 µm; Agilent 122-

5532, USA). Oven temperature increased from 40°C to 250°C at a rate of 4°C/min and then remained at 250°C for 10 min.

Individual peaks were identified by comparing their retention indices and their mass spectra to those within the mass spectral library database. Retention indices of peaks from fermented emulsions (V10 and M7) were then compared to those of control samples (VT and MT). Data were reported as log (peak area/g) for each compound detected.

3. Results

3.1 Part 1: Selection of strains able to grow on two (PE and ME) emulsions

The growth ability of fifty-six strains belonging to 50 different microbial species differed depending on their phylogenetic group belonging (Firmicutes, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, Yeast and Molds), type of microbial associations (single or multi-cultures) and type of emulsions (PE or ME).

On the Pea Emulsion (PE) (Table 19A): A minority of the strains (35%) belonging to G2 (*Actinobacteria* and *Proteobacteria*), including *Glutamicibacter arilaitensis*, *Brevibacterium antiquum*, *Brevibacterium casei*, *Corynebacterium casei*, *Acinetobacter johnsoni*, *Alcaligenes faecalis*, *Hafnia alvei* and *Psychobacter celer*, were able to grow on PE, both as single strain or associated with other microorganisms. On the contrary, most of the strains (12/16) belonging to Firmicutes group (81%), including *Bacillus altitudinis*, *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus lentus*, *Carnobacterium maltaromaticum*, *Lactobacillus casei*, *plantarum* and *rhannosus*, *Lactococcus lactis*, *leuconostoc lactis* and *Weissella cibaria*, were able to grow on PE, both as single strain or associated with other microorganisms.

In the same way, except for *Penicillium camemberti* and *Saccharomyces cerevisiae*, all other (17/22) strains from the fungal group could grow on PE, both as single strain or associated with other microorganisms.

On the Mixed Emulsion (ME) (Table 19B): A small number (28%) of strains belonging to G2, including *Brevibacterium casei*, *Brevibacterium linens*, *Corynebacterium casei*, *Acinetobacter johnsoni*, *Hafnia alvei* and *Psychobacter celer*, was able to grow on ME, both as single strain and associated with other microorganisms. It is noteworthy that, unlike PE, the substrate ME allowed the growth of most (14/21) *Actinobacteria* and all *Proteobacteria* in single culture, whereas their growth is strongly compromised when they were associated with lactic acid bacteria belonging to G1..

Four strains of this group (19% of G2) were selected for their ability to grow in combination with LAB.

Nearly all strains (15/16) belonging to firmicutes (G1) were able to grow in ME in single culture, with the exception of one strain of the species *Streptococcus thermophilus*. Nine strains belonging to the genera *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* and *Weissella*, showed a strong growth, both as single strain or associated with other microorganisms and were therefore selected for the assembling of consortia.

Likewise, most strains (16/18) from the fungal group G3 (84%) were able to grow on the ME, both as single strain or associated with other microorganisms, with the exception of three species, *Penicillium camemberti*, *Pichia fermentans* and *Saccharomyces cerevisiae*. The molds of the *Mucor* genus as well as yeasts of the genera *Candida*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Geotrichum*, *Pichia*, *Yarrowia* and *Zygosaccharomyces* showed an implantation when inoculated into associations and were therefore selected (74% of the G3) for the second part of experiments.

At the end of this first experiment, thirty-one strains were selected for the assembling of twenty different microbial consortia, composed of 3 to 9 strains (**Table S2**)(annexe2) allowing the fermentation of two types of emulsions (PE and ME). The selection was based on the following criteria: i) rapid growth during propagation, ii) elevated cell density and iii) various aromatic sensory attributes after 3 days' incubation on pea and mixed emulsions.

B)

Domain	Group	Phylum	Genus	Species	Replicate	Combinations (1 to 9 strains)					strains				
						single strain	3 strains	6 strains	6 strains	6 strains		9 strains			
							G1 or G2 or G3	G1 + G2	G1 + G3	G2 + G3		G123			
BACTERIA	G2	Actinobacteria	<i>Glutamicibacter</i>	<i>arilaitensis</i>	2										
				<i>bergerei</i>	1										
			<i>Brachybacterium</i>	<i>alimentarium</i>	1										
			<i>Brevibacterium</i>	<i>antiquum</i>	1										
				<i>aurantiacum</i>	1										
				<i>casei</i>	2										
			<i>Citricoccus</i>	<i>linens</i>	1										
				<i>sp.</i>	1										
				<i>casei</i>	1										
			<i>Corynebacterium</i>	<i>flavescens</i>	1										
				<i>variabile</i>	2										
	<i>sp.</i>	1													
	Proteobacteria	<i>Kocuria</i>	<i>varians</i>	1											
		<i>Microbacterium</i>	<i>foliorum</i>	1											
		<i>Micrococcus</i>	<i>luteus</i>	1											
		<i>Acinetobacter</i>	<i>johnsonii</i>	2											
		<i>Advenella</i>	<i>kashmirensis</i>	1											
		<i>Alcaligenes</i>	<i>faecalis</i>	1											
		<i>Hafnia</i>	<i>alvei</i>	3											
		<i>Halomonas</i>	<i>alkaliphila</i>	1											
		<i>Psychrobacter</i>	<i>celer</i>	1											
	G1	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	<i>altitudinis</i>	1										
				<i>fordii</i>	1										
<i>galactosidilyticus</i>				1											
<i>Staphylococcus</i>			<i>xylosus</i>	3											
			<i>lentus</i>	2											
			<i>equorum</i>	1											
<i>Carnobacterium</i>			<i>maltaromaticum</i>	1											
<i>Lactobacillus</i>			<i>casei</i>	1											
			<i>fermentum</i>	1											
			<i>plantarum</i>	2											
<i>Lactococcus</i>			<i>rhamnosus</i>	3											
			<i>lactis</i>	2											
<i>Leuconostoc</i>	<i>lactis</i>	3													
<i>Streptococcus</i>	<i>thermophilus</i>	2													
	<i>thermophilus</i>	1													
<i>Weissella</i>	<i>cibaria</i>	2													
EUCARYA	G3	Molds	<i>Mucor</i>	<i>brunneogriseus</i>	1										
				<i>brunneogriseus</i>	1										
				<i>circinelloides</i>	1										
				<i>hiemalis</i>	1										
			<i>hiemalis</i>	1											
			<i>Penicillium</i>	<i>camemberti</i>	1										
	<i>Rhizopus</i>	<i>arrhizus</i>	1												
	Yeasts	<i>Candida</i>	<i>catenulata</i>	3											
			<i>Debaryomyces</i>	<i>hansenii</i>	1										
				<i>hansenii</i>	3										
			<i>Geotrichum</i>	<i>candidum</i>	3										
				<i>lactis</i>	1										
			<i>Kluyveromyces</i>	<i>lactis</i>	2										
				<i>marxianus</i>	2										
<i>Pichia</i>			<i>fermentans</i>	1											
<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	1													
	<i>cerevisiae</i>	1													
<i>Yarrowia</i>	<i>lipolytica</i>	2													
<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>rouxii</i>	1													

3.2 Part 2: Fermentation of emulsions by allochthonous microbial consortia

3.2.1 pH values and growth of the microbial consortia

Fermentation of two types of emulsions (PE and ME) was performed by inoculating different twenty allochthonous microbial consortia (M1 to M10 and V1 to V10) in order to evaluate their contribution to enhance sanitary and technological features of pea-based products (e.g. barrier effect, aromatic profiles, green note reduction). The bacterial and fungal strains of these consortia were inoculated at exponential phase at initial concentrations close to those of starters and ripening cultures used in dairy processes. The non-inoculated PE and ME emulsions were used as controls (MT and VT).

On the pea emulsion (PE) (Figure 21): After 72 hours of fermentation of PE at 28°C, counts of bacteria and fungi from consortia (V1 to V10) ranged from 7.6 to 9.5 log₁₀ CFU/g (figure 20A) and from 4.9 to 6.5 log₁₀ CFU/g (figure 20B) respectively. For some samples (V6, V8 and V3), these concentrations are slightly lower than levels generally occurring in other fermented products (cheese or fermented vegetables). A bacterial contaminant assigned to genus *Bacillus* was detected at a range of 8 log₁₀ CFU/g in the control sample (VT).

The phylogenetic distribution of bacterial and fungal species (**Figure 21A and 21B**) showed that all samples (V1 to V10 and VT) were composed of species assigned to presumptive bacterial phyla (*Actinobacteria*, *Firmicutes* and *Proteobacteria*) and fungal genera (*Geotrichum*, *Kluyveromyces*, *Mucor* and *Candida*). In samples V2, V8 and VT, the contaminant *Bacillus licheniformis* species was the major component, since it represented 77%, 71% and 98% of bacterial diversity respectively. It is noteworthy that the relative abundance of species *Bacillus licheniformis* and *Lactobacillus* group *casei/rhamnosus* was remarkably similar in samples V2 and V8. The other microbial populations (V1, V3-V7, and V9-V10) were dominated by the initially inoculated species, namely *Acinetobacter* group *johnsoni* (67%), *Lactobacillus* group *plantarum* (83%), *Hafnia alvei* (49% to 70%), *Candida catenulata* (70%), *Mucor hiemalis* (99%) *Kluyveromyces marxianus* (80%) *Geotrichum candidum* (85% to 99%); they gave the most promising results with respect to microbial growth in PE using only pea proteins as energy source, and barrier role against endogenous flora. Conversely, some species initially inoculated in PE were not detected after 3 days of fermentation (*Brevibacterium antiquum*, *Leuconostoc lactis*, *Weissella cibaria*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia fermentans* and *Yarrowia lipolytica*).

Figure 21C shows the difference in pH values between the initial value (pH₀ = 6.6) and the value reached after 72 hours of fermentation. In the inoculated pea emulsions V1, V5, V6, V8 and the non-inoculated suspension (VT), an pH increase with values of ΔpH from 1 to 1.6 was observed. The

resulting alkaline PE emulsions were characterized by the bacterial dominance and absence or limited fungal growth. Conversely, pH values of inoculated pea emulsions V2, V3, V7 and V9 were not subjected to a significant change (<0.5 units). In these cases, the overall action of these associations maintained the pH value at about 6, without acidification or substantial alkalization. Surprisingly, a slight acidification of pea emulsions V4 and V10, both inoculated with *Geotrichum candidum* was observed.

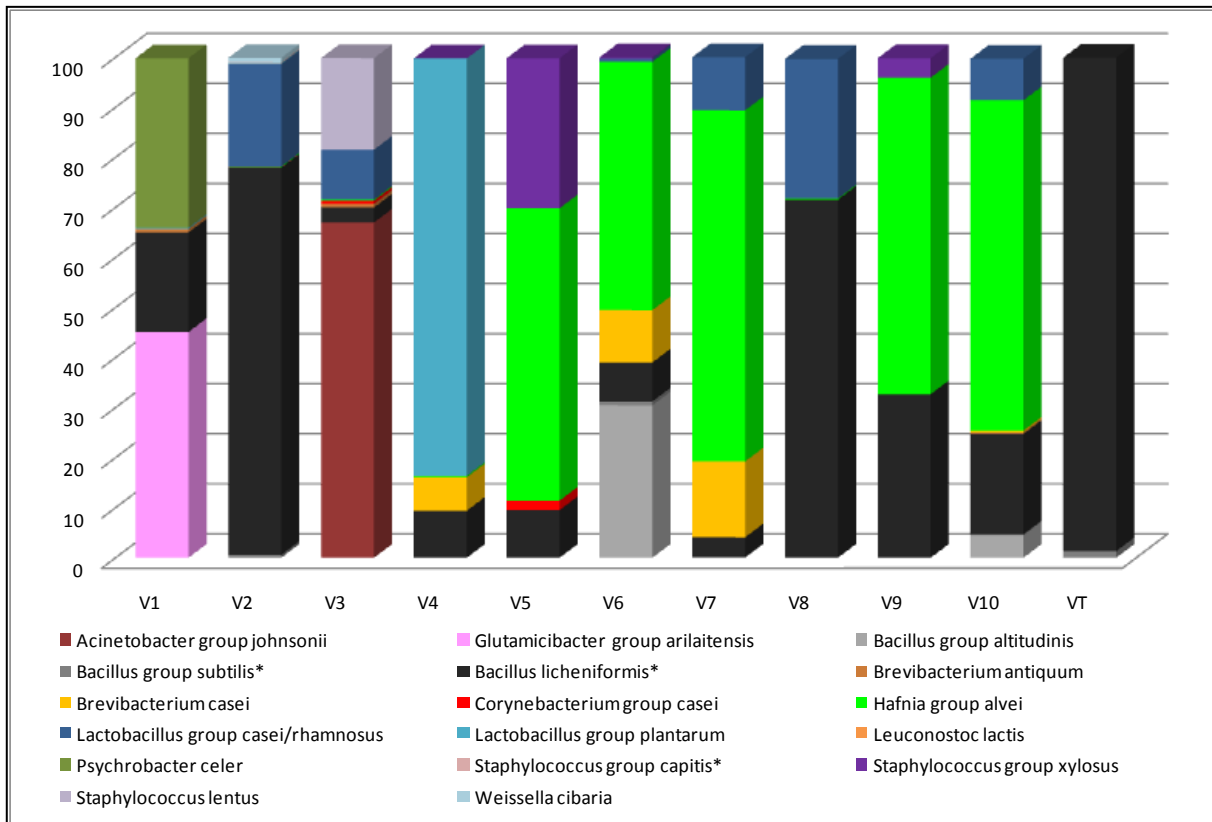
On the Mixed Emulsion (ME) (Figure 22): After 72 hours of fermentation at 28°C, counts of bacteria and fungi from consortia (M1 to M10) ranged from 8.8 - 9.6 log₁₀ CFU/g (figure 21A) and from 5.5-8.1 log₁₀ CFU/g (figure 21B) respectively. These concentrations are similar to that generally found in other fermented products (cheese or fermented vegetables) during a ripening cycle. After incubation of control sample (MT), various bacterial contaminants were detected at range of about 8.7 log₁₀ CFU/g.

The phylogenetic distribution of bacterial and fungal species (**Figure 22A and 22B**) showed that all the samples (M1 to M10 and MT) were composed of species assigned to presumptive bacterial phyla (*Actinobacteria*, *Firmicutes* and *Proteobacteria*) and fungal genera (*Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Kluyveromyces*, *Mucor*, *Pichia* and *Candida*). Whereas no or very weak contamination was observed (<1%) in samples M4, M6, M7 and M8, some ME emulsions (M2, M3 and MT) were contaminated by the presence of several species of *Bacillus* (*Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*), accounting for 35%, 61% and 76% of total bacterial diversity respectively. The low number of strains of these consortia (4 in M2 and 3 in M3) belonging to G1 and G3 groups (*Firmicutes* and fungi) seems to favor the growth of endogenous flora belonging to *Bacillus* genus.. The other microbial populations (M1, M4 to M10) were dominated by LAB species inoculated, *Lactococcus lactis* (59% to 94%), *Lactobacillus group casei/rhamnosus* (37% to 81%), but also *Proteobacteria* such as *Hafnia alvei* (8% to 72%) and fungi as *Candida catenulata* (82%), *Kluyveromyces marxianus* (80%), *Kluyveromyces lactis* (48%), *Debaryomyces hansenii* (42%), *Pichia fermentans* (99%) and *Geotrichum candidum* (99%). These consortia gave the best results with respect to their noticeable growth in ME using as energy source pea proteins, casein and lactose, and their barrier role against endogenous flora. Conversely, some bacterial species initially inoculated in ME did not grow following 3 days of fermentation (*Leuconostoc lactis*, *Psychrobacter celer* and *Staphylococcus lentus*). It is noteworthy that *Debaryomyces hansenii* and *Pichia fermentans* were able to colonize a mixed emulsion with pea and milk proteins (M1 and M2) whereas they could not grow on pea proteins alone (V2, V3 and V9). Conversely, *Psychrobacter celer* (34%) and *Staphylococcus lentus* (18%) grew on pea emulsions (V1 and V3) and were not detected on mixed emulsions with pea proteins and milk (M1 and M2).

The transformation of lactose from milk into lactic acid by LAB and *Proteobacteria* (e.g. *Hafnia alvei*) led to a significant pH decrease with the values of ΔpH ranged from 1 to 2.5 for all inoculated ME emulsions whereas the pH value remained almost unchanged for the control non-inoculated sample (MT: pH 6.3), thus favoring the growth of autochthonous flora belonging to *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* species, known to be acid-sensitive (**Fig.22C**).

A)

Log ₁₀ bacterial CFUs/g	9,04	8,36	8,31	9,10	9,65	7,56	9,38	8,27	9,09	9,16	7,93
------------------------------------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------



B)

Log ₁₀ fungal CFUs/g	6,55	5,00	6,39	4,95	4,96	5,92	6,24
---------------------------------	------	------	------	------	------	------	------

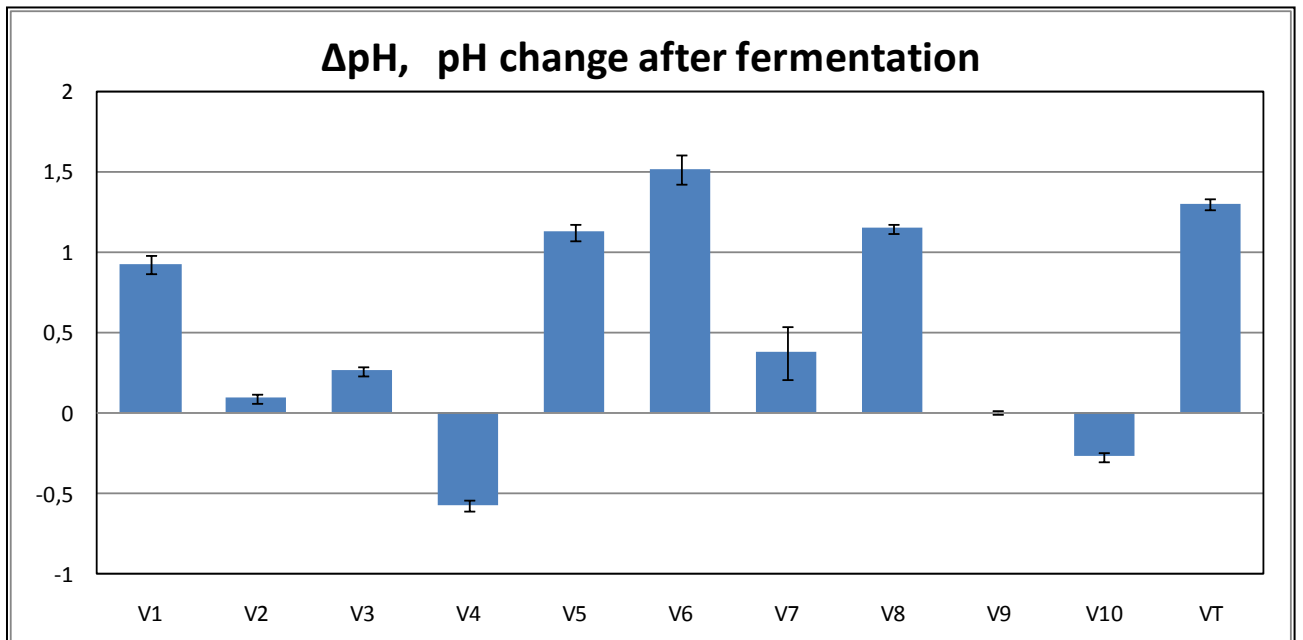
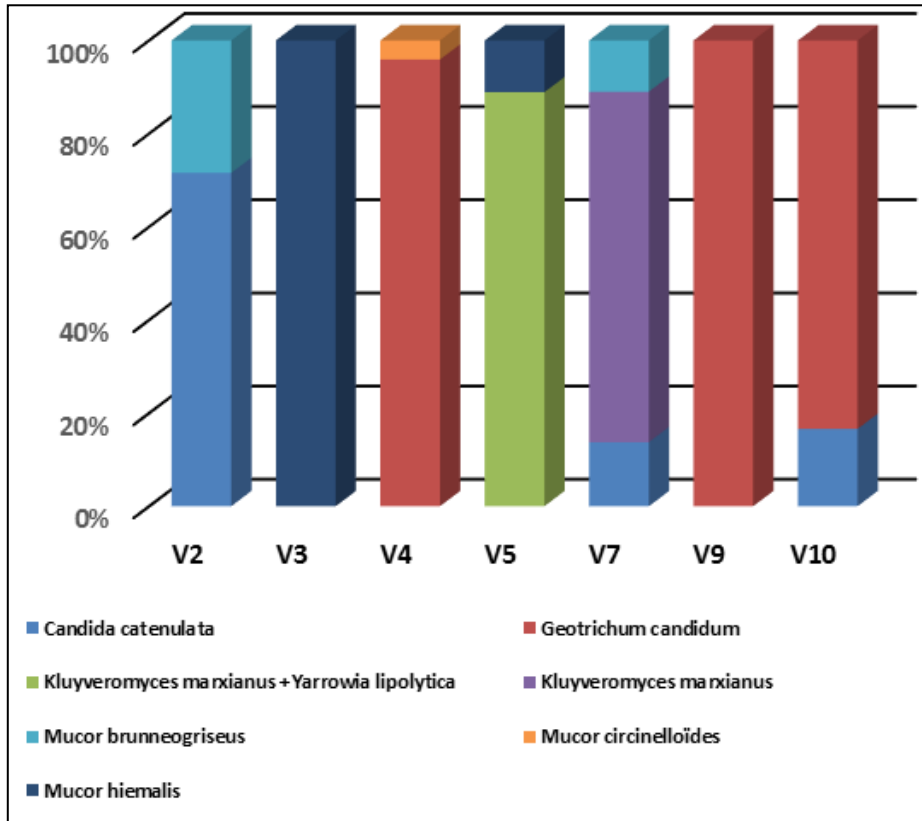


Figure 21. Distribution and abundance of species on the pea emulsions (PE) fermented by ten different allochthonous microbial consortia (V1 to V10)

A: Relative abundance of bacterial species determined by amplicon sequencing of bacterial 16S DNA (bottom), each column represents the different fermented emulsions, only taxa detected at > 0.5% relative abundance are shown. Total bacterial cell numbers are determined by a culture dependent method, on BHI incubated at 28°C and MRS incubated at 30°C (top).

Chapitre II – Résultats

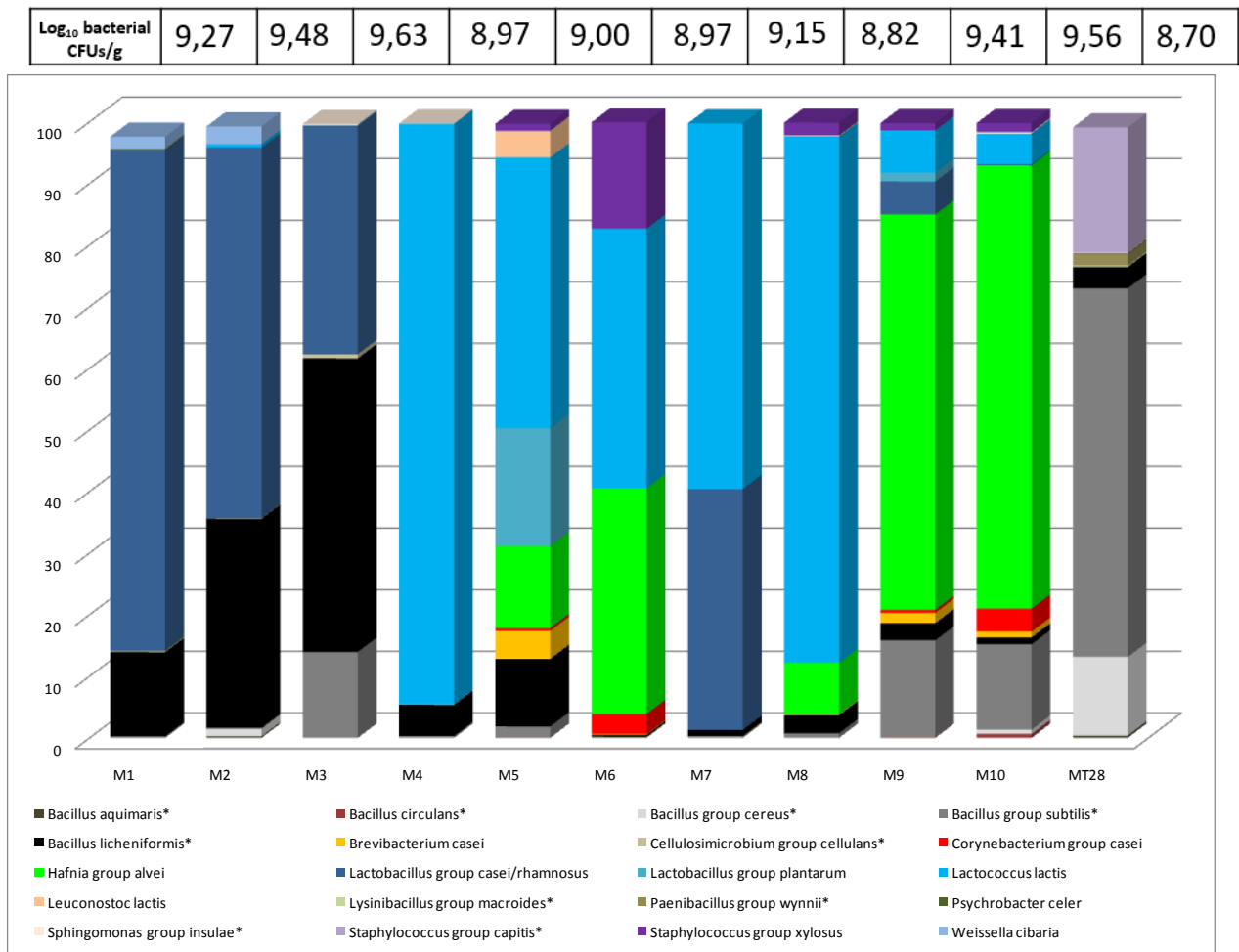
VT: A PE emulsion was used as control and subjected to the same conditions, except for the use of the microbial consortia

* The species was not inoculated and is supposed to be initially an endogenous contaminant from pea proteins isolates.

B: Relative abundance of fungal community species determined by CFUs. CFUs of each species were determined by plating serial dilutions of homogenized fermented emulsions on YEGC incubated at 28°C

C: pH values variations on the PE after fermentation by different microbial consortia (V1 to V10 and VT). The pH values were measured after 3 fermentation days.

A)



B)

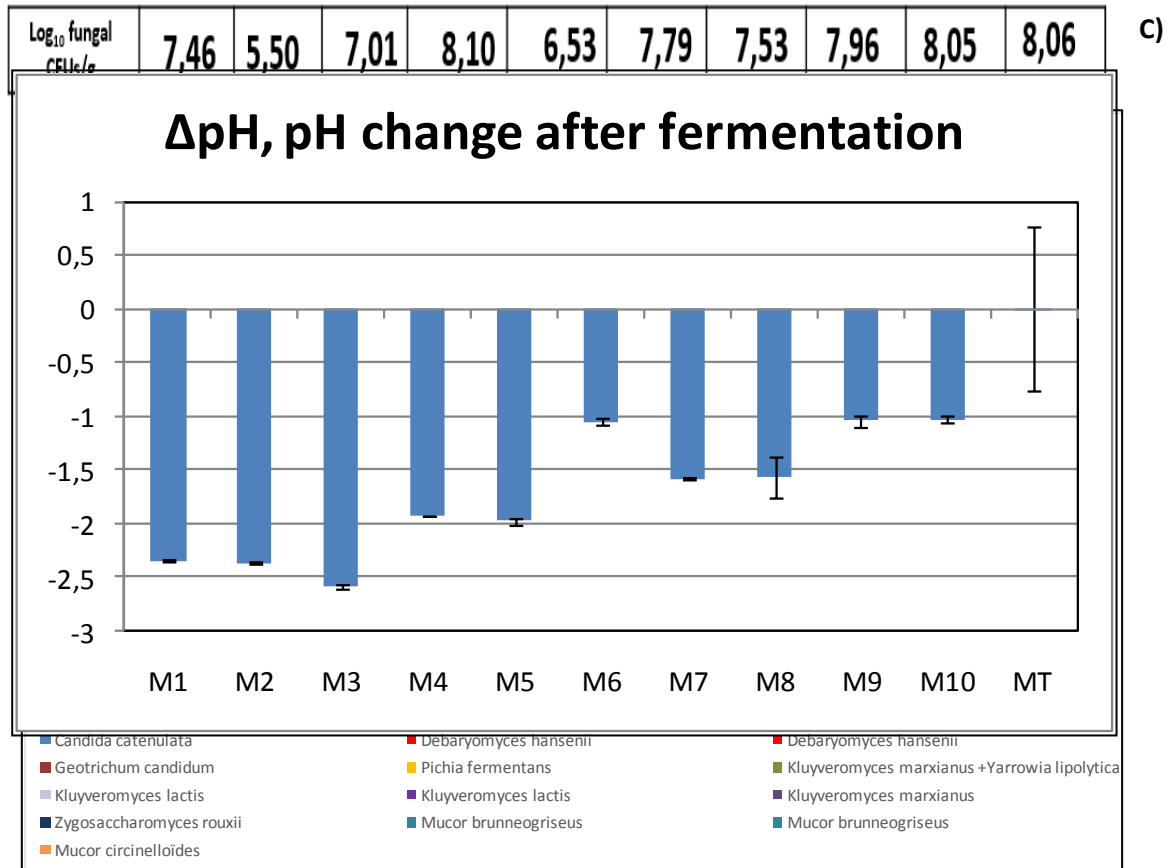


Figure 22. Distribution and abundance of species on the mixed pea and milk protein emulsions (ME) fermented by ten different allochthonous microbial consortia (M1 to M10)

A: Relative abundance of bacterial species determined by amplicon sequencing of bacterial 16S DNA (bottom), each column represents the different fermented suspensions, only taxa detected at > 0.5% relative abundance are shown. Total bacterial cell numbers are determined by a culture dependent method, on BHI incubated at 28°C and MRS incubated at 30°C (top).

MT: A ME emulsion was used as control and subjected to the same conditions, except for the use of the microbial consortia

* The species was not inoculated and is supposed to be initially an endogenous contaminant from pea proteins isolates.

B: Relative abundance of fungal community species determined by CFUs. CFUs of each species were determined by plating serial dilutions of homogenized fermented suspensions on YEGC incubated at 28°C.

C: pH values variations on the ME after fermentation by different microbial consortia (M1 to M10 and MT). The pH values were measured after 3 fermentation days.

3.2.2 Sensory properties of fermented emulsions

The odor perception of the fermented emulsions (PE and ME) by the different allochthonous microbial consortia and the control non-inoculated samples are shown in **Figure 23**. Correlation maps of Correspondence Factorial Analysis (CFA) with the significant sensory descriptors ($P < 0.05$) permit to illustrate the sensory properties of pea and mixed emulsions.

The sensory map of the fermented PE (**Fig.23A**) explained 53.4% of the variance. Except for the V9 emulsion, characterized by the same aroma notes than the control non-inoculated sample (Pea, neutral, bread) and loaded negatively on the F1 and F2 axes, the other fermented emulsions

were clustered in three distinct groups on the different axes of the map and characterized by different aromatic profiles. The V6 sample was located positively on the F1 axis and slightly positively on the F2 axis and characterized by sensory attributes close to cheesy notes (ammoniac, sulfur). The samples including V1, V3, V5, V7 and V8, were located close to the center of the correlation map. These samples appear to have bland sensory characteristics, given the position of their attributes. Finally, the samples including V4 and V10 were located negatively on F1 axis and positively on F2 axis and characterized by flower and fruity notes.

The sensory map of the fermented ME (**Fig.23B**) described 68.3% of the variance. The fermented and non-fermented emulsions were clustered in three distinct groups according to their distribution on the map. The first group included M5 emulsion and the non-fermented emulsion (control), characterized by smoked, pea, and herb notes. The second group was composed of M4, M6, M7, M8, M9 and M10 emulsions, and was characterized by fermented fruit and ethanol notes. The last group (M1, M2 and M3) was perceived with strong notes such as cheese, rind and rancid.

3.2.3 Volatile compounds identified in fermented pea and mixed emulsions

The volatile compounds extracted and identified in each type of emulsion before and after the fermentation of one type of microbial association (V10 for the PE and M7 for the ME) are presented in **Figure 24**. The differences between the volatile compounds identified clearly illustrate the impact of the fermentation on aroma profiles. In general, a significant increase of the number and percentage of VOCs was obtained after fermentation. Different compounds belonging to acids, alcohols, aldehydes, esters and ketones were detected in fermented V10 and M7 emulsions respectively. This is typically the case for 3-methyl butanal and 2-methyl butanal (**Figs 24C and 24D**) compared to controls. It is noteworthy that the amount of aldehydes identified as hexanal and heptanal, known to give together green off-flavors, and initially present in non-fermented samples strongly decreased following fermentation. Some compounds appeared during the process of fermentation according to the type of emulsion (e.g. 1-butanol 3-methyl in the ME and e.g. propanal 2-methyl and 2 butanone in the PE) whereas others disappeared in the fermented ME emulsion such as octane and 1-hexanol. The fermented M7 emulsion was characterized by the accumulation of numerous esters, ethyl acetate being produced in larger amount (**Fig 24D**). The fermented V10 emulsion (**Fig 24C**) was characterized by an increase of dimethyl disulfide.

A)B)

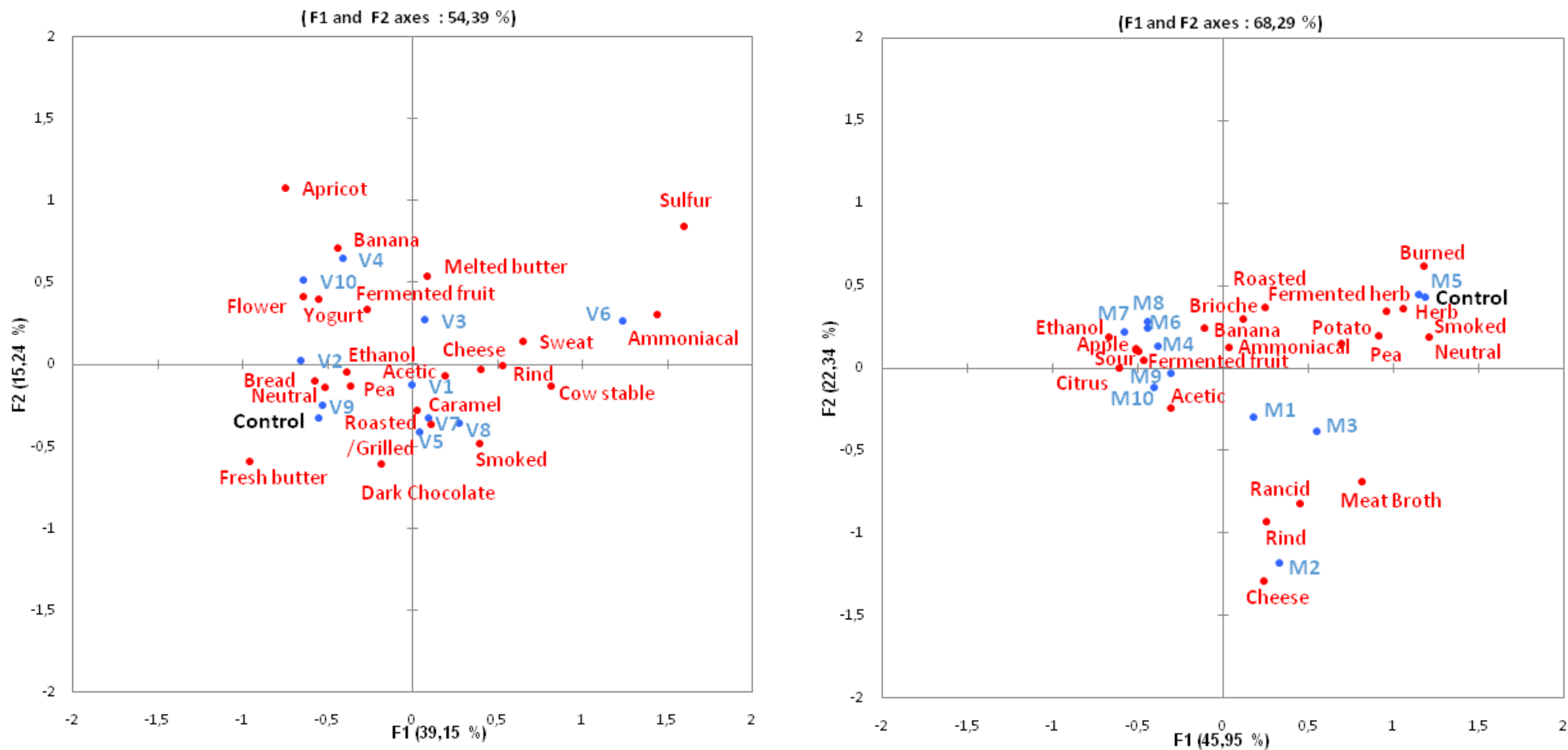


Figure 23. Representation of the ten different fermented emulsions and one control non-fermented emulsion and aroma descriptors describing the samples in the first two dimensions of CFA (Correspondence Factorial Analyses) of data from Call All That Apply CATA. A: Pea Emulsion (PE: 100% pea proteins). B: Mixed Emulsion (ME/ 50% pea proteins/50% milk proteins). Blue: samples (V1---V10) (M1---M10). Red: aroma descriptors, Black: control samples (emulsions not fermented).

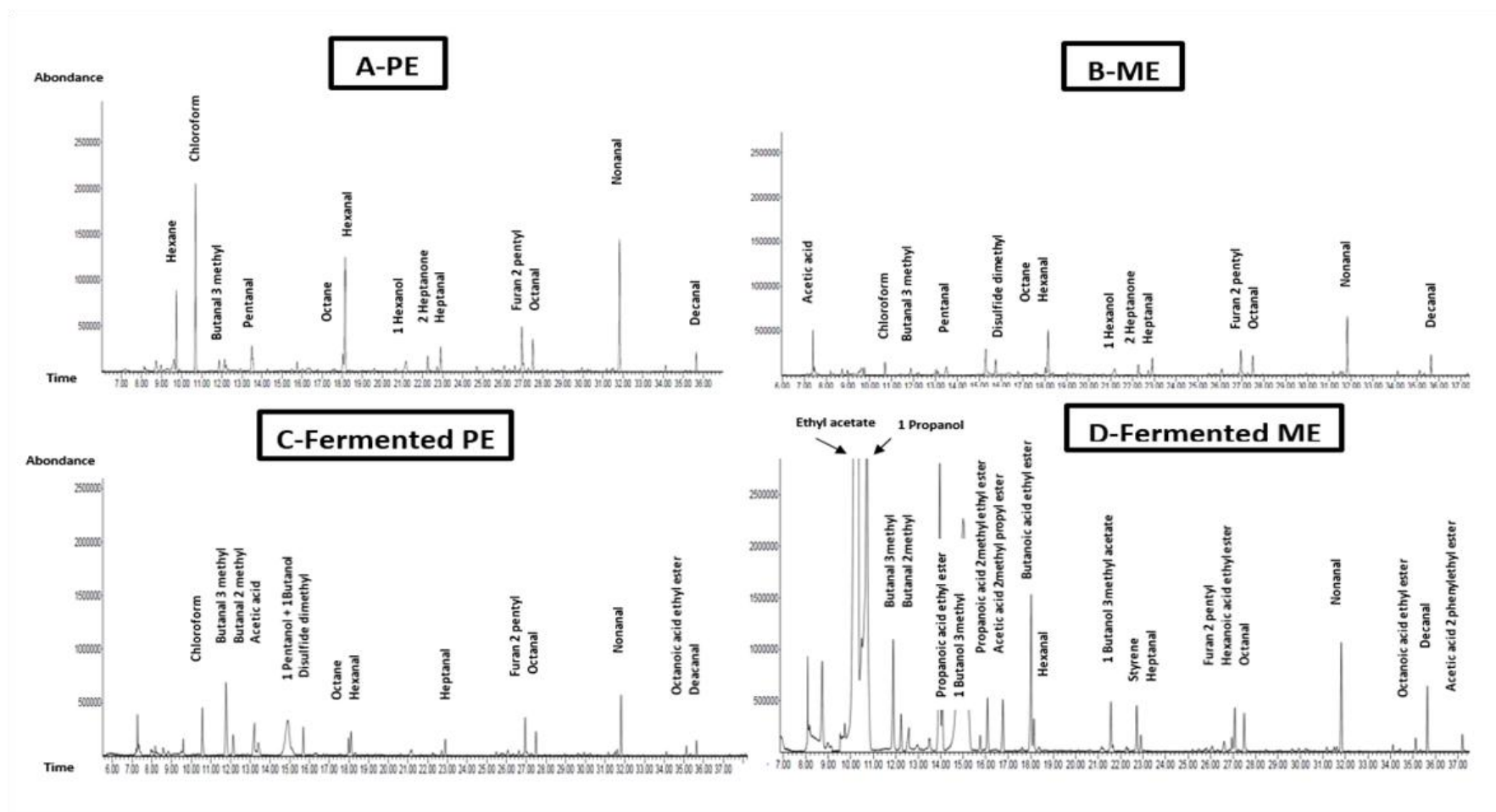


Figure 24. Volatile compounds identified by GC-MS of the emulsions after and before fermentation (A: Pea Emulsion (PE) before fermentation; B: Mixed Emulsion (ME) before fermentation; C: Fermented pea emulsion (V10); D: Fermented mixed (milk and pea proteins) emulsion (M7).

4. Discussions

To our knowledge, the present work is the first study investigating the feasibility of using allochthonous microorganisms (bacteria and fungi) isolated from dairy products and vegetables, by combining them into new promising microbial consortia, not yet found in food systems. These new starter generations have been designed for their ability to colonize and to ferment pea-based products, harboring different chemical composition, namely i) salt, vegetal oil, lactose, pea and milk proteins for mixed emulsion (ME) and ii) salt, vegetal oil and pea proteins for pea emulsion (PE). The presence of carbohydrates in the ME, markedly influenced the fermentation performance of the tested micro-organisms, by strongly reducing the pH value of medium through lactic acid fermentation, whereas the absence of carbohydrates in the PE promoted alkaline fermentation.

The alkalisation of the PE observed in this study, was already reported by authors during fermentation of various legumes with high protein contents . Many seeds and legume proteins such as soy, lupin and pea, produced in Africa or Asia are fermented by alkalizing bacteria, principally assigned to *Bacillus* genus. Species of *Bacillus* mostly occurring in legume-based fermented foods - namely Doenjang, Douchi, Natto, Meju -, are *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus subtilis (natto)*, and *Bacillus thuringiensis* (Tamang *et al.*, 2016b, Kim *et al.*, 2004). Although these species were isolated from naturally fermented legume products (Chettri and Tamang, 2015b; Wang *et al.*, 2006), *B. subtilis* is the dominant functional bacterium in Asian fermented soybean foods (Tamang *et al.*, 2016b). It is noteworthy that the strong adaptation of this genus to this type of habitat was confirmed, in our study, by the omnipresence and growth of endogenous communities predominantly composed of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*, on the pea emulsion uninoculated.. An increase of pH in the most of (PE) pea emulsions was reported after the fermentation step. These results suggest that the alkalisation phenomenon is due to a strong proteolysis of pea proteins, only energy source mainly by *Bacillus* species but also by selected microbial consortia, leading to the production of peptides and amino acids, which can be transformed into alcohols, ammonia or aldehydes by decarboxylation and/or deamination, known to be responsible for alkalisation (Chen *et al.*, 2012, Shrestha *et al.*, 2013).

The majority of the eukaryotes tested, *Rhizopus*, *Mucor* and *Geotricum* in particular, were able to grow in PE. These results are in accordance with the ones of Jung *et al.*, (2014), Nout and Kiers, (2005) and Tamang *et al.*, (2016b) which showed that these genera primarily represented the fungal communities in the tempeh, an Indonesian cake made with soybeans and the traditional Korean fermented soybean.. Moreover, in our study, most of bacteria assigned to *Actinobacteria* and

Proteobacteria group, in particular *Hafnia alvei*, *Acinetobacter johnsonii* and *Glutamicibacter arilaitensis*, were found when combined into consortia of 3 to 9 strains on the pea proteins, to exhibit a strong growth and to compete against endogenous bacilli.

One originality of the current study, is that fermentation of pea emulsions (PE) was performed without carbohydrates addition. The LAB species like *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* and, particularly, *Lactobacillus plantarum*, showed an ability for growth in pea-based products, which indicated that pea proteins are suitable habitats for such bacteria. Similar results were reported by Schindler *et al.*, (2012), who showed that *Lactobacillus plantarum*, frequently isolated from plants and leaves, is able to colonize pea proteins and contribute to improve the flavor by either reducing off-flavors formation or by masking undesirable green notes. *L. plantarum* has been shown to have good technological properties such as probiotic properties (Stefanovic *et al.*, 2017), the ability to reduce undesired oligosaccharides, the number of undesired contaminations (Demarigny, 2012) and the allergenicity of pea proteins (Barkholt *et al.*, 1998). Many species of LAB have antimicrobial activities due to the production of antimicrobial compounds such as bacteriocins like nisin (Tamang *et al.*, 2016a). Such compounds may be responsible for the antimicrobial activity in the associations when the LAB were inoculated (V4 and V10), resulting in a dramatic diminution of the percentage of the endogenous flora in these fermented products.

In the literature, the controlled and non spontaneous fermentation of legume proteins is usually conducted by the acidification process through the addition of LAB and carbohydrates (Drake *et al.*, 2000b; Fritsch *et al.*, 2015; Meinschmidt *et al.*, 2016c; Youssef *et al.*, 2016) to stimulate the growth of LAB and improve the sanitary properties assessed (Ravyts *et al.*, 2012). The pH decrease is due to the accumulation of organic acids, in particular lactic and acetic acids through the consumption of lactose by LAB such as *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus cerevisiae*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus citrovorum*, *Bifidobacterium bifidus* (Steinkraus K.H, 2002). In the same way, our study highlighted that the addition of ingredients such as powdered milk, with lactose and the G2 Lactic acid bacteria group in the (ME) fermented pea emulsion was a decisive factor : five species of LAB (i.e. *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc lactis*) were selected out of the nine species tested, thanks to their strong growth and acidification capacities on ME. The lactic acid fermentation led to an inhibition of other acido-sensitive inoculated species, most of them belonging to *Actinobacteria* and *Proteobacteria* groups (e.g. *Brevibacterium casei*, *Corynebacterium casei*, *Staphylococcus lentus*) but also of *Bacillus spp.*, endogenous contaminants of emulsions (e.g. *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*).

During fermentation, microorganisms produce enzymes to break down food nutrients (e.g. proteins, carbohydrates, lipids, organic acids, amino acids,) generating new compounds which can be precursors of nonvolatile and volatile flavor compounds, affecting not only taste but also aroma, and thus, food acceptance. The extent and chronology of substrates utilization depends on the food products variety and used microorganisms. The enzymatic degradation of proteins is particularly an important process in fermentation of food containing high protein content, generating various peptides, free amino acids and α -keto-acids through the respective action of proteases, amino carboxypeptidases and decarboxylases and thus contributing to the final organoleptic properties (e.g. aroma, texture) of the fermented products (Visessanguan *et al.*, 2005, Curioni *et al.*, 2002). Protein content of pea varieties is composed of albumin and globulin representing 15–25% and 50–60% of the total protein, respectively with a vicilin: legumin ratio between 0.6 and 3.7 for the globulins issued from smooth cultivars (Gueguen and Barbot, 1988). Compared to the globulins, pea albumins contain more of the essential amino acids tryptophan, lysine, threonine, cysteine and methionine while the globulin proteins are rich in arginine, phenylalanine, leucine and isoleucine (Swanson, 1990).

The analysis of aroma and volatile compounds showed that the diversity and abundance of the aroma profile increased after fermentation according the type of emulsions. The production of fruity and flower notes in the V4 and V10 consortia may be generated by the yeast *Geotrichum candidum*, the bacteria *Lactobacillus plantarum* and *Hafnia alvei* which are the major species on the pea fermented emulsions and known to possess a strong proteolysis and deamination activity (Boutrou *et al.*, 2005; Irlinger *et al.*, 2012; Peralta *et al.*, 2016;). The fruity aromatic notes in the ME (M6, M7 and M8) are supposed to be generated by the growth of *Kluyveromyces* and *Geotrichum*, able to produce alcohol and esters by respectively catabolising lactose and amino acids (Satyanarayana and Kunze, 2009). The sulfur notes perceived in the V6 consortium is obviously due to the growth of *Hafnia alvei* the dominant bacterial species, but also to the presence of contaminant assigned to *Bacillus subtilis*, no yeast strains having been inoculated into this emulsion. This result is in agreement with the result obtained by (Irlinger *et al.*, 2012) who observed a dramatic increase in volatile sulfur compounds production in model-cheese inoculated with *H. alvei*. Such compounds, like dimethyl disulfide, strongly participate to the aroma profile of cheese from the degradation of sulfur amino acids. The presences of roasted/grilled notes in the fermented emulsions (PE/ME) might be associated with the proteolysis of vicilin in pea proteins by the action of diverse micro-organisms (lactic acid bacteria and yeasts). It has been shown that the hydrophobic free amino acids and hydrophilic peptides are responsible for the formation of the cocoa-specific aroma components after the roasting process (Crafack *et al.*, 2014). These components are generated from

the cocoa vicilin by the cooperative action of an aspartic endoprotease and a carboxypeptidase issued from microbial activities but also naturally present in ungerminated cocoa seeds (Voigt *et al.*, 1994; Ho *et al.*, 2014). In our study, the different microbial consortia designed tended to be associated with positive descriptors such as fruity and/or cheesy for the ME, and such as fruity or roasted for PE. These descriptors are different from the ones of control samples (pea, bread, and herb). This result is in accordance with the study of Youssef *et al.*, (2016) who showed that LAB starters inoculated in the pea products (40g pea protein/100g total protein, 66.5%g lactose) tended to have higher intensities of positive descriptors such as creamy, dairy and sweet, and lower intensities of negative descriptors such as vegetal, earth and vinegar.

Thanks to GC-MS analyses, volatile profiles of control and fermented emulsions were compared after 3 days of fermentation. Two microbial consortia (V10 for PE and M7 for ME) were selected according to their fast growth, their high cell density and various aromatic sensory attributes. The control emulsions were mainly characterized by the presence of aldehydes, such as hexanal, heptanal and pentanal, responsible for undesirable green-beany flavors (Curioni and Bosset, 2002; Azarnia *et al.*, 2011). The concentration of these aldehydes, which originates from enzymatic or auto-oxidation of fatty acid - mainly linoleic and linolenic acids - present in peas (Murat *et al.*, 2013), was strongly reduced by fermentation in PE and ME emulsions. Inversely, other aldehydes were found to be higher in fermented ME and PE emulsions with respect to control emulsions. This is typically the case for 3-methyl butanal and 2-methyl butanal - branched-chain aldehydes respectively deriving from the metabolism of branched amino acids (leucine and isoleucine) and giving an important contribution to aroma profile, such as - malty, nutty, caramel notes (Smit *et al.*, 2005; Curioni and Bosset, 2002)). In the fermented V10 emulsion, dimethyl disulfide increased, probably produced by *G. candidum* known to generate volatile sulfur compounds through methionine catabolism (Arfi *et al.*, 2002) - the latter being strongly dominant in V10. The fermentation of M7 emulsion revealed the accumulation of numerous esters, ethyl acetate being produced in higher amounts, most probably due to the growth of the yeast *K. lactis* known to be an excellent ester producer via the lactose degradation (Arfi *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004). Esters are well known to contribute to typical fruity notes in fermented products (Liu *et al.*, 2004)

In conclusion, the results of this first exploratory study highlight an innovative way in which pea proteins could be used in new fermented foods. Indeed, fermentation with selected starter cultures could improve the organoleptic characteristics of foodstuff containing pea proteins. Furthermore, the addition of milk in these emulsions made from pea could lead to generate innovative aromatic profiles.

Several consortia designed and composed of diverse microbial species (lactic acid bacteria, staphylococci, yeasts...) were efficiently found to be active in the fermentation of pea proteins. It is to be considered that the inoculation rate, substrate type (pea/milk/lactose), pH and the composition of the microbial consortia may affect metabolic responses of strains, leading to different metabolite generation and consequently to various aromatic profile for each given product. Further research is needed to determine how these species interact between them and affect the process and final quality of fermented pea. Our findings also demonstrate the need for more research to better understand the biochemical reactions that occur during fermentation, especially those that affect pH and the production of amino acids that provide the aroma precursors.

5. Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the Carnot Qualiment Institute for its financial support. The authors also thank Anne Sophie Sarthou, Roshan Raouf (Université de Technologie de Compiègne, Compiègne, France) and David Forest for their technical support but also Maxime Ferrier (IUT Génie Biologique option bioinformatique, Aurillac, France) for bioinformatics analysis. S. Ben-Harb thankfully acknowledges the Tunisian Ministry of Higher Education for the PhD fellowship that helped fund this research.

II.3. Etude du fonctionnement de communautés microbiennes synthétiques aptes à fermenter des gels avec composition différente

II.3.1. Résumé

Les travaux des deux premières parties ont permis de (i) concevoir et développer des gels protéiques enrichis en protéines de pois en utilisant différents types de coagulation, (ii) sélectionner des consortia microbiens pour différentes émulsions présentant des propriétés sensorielles intéressantes en mettant en oeuvre le consortium VEGAN pour la matrice 100% pois ou le consortium MEGAN pour la matrice mixte.

Cette troisième partie du travail avait pour objectif d'étudier le potentiel d'adaptation de communautés microbiennes sélectionnées sur 3 types de matrices gélifiées. Une matrice supplémentaire a été ajoutée présentant la même composition en protéines et en matière grasse qui est la matrice 100% protéines de lait, associé à un troisième consortium microbien (ExEco : un modèle microbien pour le fromage Munster). Dans cette partie, les différents consortia microbiens ont été testés dans les 3 types de matrices (pois, mixte et lait). La coagulation acide a été choisie pour former tous les types de gels. Une optimisation au préalable a été réalisée pour former des gels acides à 10% de protéines. Le pH, la croissance et l'abondance des micro-organismes fermentant les gels ont été caractérisés et comparés à différents temps de fermentation (0, 3 et 7 jours). Le potentiel aromatique de ces cocktails sur les gels, après fermentation, a été caractérisé selon leur odeur par un panel sensoriel à l'aide de la méthode Check-All-That-Apply (CATA) et par GC-MS pour identifier les molécules d'intérêt. Dans cet article, sont présentés les résultats associés aux produits fermentés après 7 jours.

Les résultats de cette étude montrent que le potentiel d'adaptation des différents consortia et les propriétés sensorielles associées dépendent principalement de la composition de la matrice, en particulier du type de protéines (pois ou/et lait). Le consortium VEGAN semble bien adapté pour la matrice 100% pois puisqu'il s'y implante mieux que dans les matrices mixte et lait. Les notes aromatiques dans cette matrice 100% pois sont principalement les perceptions des familles des notes grillées/torréfiées, alors que les notes aromatiques des matrices mixte et 100% lait sont plutôt caractérisées par des notes laitières. Le consortium MEGAN s'implante très bien dans la matrice mixte et lait, tout comme dans la matrice pois, mais n'a pas permis le développement des notes sensorielles masquant les notes vertes indésirables de la matrice initiale pois. En revanche, il a permis de développer des notes aromatiques dans la matrice mixte de type « piquant », « croûte », « aigre » et des notes plutôt fromagères et fruitées dans la matrice lait. Le consortium ExEco, consortium modèle du fromage, s'est révélé ne pas être adapté à se développer dans les matrices

gélifiées à base de pois puisque la plupart des micro-organismes ne s'implantent pas dans ces matrices. Deplus, il ne permet pas de masquer les notes vertes du pois.

Ainsi, cette étude a permis de sélectionner un consortium microbien pour chaque type de gel générant des notes sensorielles d'intérêt.

II.3.2. Publication

Publication n°3 à soumettre à Food Microbiology, 2017

Versatility of microbial consortia and sensorial properties induced by the composition of different milk and pea-proteins-based gels: towards new (milk and pea) fermented foods

S. Ben-Harb, F. Irlinger, A. Saint-Eve, M. Panouillé, I. Souchon, P. Bonnarme

UMR GMPA, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78850, Thiverval-Grignon, France

Abstract

To develop novel protein foods based on plant proteins, fermentation could be a solution to improve the organoleptic characteristics of foodstuff containing pea proteins. In the present study, three microbial consortia were investigated for their ability (i) to grow in three gels containing respectively 100 % of pea proteins without carbohydrates, 50% of pea proteins - 50% milk proteins and 100% of milk proteins with lactose, and (ii) to reduce off-flavors and increase aroma interest. The VEGAN consortium seems well suited for the pea gel since it better implants than in the mixed and milk gel, with the exception of Lactic Acid Bacteria that were able to grow better in the presence of lactose. However, the aromatic notes in the pea gel are roasted/grilled while the aromatic notes in the milk and mixed gel are rather dairy. The MEGAN consortium is very well adapted in the milk based gels as in the pea gel but does not mask the green notes of the pea, generate aromatic notes little appreciated in the mixed gel like "pea" and «woody», and generate an interesting notes in the milk gel like fruity and cheesy. The ExEco consortium is not suitable for pea gel fermentation since it does not make it possible to hide the green notes. However, interesting notes were perceived in mixed and milk gels such as cheesy and fruity respectively. This procedure allowed the selection of suitable consortium for each type of gel, able to colonize and generate aroma of interest in a pea-based product. It could be applied in contexts such as elaboration of innovative food product.

Key words: pea protein, milk protein, volatile compounds, fermentation

1. Introduction

Foodborne micro-organisms are key to numerous biological processes, playing a major role in the properties of the fermented foods in terms of physico-chemical (e.g. aroma production, acidification, texture change) and sensory properties (Ravyts *et al.*, 2012). They are known to be influenced by a range of biotic and abiotic factors, such as pH conditions, biochemical characteristics of raw materials, and technological usages. Thus, milk used for dairy fermented products (e.g. yogurt, kefir, cheese) is known to have a heterogeneous physicochemical composition (lactose, casein, fat) and to change its characteristics during the fermentation process. These chemical and rheological evolutions, well described in literature, led to the simultaneous or sequential controlled growth of multiple microbial populations, including lactic acid bacteria, yeasts, filamentous fungi and cheese-ripening acid-sensitive bacteria through the utilization of different carbon sources, trophic relationships and environmental parameter changes (Monnet *et al.*, 2015; Mounier *et al.*, 2009)

Whereas our knowledge of species involved in the key functions of dairy fermentation processes is extensive, little knowledge has been acquired so far in the key functions, steps, and microbial actors of fermentation process of new legume based-foods. Pea protein isolate, composed of major pea storage proteins including legumin, vicilin and convicilin is considered to be a good alternative for the formulation of emerging healthy and sustainable food products (Sirtori *et al.*, 2012). In a similar context, a recent study highlighted ways in which pea proteins can be used in new food products by proposing different gelation techniques to create gels made from pea and milk proteins with interesting and innovative textural properties (Ben-Harb *et al.*, 2017). In addition, since these pea proteins may provide a wide range of nutrient sources for a variety of proteolytic micro-organisms, pea protein suspensions were mixed or not with milk and subjected to fermentation with mixed allochthonous microbial starters, consisting of lactic acid bacteria, proteobacteria, actinobacteria and yeasts. Stable and reproducible fermentation induced by these selected starters were shown to affect the content of aroma compounds, responsible for undesirable "green note" with consequences on perception (Schindler *et al.*, 2012).

The first step of gelification of pea protein is necessary to conduct a solid fermentation so that to develop an acceptable cheese-type fermented pea-based product. This treatment may have a great impact on the growth of microbial strains used as starters and, consequently, on food functionality. In gels or solid systems such as yogurt or cheese, the bacterial cells or yeasts become entrapped within the matrix. It can be hypothesized that slow nutrient and metabolite diffusion to and from cells may affect their fermentation performance. It involves effects on the food microstructure with possible consequences on microbial growth by modification of the

environmental factors such as temperature, a_w or pH (Jeanson *et al.*, 2015). New microbial formulation and texturing approaches of fermented vegetable products have to be encouraged to get new insights and to get improved control of fermentation processes, as it was done for other fermented foods (e.g. cheeses, sausages) with targeted hygiene, sensory, nutritional, and shelf life properties.

In the present work, we chose to study the impact of three previously and rationally designed microbial consortia, assembling five to nine dairy microbial strains in three well-characterized and controlled environments composed of i) milk (ExEco consortium), ii) pea proteins suspension (VEGAN consortium), and iii) a mix of pea proteins and milk suspension (MEGAN consortium), on the aromatic properties of fermented products. In previous works, the ExEco community was shown to be able to reproduce the complex metabolic pattern of cheese maturation (Bonaïti *et al.*, 2005; Dugat-Bony *et al.*, 2015; Mounier *et al.*, 2008).

The main objective of this study was to investigate the potential of adaptation and metabolic activity of the microbial consortia as function of the composition of the matrix (pea or/and milk proteins). The ability of growth for each strain and their functional properties (in particular perception and production of aroma compounds) were evaluated.

2. Materials and methods

2.1 Ingredients / raw materials

Pea protein isolate (PPI) (NUTRALYS® S85F) was provided by Roquette Frères (Lestrem, France). Skim milk powder (SMP) was purchased from Lactalis (Bourgbarré, France) and rapeseed oil (Fleur de Colza, Lesieur, France) was purchased from a local supermarket. Glucono-delta-lactone (GDL) was used for coagulation (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany).

2.2 Microbiological strains and growth conditions

The 15 strains composing the 3 model microbial communities (MEGAN, VEGAN and ExEco) are listed in **table S1 (Annexe3)**. They were *Corynebacterium casei* UCMA 3821 from Laboratoire des Micro-organismes d'Intérêt Laitier et Alimentaire (Caen, France); *Yarrowia lipolytica* CLIB183 from CIRM-Levures (INRA, Jouy-En-Josas, France); *Brevibacterium aurantiacum* ATCC 9174 and *Geotrichum candidum* ATCC 204307 both from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA); *Brevibacterium casei* CIP102111 and *Glutamicibacter arilaitensis* CIP 108037 (=Re117T) are from the Collection de l'Institut Pasteur (Paris, France), *Brevibacterium antiquum* CNRZ918, *Candida catenulata* Exrcom LD, *Staphylococcus equorum* Mu2, *Hafnia alvei* GB001, *Lactobacillus rhamnosus* CNRZ212, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* S3, *Leuconostoc lactis* NCW1, *Kluyveromyces lactis* 3550 and *Debaryomyces hansenii* 304 from the GMPA (Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires) private cultures collection (INRA, Thiverval-Grignon, France). All these strains were originally isolated from cheeses. The lactic acid bacteria S3 was grown for 24 h at 30°C under static conditions in M17 lactose (0.5%) broth (Biokar Diagnostics, Beauvais, France). All other bacteria were grown under aerobic conditions (using a rotary shaker at 150 rpm) at 25°C for 48 h in 50 mL conical flasks containing 10 mL of brain heart infusion broth (Biokar Diagnostics). The yeasts were grown under the same conditions, except that potato dextrose broth (Biokar Diagnostics) was used as the growth medium.

3. Preparation of gels

Three types of emulsions were prepared in the same conditions with 10% of proteins, containing (i) 100% pea proteins (Pea emulsion), (ii) a mixture of pea proteins and milk powder (50/50) (Mixed emulsion) and (iii) 100% milk powder (Milk emulsion). Pea and mixed emulsions were prepared using a previously described method ([Ben-Harb et al., 2018](#)) (publication n°2). Milk emulsions were prepared as other types of emulsions with minor modifications: one thermisation step (95°C/30min) was used for these type of emulsions. Three types of gels were formed by chemical coagulation using GDL (Glucono-Delta-Lactone). To obtain gels, suspensions were mixed with GDL (0.1 , 0.5 and 1.5% w/v for pea, mixed and milk emulsions respectively) and with each defined community (MEGAN, VEGAN and ExEco) with a cell density equivalent to 6.0 log cfu/g for

each bacteria and 4.0 log cfu/g for each fungus . The obtained mixtures were then incubated at 25°C for 24 h for coagulation and at 16°C for 2 and 6 days for fermentation (**Fig25**). Preparations of gels were carried out in triplicate.

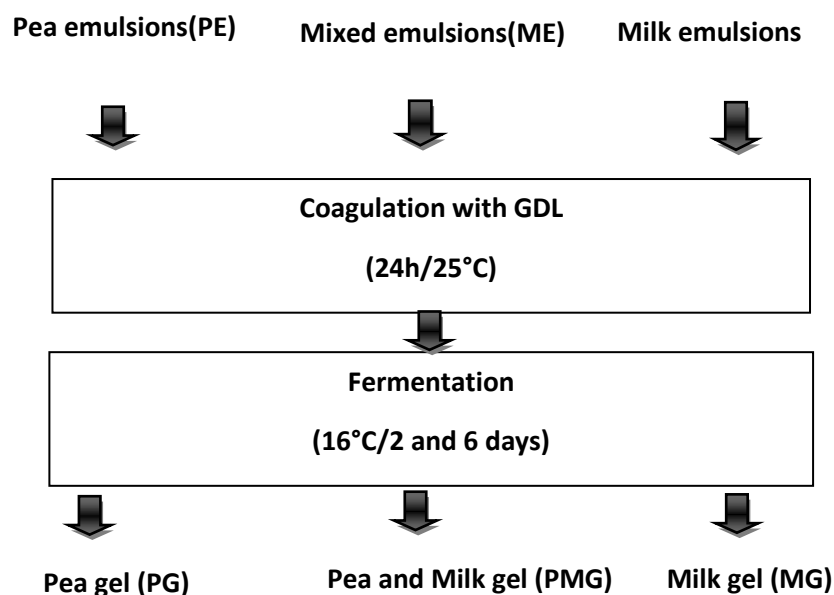


Figure 25. Preparation of fermented gels

2.3 Microbial analyses and determination of cell count

Samples were collected at days 0, 3 and 7. Day 0 corresponds to the control non fermented gel, before inoculation. Three independent gels corresponding to three biological replicates were analyzed at each time point. The gels were crushed and homogenized with sterile forks and knives. Serial dilutions were performed in NaCl 9 g/L from one gram of gels and plated in triplicate on agar plates. Three selective culture media were used: brain heart infusion (Biokar Diagnostics) with amphotericin (50 mg/L) for non lactic acid bacteria, deMan-Rogosa-Sharpe (pH 6.5, Biokar Diagnostics) with amphotericin (50 mg/L) for lactic acid bacteria and yeast extract-glucose-chloramphenicol (Biokar Diagnostics) with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (10mg/L) for yeasts. The different strains could be counted selectively on these media because each had a distinct morphotype.

The gel fermentations were carried out in triplicate from independent batches and data for pH and growth values were averaged. Distribution and growth were expressed as $\log N/N_0$ (N: growth of strains at three (D3) and seven (D7) of fermentation; N_0 : initial cell density).

2.4 Determination of pH

The pH values were the arithmetic means of 3 measurements by using a surface electrode Blue line 27 (Schott).

2.5 Sensory evaluation by Check-All-That-Apply (CATA) method

Sensory analysis was performed to characterize the sensory properties of fermented gels (from control and inoculated fermentations) after seven days of fermentation. All sensory analyses were carried out in an air-conditioned room (20°C), in individual booths, under white light. To evaluate the odor of samples, the method of (Ben-Harb *et al.*, 2018) (publication n°2) was followed with minor modifications. 25 panelists were asked to select the attributes that best described each sample, among a list of 41 attributes (**Table S2**) (**Annexe3**). The products were presented along a “Carré Latin” order. Thirteen products were evaluated per session. All gels were diluted (1/10) with Milli-Q water (Merck Millipore, Merck KGaA, Germany) at 4°C and then stirred for 30s using stomacher. They were presented in glass bottles labeled with randomly selected three-digit numbers. All samples were analyzed in triplicate (3 independent batches).

2.6 Extraction and identification of volatile flavour components from fermented gels

Volatile compounds of the different gels were extracted and identified using the GC-MS method followed by (Ben-Harb *et al.*, 2018) (publication n°2). Compounds were identified based on their linear retention indexes and mass spectra, using standard MS database (Wiley Registry of Mass Spectral Data). Volatile compounds were quantified based on their areas under the curve. Results were expressed on the total peak area (TPA) of each volatile compound which that allowed a quantitative comparison to be done.

2.7 Statistical analysis

Data analysis was performed using XLSTAT (Addinsoft, Paris, France, 2009) and Fizz Data Treatment (Biosystemes® 1999). Data sets were analyzed using analysis of variance (Anova) or Cochran test to compare the growth of strain in each microbial community for the different gels (Pea, Mixed and Milk). The products effects with both a threshold of 5% and the multiple pair comparisons (Newman-Keuls) for product were used to discriminate variables and products. CFA (Correspondence Factorial Analysis) of data from Check All That Apply (CATA) was performed. A multiple factor analysis (MFA) was also used to study the relationships between sensory, growth of the microbial starters and composition of volatile compounds of the samples. Each strain is associated of their microbial starter (exemple: *Lactobacillus rhamnosius* is present in VEGAN and MEGAN, in the map presentation, we find *Lactobacillus rhamnosius*-MEG and *Lactobacillus rhamnosius*-VEG). RV coefficient (multivariate generalization of the squared Pearson correlation

coefficient) was calculated between the first two axes of the samples partial configuration to analyse similarity between sample configurations.). A hierarchical ascendant cluster analysis (HCA) was carried out for grouping the trials according to their similarity, measured by Pearson correlation, whereas cluster aggregation was based on the average linkage method.

3. Results

3.1 Effect of the gels compositions on the growth of three microbial communities (ExEco, MEGAN, and VEGAN)

In the present study, three proteins-based gels (Pea gels (PG), Pea and Milk gels (PMG) and Milk gels (MG)) were fermented with three microbial communities (ExEco, VEGAN and MEGAN) (**Fig S1**) ([annexe3](#)). The populations reached on the different gels after three and seven days of fermentation are shown in **Table 20**. The initial pH of PG, PMG and MG was 6.71, 6.29 and 5.68 respectively. After fermentation, pH of PG gels remained fairly stable, while PMG and MG gels were characterized by acidic pH values. The initial cell density in the inoculated gels is 6.0 log cfu/g for each bacterium and 4.0 log cfu/g for each fungus.

3.1.1 Effect of the composition of gels on the growth of the VEGAN microbial community (Table 1A)

The fermentation by the VEGAN microbial community showed that the pH decreased or remained stable depending on tested gels (with or without milk) (**table 20A**). In general, the acidic gels containing milk (Mixed and Milk) showed the highest microbial cell counts, except for *Geotrichum candidum* and *Hafnia alvei*, which grew quite efficiently on PG compared to MG and PMG, and for *Yarrowia lipolytica*, growing essentially on PG, as cell counts in this condition were 2.7 log higher than in gels containing milk. *Brevibacterium casei* and *Brevibacterium antiquum*, initially inoculated in all gels, were not detected or weakly present after three and seven days of fermentation.

3.1.2 Effect of the composition of gels on the growth of the microbial community MEGAN (Table 1B)

The fermentation by the MEGAN microbial community, essentially exhibited the same pH profiles as for the VEGAN microbial community (**table 20B**). Regardless of the type of substrate used, the growth of MEGAN community was strong and stable in all gels, reaching cell counts of about 10^9 cfu/g for lactic acid bacteria and 10^7 - 10^8 CFU/g for yeasts after seven days of fermentation. It is noteworthy that, in milk, *Kluyveromyces lactis* showed the highest growth in MG (4.1 to 4.4 log₁₀ CFU/g) compared to PG (1.5 to 2.8 log₁₀ CFU/g) and PMG (2.2 to 2.8 log₁₀ CFU/g).

For bacteria that are likely to grow rapidly, such as lactic acid bacteria on both media containing lactose (milk and mixed gels), it is likely that the maximum population will be reached before the 3-day stage and the differences between the values observed for two strains on the same medium can result either from an actually higher growth, or conversely from a fall in the cultivable population during incubation.

The results also show the presence of interactions. Thus, the behavior of the *Lactobacillus rhamnosus* strain common to the VEGAN and MEGAN consortia differs significantly according to the consortium in which it is found.

3.1.3 Effect of the composition of gels on the growth of the microbial community ExEco (Table 1C)

The fermentation by the ExEco microbial community, initially designed for Livarot-type cheese manufacturing (Bonaïti *et al.*, 2005), obeyed the same pH profiles as for VEGAN or MEGAN microbial consortia, a strong decrease in pH being observed in MG and PMG (**table 20C**). In the most acidic gels - namely MG and PMG -, the highest microbial cell counts were reached, except for *Lactococcus lactis*, and *Hafnia alvei*, which developed the most on PG. *Glutamicibacter arilaitensis* and *Staphylococcus equorum*, known to be acid-sensitive bacteria, developed on PG (pH 6.5-7), with cell counts respectively 3.2 and 1.3 log higher than in PMG and MG (pH 4.5-4.7). *Corynebacterium casei* and *Brevibacterium aurantiacum* were not detected or weakly present in every type of gels.

Table 20. Distribution and growth (expressed as logN/N₀, N: growth of strains at three (D3) and seven (D7) of fermentation; N₀: initial cell density) of microbial species and pH values through the fermentation of pea gel (PG), pea and milk proteins (PMG) and milk gel (MG) by three microbial communities (VEGAN, MEGAN and ExEco) during three and seven days of fermentation

A: VEGAN consortium; B: MEGAN consortium, C: ExEco consortium

A	VEGAN			
		Pea	Mixed	Milk
pH	D0	6.71±0.10	6.29±0.14	5.68±0.53
	D3	6.39±0.04	5.19±0.17	5.00±0.02
	D7	6.80±0.06	4.79±0.01	5.46±0.04
Species log CFUs/g*				
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	D3	0.73 ^a	1.60 ^a	1.03 ^a
	D7	0.22 ^c	2.13 ^b	2.49 ^a
<i>Leuconostoc lactis</i>	D3	0.73 ^a	1.60 ^a	1.03 ^a
	D7	0.22 ^c	2.13 ^b	2.49 ^a
<i>Geotrichum candidum</i>	D3	3.03 ^a	3.08 ^a	2.08 ^b
	D7	4.07 ^a	3.40 ^a	3.58 ^b
<i>Candida catenulata</i>	D3	0.71 ^b	0.68 ^b	1.14 ^a
	D7	0.06 ^a	0.21 ^a	0.22 ^a
<i>Yarrowia lipolytica</i>	D3	0.95 ^a	0.57 ^a	0.35 ^a
	D7	2.75 ^a	0.00 ^b	0.00 ^b
<i>Brevibacterium antiquum</i>	D3	0.15 ^b	0.14 ^b	0.58 ^a
	D7	0.38 ^a	0.00 ^b	0.00 ^b
<i>Brevibacterium casei</i>	D3	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
	D7	0.07 ^a	0.07 ^a	0.31 ^a
<i>Hafnia alvei</i>	D3	2.99 ^a	2.61 ^b	2.21 ^c
	D7	3.34 ^b	2.90 ^c	3.46 ^a

B	MEGAN			
		Pea	Mixed	Milk
pH	D0	6.71±0.10	6.29±0.14	5.68±0.53
	D3	6.46±0.06	4.43±0.04	3.99±0.01
	D7	6.36±0.01	4.30±0.01	3.90±0.03
Species log CFUs/g*				
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	D3	2.04 ^c	2.99 ^a	2.29 ^b
	D7	2.08 ^c	3.58 ^a	2.70 ^b
<i>Lactococcus lactis</i>	D3	1.68 ^b	3.53 ^a	1.78 ^b
	D7	1.93 ^b	3.40 ^a	1.56 ^c
<i>Geotrichum candidum</i>	D3	2.45 ^{ab}	2.65 ^a	2.19 ^b
	D7	2.96 ^b	3.34 ^a	2.99 ^b
<i>Candida catenulata</i>	D3	0.61 ^b	1.90 ^a	1.17 ^{ab}
	D7	2.28 ^b	2.95 ^a	1.30 ^c
<i>Kluyveromyces lactis</i>	D3	1.48 ^c	2.16 ^b	4.12 ^a
	D7	2.82 ^b	2.80 ^b	4.39 ^a

C	ExEco			
	Species log CFUs/g	Pea	Mixed	Milk
pH	D0	6.71±0.10	6.29±0.14	5.68±0.53
	D3	6.52±0.09	4.55±0.01	4.52±0.01
	D7	6.98±0.21	4.65±0.03	4.70±0.01
Species log CFUs/g*				
<i>Lactococcus lactis</i>	D3	1.83 ^b	2.29 ^{ab}	2.52 ^a
	D7	3.50 ^a	2.65 ^c	2.92 ^b
<i>Debaryomyces hansenii</i>	D3	0.20 ^a	0.48 ^a	0.99 ^a
	D7	0.00 ^b	0.00 ^b	2.24 ^a
<i>Kluyveromyces lactis</i>	D3	0.00 ^c	1.77 ^a	1.08 ^b
	D7	0.00 ^b	2.50 ^a	1.54 ^{ab}
<i>Geotrichum candidum</i>	D3	1.89 ^a	2.07 ^a	1.32 ^b
	D7	2.74 ^b	3.19 ^a	2.93 ^b
<i>Brevibacterium aurantiacum</i>	D3	0.04 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
	D7	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
<i>Staphylococcus equorum</i>	D3	0.90 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
	D7	1.25 ^a	0.00 ^b	0.00 ^b
<i>Corynebacterium casei</i>	D3	0.00 ^a	0.00 ^a	0.03 ^a
	D7	0.03 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
<i>Hafnia alvei</i>	D3	2.89 ^a	1.12 ^c	2.01 ^b
	D7	3.44 ^a	1.39 ^c	2.06 ^b
<i>Glutamicibacter arilaitensis</i>	D3	0.68 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
	D7	3.2 ^a	0.00 ^b	0.04 ^b

a-c, Mean values, referring to growth, within a row with different superscript letters are significantly different ($\alpha \leq 0.05$)

Green: (N/N0>1); Orange (0,5<N/N0<1), Red (N/N0<0,5)

* Growth difference in log CFU g⁻¹ between the initial value (t0) and the value reached after three days (D3) or seven days (D7)

3.2 Effect of the composition of gels on the sensory properties after fermentation

The sensory profile of the gels fermented by the different microbial communities MEGAN, VEGAN and ExEco after seven days and the control non-inoculated gels are shown in **Figure 26**. Correlation maps of Correspondence Factorial Analysis (CFA) were with the significant sensory descriptors performed identified by Cochran test ($P < 0.05$). A hierarchical ascendant cluster analysis (HCA) was carried out for grouping the gels according to their similarity.

3.2.1 Sensory properties of gels after fermentation by the microbial community VEGAN (Fig26A)

Sensory properties characterizing the different gels fermented by the VEGAN community and control gels (non inoculated) are shown in a sensory map in **Figure 26A**. The first two principalaxis (F1 and F2) explained 77.9% of the variance. Gels were well discriminated by the panel according to their olfactory perception. The axis F1 explains differences between gels according to the presence or not of pea proteins within gels. It separated fairly well fermented pea, Mixed control and Pea control from Milk control and fermented Milk, with the exception of mixed gel fermented by VEGAN, perceived to be closer to Milk gel than to Pea gel. The odor notes, such as cut herb and pea were loaded on the negative side of axis1 and described pea-based controls and pea fermented by VEGAN. On the positive side of axis1, milk-based gels fermented by VEGAN were characterized respectively by yogurt, fresh milk, cream and honey odors. As the MG, MPG and PG gels were fermented by the same community (VEGAN), the proximity of Mixed and Milk gels indicates close similarity in terms of sensory properties. Conversely, the Pea gel is clearly separated from them but also from the control gels. This delineation is along axis 2 on which garlic/onion, pea and coffee is loaded on the positive dimension (PG) while dried fruit and cut herb odour (Pea control), is loaded on the negative dimension.

3.2.2. Sensory properties of gels after fermentation by the microbial community MEGAN (Fig26B)

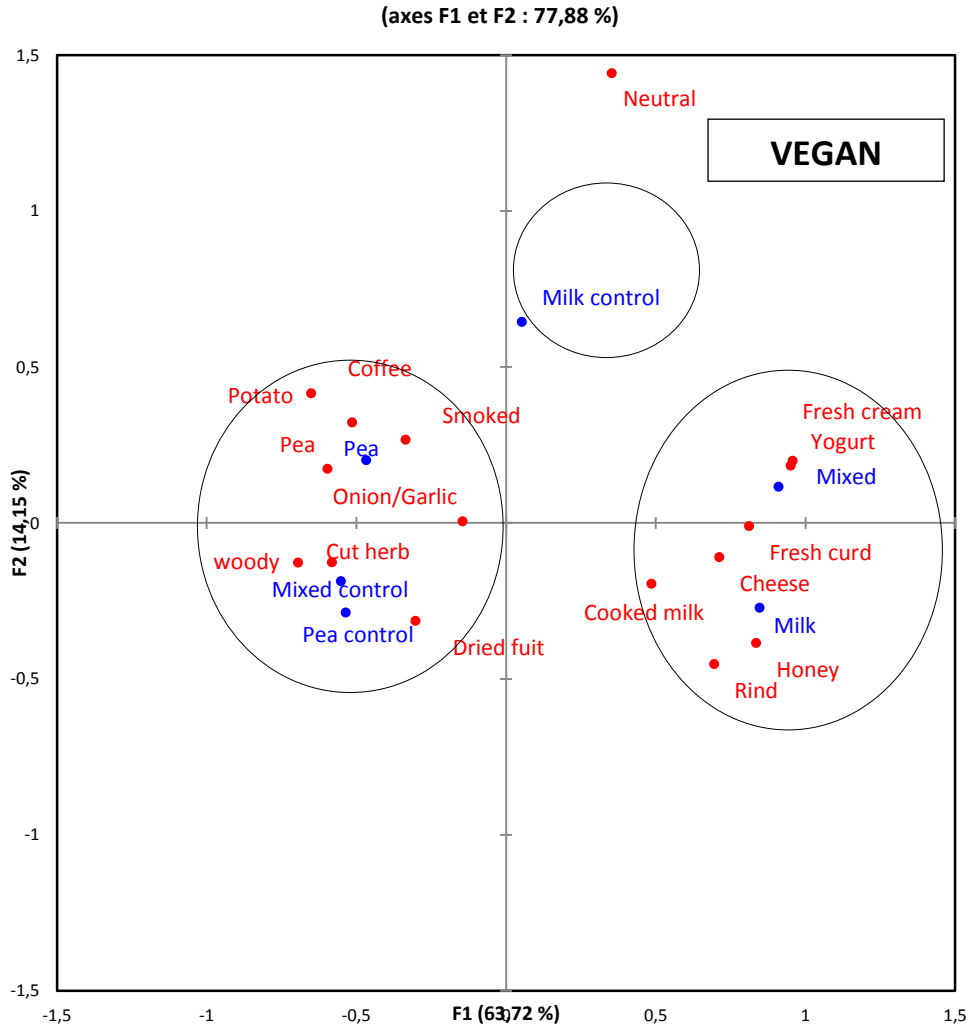
The sensory map of MEGAN gels (**Fig26B**) explained 82.2% of the information in axis 1 and 2. Closely related to one another along axis F1, the fermented pea gel was characterized by similar odour attributes as the control non inoculated pea and mixed gels, confirming results obtained by HCA and showing the highest scores for pea, woody, fried fruit and cut herb notes. Conversely, the other gels fermented by MEGAN (milk and mixed gels) were both significantly clustered with distinctive aromatic profiles. The Milk fermented gel, loaded positively on the F1 and F2 axis, was

characterized by sensory attributes close to fermented fruit and cheese notes after seven days of fermentation. Besides, the mixed fermented gel, loaded negatively on the F2 axis, was characterized by notes of sour, melted butter and yogurt odour perception.

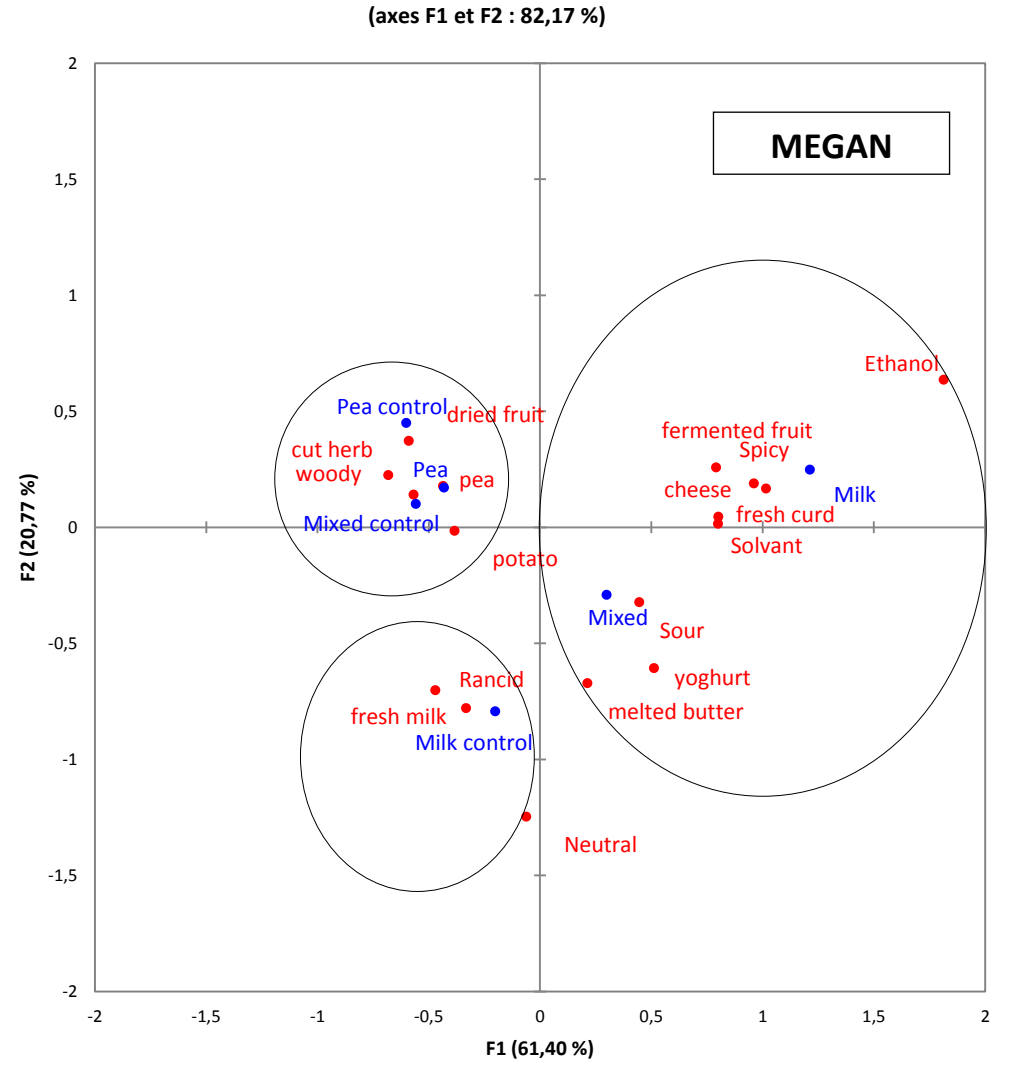
3.2.3 Sensory properties of gels after fermentation by the microbial community ExEco (Fig26C);

The sensory map of ExEco gels (**Fig26C**) explained 76.2% of the information on the first two dimensions. The gels fermented by the ExEco community were clustered in three groups characterized by different aromatic profiles. The first one was composed of uninoculated both pea-based controls and fermented pea gel characterized by pea, cut herb and roasted/grilled notes. The second group included both fermented mixed and milk gels, characterized by fruity and cheesy notes. The last group presenting by uninoculated milk gel control was characterized by a fresh milk note.

A



B



C

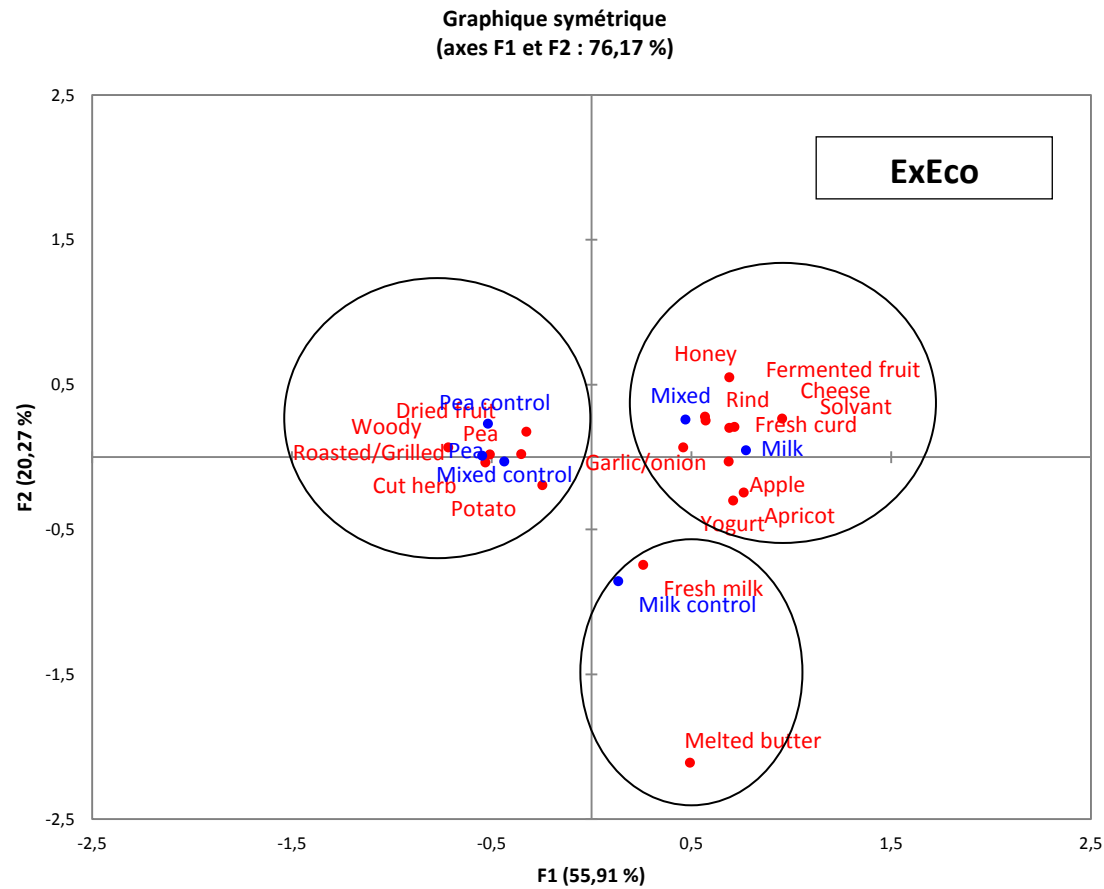


Figure 26. Representation of the different fermented (after seven days of fermentation) and non-fermented gels and descriptors describing the samples in the first two dimensions of CFA (Correspondence Factorial Analysis) of data from Call All That Apply CATA. A hierarchical ascendant cluster analysis (HCA) was carried out for grouping the trials according to their similarity, measured by pearson correlation, whereas cluster aggregation was based on the average linkage method (black circles) (black circles). A: Fermented gels with VEGAN consortium, B: Fermented gels with MEGAN consortium, C: Fermented gels with ExEco consortium. Red: significant descriptors cited by the panel, Blue: samples.

3.3 Effect of the composition of gels on the volatile compounds produced after fermentation

Identification, quantification and comparison of volatile compounds produced before and after fermentation (during seven days), in the PG, PMG and MG gels, fermented by three microbial communities (VEGAN, MEGAN and ExEco) were carried out. These compounds were subsequently classified into chemical families: alcohols, aldehydes, aromatic hydrocarbons, alkanes, alkenes, ketones, sulphur compounds and esters. Aldehydes were classified in two groups to differentiate aldehydes responsible for green notes (aldehydes green) and other aldehydes (aldehydes other) responsible for malted, grilled and roasted notes. Figure 3 lists the overall distribution of these compounds, their area values depending on the type of gel and the microbial community used, showing significant differences. As presented in **fig27A**, the total peak area (TPA) of volatile compounds detected in control pea, mixed and milk gels was $1.36E+08$, $1.67E+08$ and $8.27E+07$, respectively. All non-fermented gel samples were mainly associated with aliphatic "green" aldehydes (hexanal, nonanal and octanal), compounds arising from lipid oxidation (**Table S3**).

3.3.1 Effect of the composition of gels on the volatile compounds production after fermentation with the microbial community VEGAN (Fig27B)

Regarding in the main volatile compounds produced in three different gels (pea, milk and mixed) by the VEGAN community, the highest relative abundance of volatile compounds was found in both MG and PMG (**Figure 27B**), both reaching $2.5 \cdot 10^8$ while the fermented PG stayed at a comparable level to the control PG. However, some changes in the distribution of volatile compounds detected were observed for the fermented pea gel (**Table S3**). After seven days of fermentation, a decrease in the TAP of aldehydes_green was observed while the amount of alcohols (2-methyl-1-butanol) and aldehydes_other (3-methyl butanal, 2-methyl butanal and 2-methylpropanal) increased. In the gels composed of milk (PMG and MG), 27 and 38 volatile compounds were detected respectively, both characterized after fermentation, by a slight decrease of aldehyde_greens, an increase of aldehyde_others and a strong production of ketones with the occurrence of butane-2,3-dione and 6-methylhept-5-en-2-one.

3.3.2 Effect of the composition of gels on the volatile compounds production after fermentation with the microbial community MEGAN (Fig27C)

When using the MEGAN community for the fermentation of the three gels (pea, milk and mixed), the highest abundance of volatile compounds was found in MG (**Figure 27C**), reaching $8.0 \cdot 10^8$, while the PG and PMG reached respectively $1.8 \cdot 10^8$ and $2.4 \cdot 10^8$. Significant changes in the

composition of volatile compounds were observed in PG, PMG and MG when fermented by the MEGAN community, esters being abundantly produced on MG (**Table S3**). In PG, a significant decrease in the TAP of aldehydes_green is observed, while an increase in aldehydes_other such as (2E,4E)-hepta-2,4-dienal, 3-methylbutanal and 2-methylpropanal is observed compared to the non-fermented control, as well as for aromatic hydrocarbons (2-pentylfuran and styrene), alkanes (undecane) and ketones (3-methylbutan-2-one). In the mixed gel, fermentation led to a significant production of esters (ethyl acetate), ketones (butane-2,3-dione) and alcohols (2-methylpropan-1-ol, and 3-methylbutan-1-ol). In fermented milk gel, an important amount of esters, mainly ethyl acetate, acetaldehyde and alcohols (ethanol, 2-methylpropan-1-ol, 3-methylbutan-1-ol) but also ketones (heptan-2-one, nonan-3-one, and butane-2,3-dione) and aromatic hydrocarbons (benzene, toluene, benzaldehyde, styrene and 2-ethylfuran) were detected.

3.3.3 Effect of the composition of gels on the volatile compounds production after fermentation with the microbial community ExEco (Fig 27D)

Regarding the main volatile compounds produced by the same ExEco community in three different gels, their abundance remained about stable in the set of gels after 7 days of fermentation (**Figure 27C**). Unlike the VEGAN and MEGAN communities, able to produce a strong amount of specific ketones depending on the type of fermented gel, the ExEco community did not produce this family of volatile compounds, favoring the production of alcohol in the pea gel, aldehydes such as acetaldehyde in the mixed gel, alkanes such as pentane in the milk gel and ester in the gels with milk

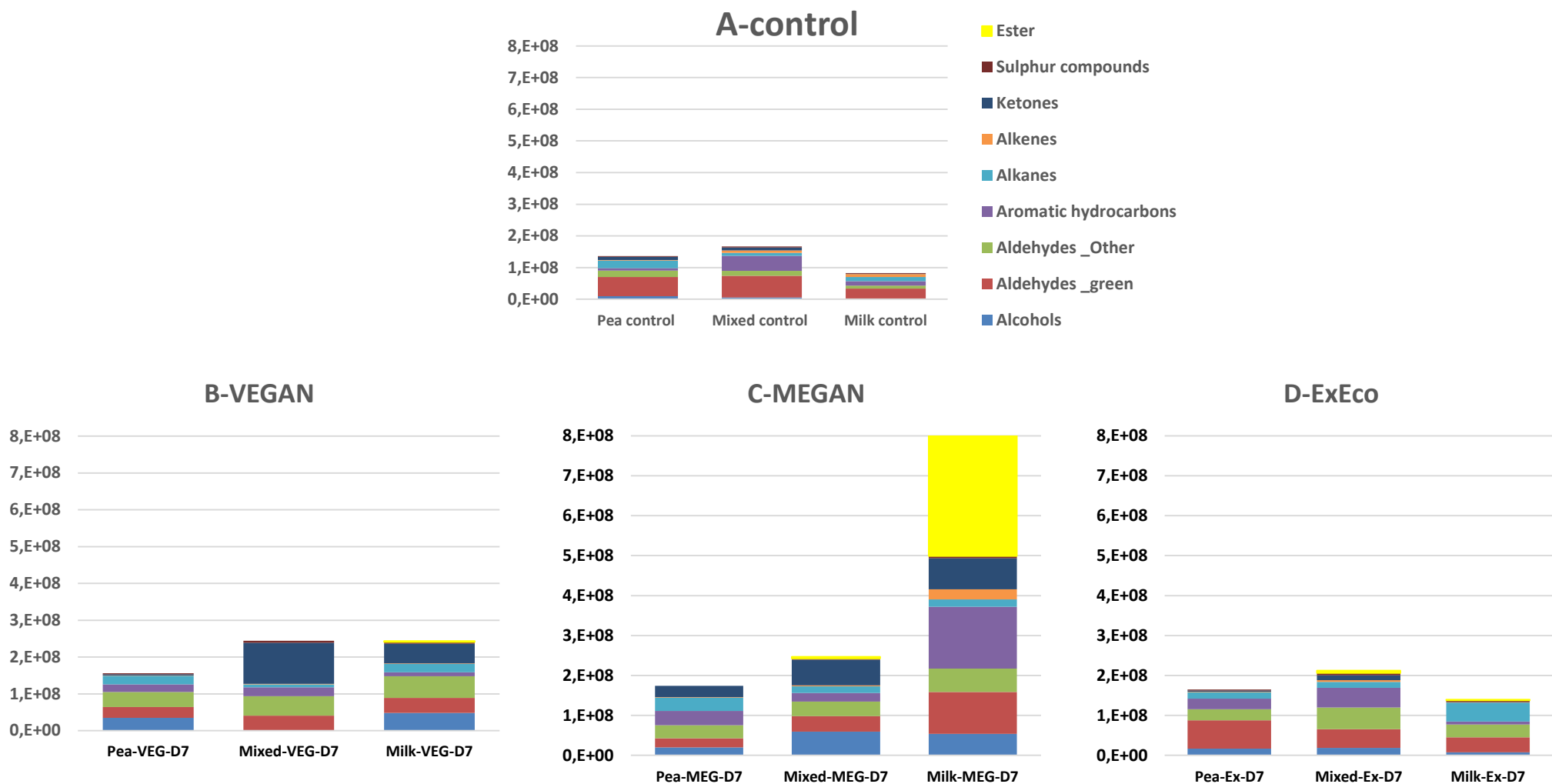


Figure 27. Total Area Peak (TAP) of the different aromatic compounds that composed control samples (no-fermented samples), Pea Gel (PG), Pea and Milk Gel (PMG) and Milk Gel (MG) fermented by microbial starters. A: control samples. B: VEGAN consortium; C: MEGAN consortium; D: ExEco consortium

4. Discussion

In the present paper, we performed a comparative study of different gels (PG, MPG and MG) fermented by different microbial starters (VEGAN, MEGAN and ExEco) by sensory evaluation, as well as identification of aromatic profile. We investigated possible relationships between the production of aromatic compounds, sensory characteristics and growth of microbial communities. A correlation map from Multiple Factorial Analysis (MFA) with the sensory attributes, microbial communities and aroma compounds produced after seven days of fermentation is shown in **Fig28**. This map explained 48.26% of the variance.

For VEGAN consortium, pea fermented gels were characterized by interesting notes like "dried fruits", "roasted/grilled", "coffee", and "smoked". The micro-organisms that composed VEGAN consortium especially *Geotrichum candidum*, *Hafnia alvei* and *Yarrowia lipolytica*, which were the dominant species after seven days of fermentation, are known to be strongly proteolytic and lipolytic, and may play an important role in the production of aroma compounds (Boutrou and Guéguen, 2005; Dugat-Bony *et al.*, 2015; Suzzi *et al.*, 2001). Among the aroma compounds produced by the 3 above species, volatile sulfur compounds have been reported (Arfi *et al.*, 2002) and were detected - namely DMDS and DMS - in the cultures supernatants. Milk and mixed fermented gels were characterized by different aromatic profile such as "fresh milk", "cooked milk", "honey", "fresh cream" and "yogurt". Contrary to pea gels, milk based gels were characterized by the important growth of LAB (*Lactobacillus rhamnosius* and *Leuconostoc lactis*). On PG, fermentation was performed without sugars which promoted alkaline fermentation. In contrast, on PMG/MG gels, fermentation of lactose by LAB allowed acid fermentation. LAB may also contribute to the aroma and flavour of fermented products. This is in accordance with the study of Youssef *et al.*, (2016) in which fermentation by 7 species of LAB of mixes with different milk to pea proteins ratios were compared. They showed that fermented products tended to have higher intensities for positive descriptors such as creamy, dairy and sweet, and lower intensities for negative descriptors such as vegetal, earth and vinegar.

With the MEGAN consortium, the correlation map shows that MEGAN consortium behave similarly in all types of gels with a preference in the presence of milk (PMG and MG). MEG-7-MILK and MEG-7-MIXED samples were characterized by fermented and fruity notes like "fermented fruit", "solvent", "ethanol" and pungent notes. This is to be correlated with the production of esters (mainly ethyl acetate) most probably by *K. lactis* which is well known to produce such aroma compounds (Arfi *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004). Pea-MEG gels, loaded positively on the F1 and F2 axes, were characterized by green notes like "wooded" and "cut-grass".

Considering the ExEco consortium, mixed and milk gels exhibited fermented fruit and

pineapple notes which are typical of esters (eg: ethylacetate), corresponding to the presence of the yeast *K. lactis* which is not present in pea gel. The occurrence of cheese, cheese/garlic and rind notes is a signature of volatile sulphur compounds (eg. DMS, DMDS), the latter being produced by *Hafnia alvei* and/or *Geotricum candidum*.

During food fermentation with the different microbial consortia, microorganisms produce enzymes to break down compounds (e.g. proteins, carbohydrates and lipids) generating compound which can have various properties. In this study, different volatile compounds with distinct characteristics were identified in the different fermented gels. The concentrations and variety of these volatile compounds were greatly affected by the microbial development of each given strain – being influenced by the nature of the gel -, and possible interaction between strains in each type of gel. Hexanal, heptanal, nonanal and octanal are important aroma compounds, giving the green note of legumes and belonging to the aliphatic aldehydes family. They could be derived from either enzymatic or auto-oxidation of fatty acid - mainly linoleic and linolenic acids (Murat *et al.*, 2013). Hexanal and heptanal are also important aroma compounds that contribute to good flavor in fermented milk products (Tong Dan *et al.*, 2017). (2E,4E)-hepta-2,4-dienal is detected only in pea MEGAN gels, this molecule was also detected in pea protein fermented by LAB (*Lactobacillus plantarum* L1047 and *Pediococcus pentosaceus* P113) (Schindler *et al.*, 2012) and in fermented milk by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* (Tong Dan *et al.*, 2017).

Amino acids released through proteolysis, serve as a major source of energy - and, alternatively, as flavour compounds precursors - for the growth of bacteria and yeasts, presumably via oxidative deamination and transamination reactions followed by metabolism of the resultant 2-keto acids (Mollimard and Spinnler, 1996). These enzymes (aminotransferase and/or carboxylase) are notably found in *G. candidum* which has a deaminative activity on glutamic acid and aspartic acid as well as on leucine, phenylalanine and methionine. Certainly a number of the volatile compounds identified in all gels, including 3-methylbutanal, benzaldehyde, can be recognised as products of amino acid catabolism. The conversion of leucine, isoleucine and valine proceeds via transamination of the amino acid to the corresponding α -keto acids and subsequently, via a chemical or enzymatic decarboxylation step to 3-methylbutanal, 2-methylbutanal and 2-methylpropanal, respectively (Yvon *et al.*, 1998 ; Ayad *et al.*, 2001). These volatile molecules belong to the aldehydes-other, which increase after fermentation in all gels, and have malt, chocolate, roasted coffee notes (Smit *et al.*, 2005). Those aroma compounds, principally produced by LAB and yeasts (e.g. *Geotricum candidum*, *Yarrowia lipolytica*), through the Ehrlich degradation pathway (Mollimard *et al.*, 1996). In our study, a high concentration of 3-methylbutanal was present in the volatile fraction of all gels fermented by all microbial communities.

Milk gels fermented by the ExEco consortium did not show production of volatile compounds identified as ketones, unlike gels fermented by MEGAN and VEGAN, characterized by the production of butane-2,3-dione (for mixed and milk gels), pentan-2-one, 2-butanone and 3-methylbutan-2-one (for pea MEGAN gels), and nonan-3-one (for milk MEGAN gel). Butane-2,3-dione is a metabolic product of citrate metabolism and contributes positively to the perception of buttery and creamy flavors in dairy products. This is an important metabolism for LAB strains used in the dairy industry, as it results in excess pyruvate in the cell. Pyruvate may be converted via α -acetolactate to diacetyl, an important flavour and aroma component of butter and some fermented milk products (Cogan and Hill, 1993). Other molecules can be derived from lipolytic activity and compounds such as pentan-2-one, and butan-2-one have been described to have respectively a wine or acetone-like odour, and a sweet apricot-like odour (Burdock, 2002). Some methyl ketones can derive from lipolytic activity but also from several other possible pathways such as alkane degradation by bacteria through a unique α -oxydation or bacterial dehydrogenation of secondary alcohols (Padda *et al.*, 2001).

Styrene is detected essentially in MEGAN and ExEco gels. It can originate from packaging, normal metabolism of the raw product or microbial metabolism. It can be formed, for example, during the fermentation of grapes (Steele *et al.*, 1994), by micro-organisms during the ripening or storage of mould-ripened cheeses (Spinnler *et al.*, 1992) or by decomposition of chemically related food additives by micro-organisms. It has been proved to be the result of starvation of certain fungi (Adda *et al.*, 1989). Styrene appears to be synthesized from phenylalanine by phenylalanine ammonia-lyase activity followed by a decarboxylation catalysed by a cinnamic acid decarboxylase (Pagot *et al.*, 2007). Among the aromatic hydrocarbons, a number of important aromatic hydrocarbons were found including toluene, benzene and 2-pentylfuran, were probably derived from oxidation of unsaturated fatty acids and affect the characteristic aroma and taste of products. These molecules were detected also in few pea cultivars (Azarnia *et al.*, 2011). The influence of these compounds on the flavor of samples is not clear. Future work will target these aromatic hydrocarbons by examining samples to obtain a better understanding of their roles in fermented pea gels.

In conclusion, the overall versatility together with the potential of adaptation and metabolic activity of the microbial consortia are dependent of the composition of the matrix. Hence, a mosaic of aromatic notes were perceived depending on the type of gel and the microbial consortium used. However, the complexity of the microbial composition on the consortia which may vary during fermentation and potential interactions between the different strains make it difficult to fully explain the different ways to produce aromatic molecules. The results of this study highlight ways in which pea proteins can be used in food products. Indeed, pea proteins can help to create fermented

products with desirable sensory characteristics.

5. Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the Carnot Qualiment Institute for its financial support. The authors also thank Anne Sophie Sarthou, Malou le Corronc-Nuzum (Université de Technologie de Compiègne, Compiègne, France), Manon Surin and David Forest for their technical support. S. Ben-Harb thankfully acknowledges the Tunisian Ministry of Higher Education for the PhD fellowship that helped fund this research.

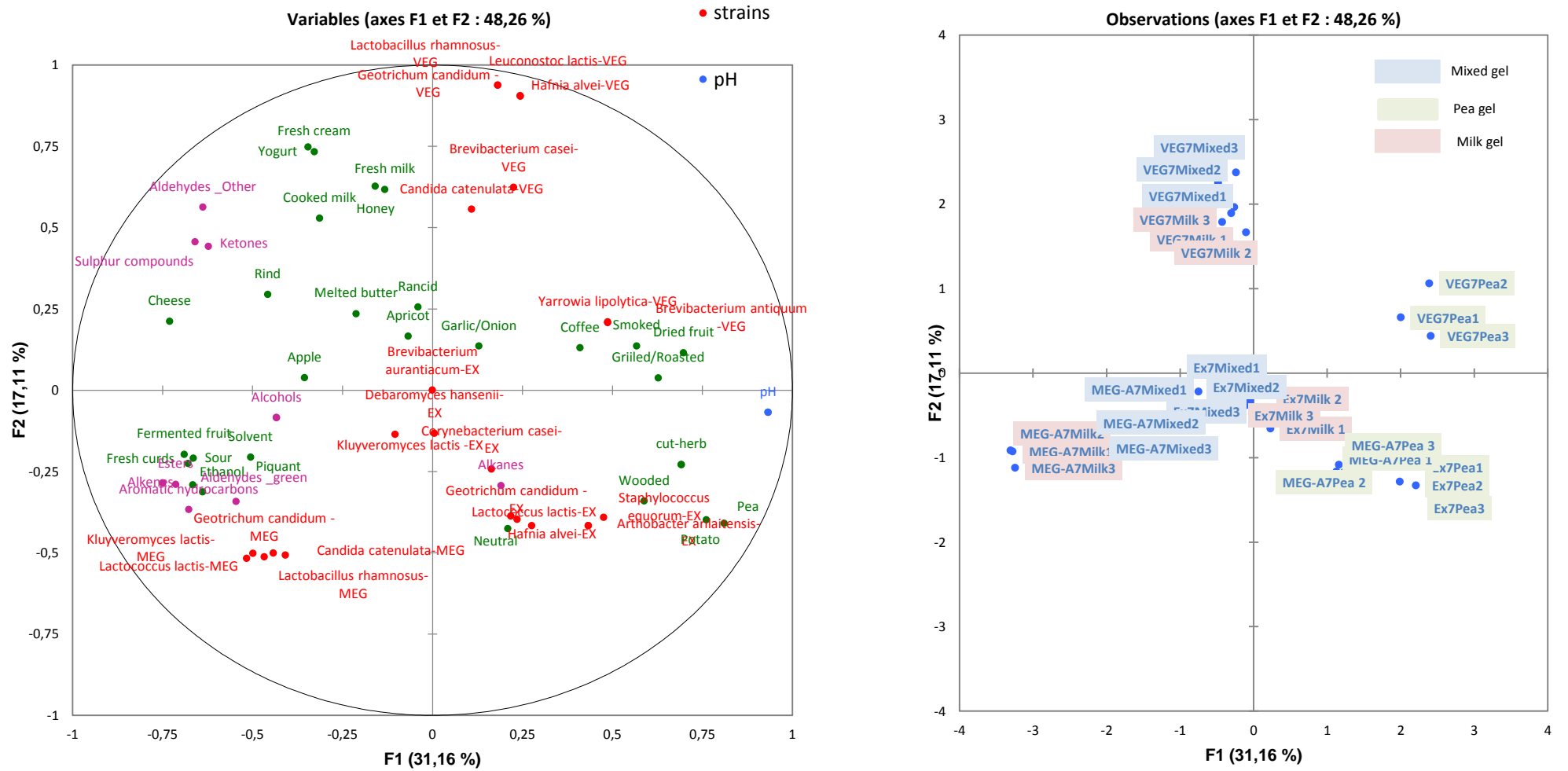


Figure 28. Multiple Factorial Analysis (MFA) of fermented gels, sensory attributes, microbial communities, and volatile compounds. Red: microbial communities; green: sensory attributes; purple: volatile compounds; blue: fermented samples

II.4. Impact de l'origine des souches sur le fonctionnement des communautés microbiennes et sur les qualités sensorielles au cours de la fermentation de différents types de gels

1.Introduction

Cette partie est un complément de résultats de la partie précédente de la thèse et qui ne fait pas l'objet d'un article. L'étude porte sur la fermentation de trois types de matrices (pois, mixte et lait) inoculés par deux consortia microbiens dont la composition en termes d'espèces est identique mais l'origine des souches est différente : La communauté VEGAN-V est composée de 5 souches d'origine végétale (alors que la communauté MEGAN-A est composée de 5 souches d'origine animale (**Tab21**). L'objectif est d'évaluer leur contribution respective sur les caractéristiques technologiques de produits à base de pois (notes aromatiques, réduction de notes vertes). Le pH, la croissance et l'abondance des micro-organismes inoculés dans les gels à base de pois ont été évalués après trois et sept jours de fermentation alors que les caractéristiques sensorielles et physicochimiques sont présentées après sept jours de fermentation. Le potentiel aromatique de ces consortia sur les gels, après fermentation, a été caractérisé à l'odeur par un panel sensoriel à l'aide de la méthode Check-All-That-Apply (CATA) et les composés volatils ont été identifiés par GCMS. La même démarche expérimentale réalisée dans la partie précédente a été utilisée dans cette partie du travail.

Tableau 21. Composition des consortia microbien : MEGAN-A et MEGAN-V

Nom du consortia microbien	CNRZ212	MEGAN-A
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	
	LMG10772	
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	
	S3	
	<i>Lactococcus lactis sub Lactis</i>	
	JIM2965	
	<i>Lactococcus lactis sub Lactis</i>	
	ExfComLD	
	<i>Candida catenulata</i>	
CLIB1179	MEGAN-V	
<i>Candida catenulata</i>		
ATCC 204307		
<i>Geotrichum candidum</i>		
CLIB1154		
<i>Geotrichum candidum</i>		
3550		
<i>Kluyveromyces lactis</i>		
NCYC2997		
<i>Kluyveromyces lactis</i>		

2. Résultats

1. Potentiel d'implantation des deux types de consortia microbiens dans les gels et caractéristiques sensorielles associées

Gel pois (Tab22.A)

Le gel pois inoculé avec le consortium MEGAN-A, dont les souches sont d'origine laitière, est dominé après 3 jours de fermentation par *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis* et *Geotrichum candidum*. Après 7 jours de fermentation, l'ensemble des souchesensemencées s'est implanté sur le gel (*Kluyveromyces lactis* et *Candida catenulata* également). A sept jours de fermentation, ce gel fermenté n'a pas d'odeur propre car il n'est pas distingué du témoin pois non fermenté et les deux gels sont caractérisés par des notes « pomme de terre », « boisé » (Fig29).

Le gel pois inoculé avec le consortium MEGAN-V est dominé après 3 jours de fermentation par les mêmes espèces que celle fermentée avec le consortium MEGAN-A (*Lactococcus lactis*, *Lactobacillus rhamnosus* et *Geotrichum candidum*). Toutefois, après 7 jours de fermentation, les autres souches soit ne s'implantent pas (*Kluyveromyces lactis*) soit restent en sous dominance (*Candida catenulata*). A l'odeur, cette matrice fermentée est caractérisée par des notes plutôt « boisé », « rance » et « fruits secs » après 7 jours de fermentation, très proche des odeurs du gel contrôle non fermenté (Fig29).

Le pH dans le gel pois, quel que soit le consortiumensemencé, ne varie pas trop (variation de moins d'une unité pH) et tend à se maintenir à une valeur proche de la neutralité.

Gel mixte (Tab22.B)

Pour le gel mixte inoculé avec le MEGAN-A, dont les souches sont d'origine laitière, l'ensemble des souchesensemencées s'implantent sur le gel après 3 et 7 jours de fermentation. On observe une dominance des espèces *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Geotrichum candidum* et *Candida catenulata*. Ce gel fermenté est caractérisé par des odeurs « caillé frais », « grillée/torréfiée » et « fromage » après sept jours de fermentation (Fig29).

Le gel mixte inoculé avec le consortium MEGAN-V est dominé après 3 jours de fermentation par les mêmes espèces pour le consortium MEGAN-A, (*Lactococcus lactis*, *Lactobacillus rhamnosus* et *Geotrichum candidum*). Toutefois, après 7 jours de fermentation, les autres souches soit ne s'implantent pas (*Kluyveromyces lactis*) soit s'implantent très difficilement (*Candida catenulata*).

A l'odeur, ce gel fermenté est caractérisé par des notes fruitées (« Pomme », « abricot » et « ananas » à J7) (Fig29). Le pH du gel mixte (avec 50% de pois et 50% de lait) évolue au cours des 7 jours de fermentation de façon significative passant d'une valeur proche de la neutralité (6,3) à des

valeurs acides (< 5). La fermentation quel que soit le consortium provoque donc une forte acidification du milieu due à la production d'acide lactique via la fermentation du lactose par les bactéries lactiques. On remarque que le gelensemencé avec le consortium MEGAN-A est le milieu le plus acide.

Gel lait (Tab22.C)

Le gel lait inoculé avec le consortium MEGAN-A, dont les souches sont d'origine laitière, est dominé après 3 jours de fermentation par *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis* et *Kluyveromyces lactis*. Après 7 jours de fermentation l'ensemble des souchesensemencées s'implante sur le gel et *Geotrichum candidum* a rejoint le groupe dominant. Ce gel fermenté se caractérise par des odeurs fromagères (**Fig29**).

Le gel lait inoculé avec le consortium MEGAN-V est dominé après 3 jours de fermentation par deux bactéries lactiques *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus rhamnosus*. Après 7 jours de fermentation, une croissance de l'ensemble des souchesensemencées est observée mais *Kluyveromyces lactis* et *Candida catenulata* restent en sous dominance. Ce gel fermenté est caractérisé par des notes fruitées et laitières à J7 (**Fig29**).

Comme pour le gel mixte, le pH dans le gel lait varie selon le consortiumensemencé, passant d'un pH de 5.7 avant fermentation à 4.0 avec le consortium VEGAN-A et 5.3 avec le consortium Vegan-B après 7 jours de fermentation.

Les différents gels fermentés avec les deux types de consortia microbiens (MEGAN-A et MEGAN-V) sont classés en trois groupes distincts selon leurs profils sensoriels (analyse de Classification Ascendante Hiérarchique (CAH)) (**figure29**). Le premier groupe est composé de gels mixte et lait fermentés avec le consortium MEGAN-V (Mixte-MEG-V et Lait-MEG-V), caractérisé par des notes fruitées. Le deuxième groupe regroupe les gels mixte et lait fermentés avec le consortium MEGAN-A (Mixte-MEG-A et Lait-MEG-A), caractérisé par des notes fromagères. Enfin, le dernier groupe est composé des témoins (gels non fermentés) et des gels pois fermentés avec les deux types de consortia (Pois-MEG-A et Pois-MEG-V).

Tableau 22. Croissance des souches des différents consortia microbiens ensemencés (MEGAN-A et MEGAN-V) dans les différents gels. pH des gels avant fermentation (J0) et après fermentation (J3 et J7). A- gel pois (100% protéines de pois); B : gel mixte (50% protéines de pois/50% protéines de lait) ; C : gel lait (100% protéines de lait). Les croissances microbiennes sont exprimées en Log UFC/g (soit log de N/N0, N est la croissance après fermentation à J3/J7, N0 est la croissance à J0. Toutes les analyses sont faites en triplicat

A			MEGAN-A	MEGAN-V
		J0	6.71±0.10	
		J3	6.46±0.06	6.61±0.06
		J7	6.36±0.01	6.54±0.04
Socuhes log UFC/g				
<i>Lactococcus lactis</i>	J3	1.68 ^b	2.79 ^a	
	J7	1.93 ^b	2.76 ^a	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	J3	2.04 ^a	1.40 ^b	
	J7	2.08 ^a	1.18 ^b	
<i>Kluyveromyces lactis</i>	J3	1.48 ^a	0.17 ^b	
	J7	2.82 ^a	0.00 ^b	
<i>Geotrichum candidum</i>	J3	2.45 ^a	2.19 ^a	
	J7	2.96 ^a	2.68 ^a	
<i>Candida catenulata</i>	J3	0.61 ^a	0.00 ^a	
	J7	2.28 ^a	0.85 ^a	

B	pH	Mixte		
		J0	6.29±0.14	
		J3	4.43±0.04	4.76±0.04
		J7	4.30±0.01	4.74±0.02
Soucheslog UFC/g				
<i>Lactococcus lactis</i>	J3	3.53 ^a	2.44 ^b	
	J7	3.40 ^a	2.72 ^b	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	J3	2.99 ^a	1.68 ^b	
	J7	3.58 ^a	2.00 ^b	
<i>Kluyveromyces lactis</i>	J3	2.16 ^a	0.32 ^b	
	J7	2.80 ^a	0.00 ^b	
<i>Geotrichum candidum</i>	J3	2.65 ^a	1.35 ^b	
	J7	3.34 ^a	2.23 ^b	
<i>Candida catenulata</i>	J3	1.91 ^a	0.10 ^b	
	J7	2.95 ^a	0.34 ^b	

C	pH	Lait		
		J0	5.68±0.53	
		J3	3.99±0.01	5.03±0.01
		J7	3.90±0.03	5.31±0.02
Souches log UFC/g				
<i>Lactococcus lactis</i>	J3	1.78 ^b	2.86 ^a	
	J7	1.56 ^b	2.99 ^a	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	J3	2.29 ^a	1.74 ^a	
	J7	2.70 ^a	2.22 ^b	
<i>Kluyveromyces lactis</i>	J3	4.12 ^a	1.06 ^b	
	J7	4.39 ^a	0.72 ^b	
<i>Geotrichum candidum</i>	J3	2.20 ^a	1.43 ^a	
	J7	2.99 ^a	2.15 ^b	
<i>Candida catenulata</i>	J3	1.17 ^a	0.35 ^a	
	J7	1.30 ^a	0.83 ^a	

Vert: (N/N0>1); Orange (0,5<N/N0<1), Rouge (N/N0<0,5)

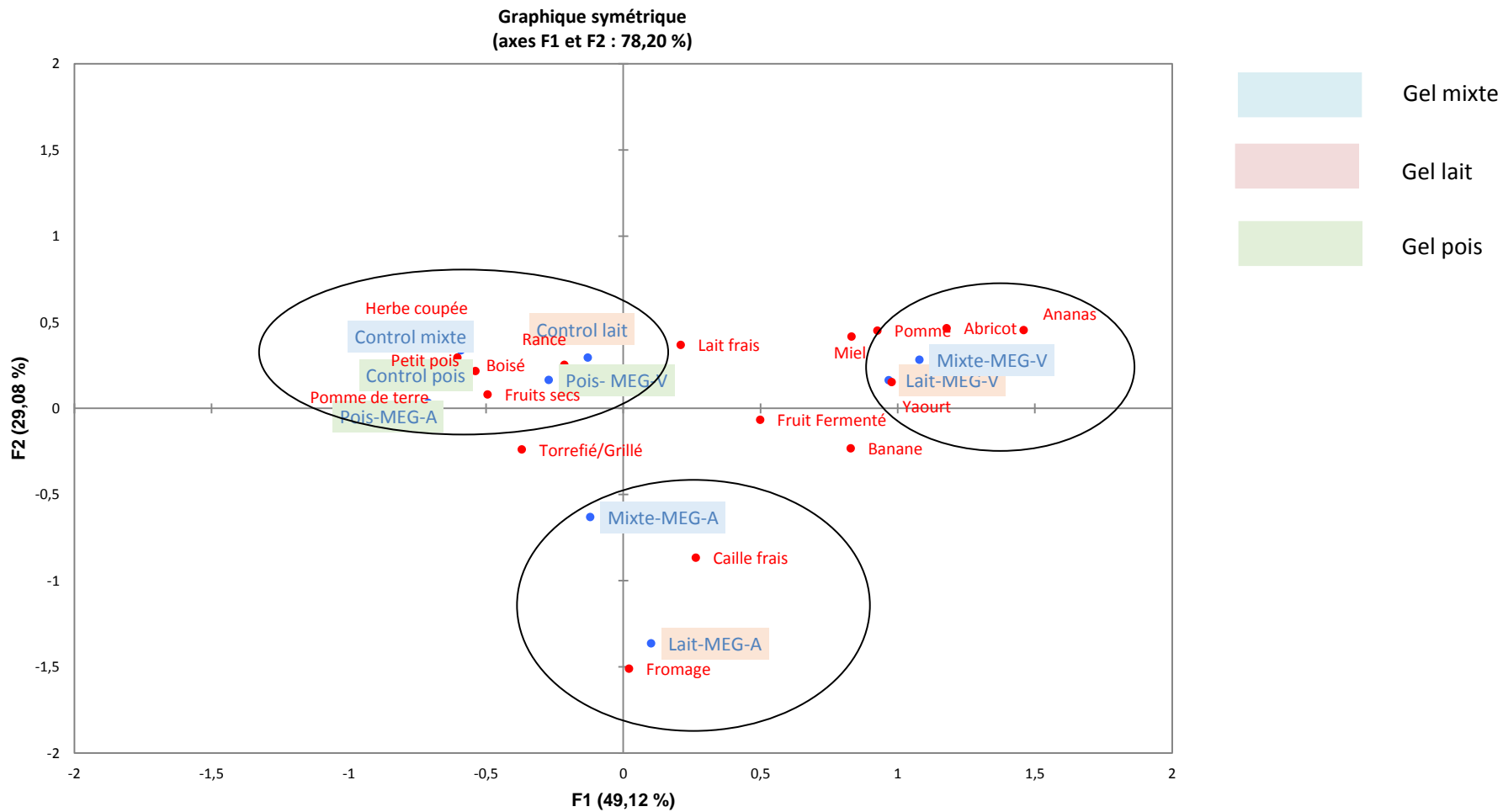


Figure 29. Analyse Factorielle de Correspondance (AFC) représentant les propriétés sensorielles des différents gels avant et après fermentation avec deux types de consortia : MEGAN-A et MEGAN-B Bleu ; produits ; rouge : descripteurs sensoriels significatifs ($p < 0,05$). Une analyse ascendante hiérarchique (HCA) a été réalisée pour regrouper les essais en fonction de leur similarité, mesurée par corrélation de Pearson, alors que l'agrégation de cluster était basée sur la méthode de liaison moyenne (cercles noirs).

2. Caractérisation des molécules volatiles dans les différents types de gels fermentés

L'identification, la quantification et la comparaison des composés volatils avant et après fermentation (7 jours), des gels de pois, lait et mixte par les deux types de consortia MEGAN-A et MEGAN-V ont été déterminées. Ces composés sont ensuite classés en familles : aldéhydes, alcools, hydrocarbures aromatiques, alcanes, alcènes, cétones, composés soufrés et esters. Les aldéhydes ont été répartis en deux groupes : les aldéhydes responsables de notes vertes (aldéhydes_vert) et les aldéhydes responsables de notes torréfiées/grillées et autres (aldéhydes_autres). La répartition globale des composés volatils variait significativement selon le type de matrice et le type de consortium utilisé (**TableS1**)(Annexe4).

Comme présenté sur la **figure 30A**, l'aire des pics totaux des témoins de pois, mixte et lait était respectivement : $1,36E^{+08}$, $1,67E^{+08}$ et $8,27E^{+07}$. La famille chimique la plus représentée dans ces échantillons témoins était la famille des aldéhydes_vert. Elle représentait respectivement $6,05E^{+07}$, $6,85E^{+07}$ et $3,38E^{+07}$ dans les gels de pois, mixte et lait. L'hexanal, le nonanal et l'octanal étaient les aldéhydes_vert les plus abondants dans tous les échantillons non fermentés. Le tableau S1 présente la composition détaillée en molécules volatiles pour chaque échantillon.

Gel pois (Fig30B)

Dans le gel pois fermenté avec le consortium MEGAN-A, 28 composés volatils ont été identifiés. Après sept jours de fermentation, une diminution des aldéhydes_vert a été observée ($3,45E^{+07}$), ainsi qu'une augmentation des aldéhydes_autres (essentiellement 3-méthylbutanal, et 2-méthylpropanal et la production de (2E,4E) -hepta-2,4-dienal), des cétones (par la production de 3-méthylbutan-2-one et pentan-2-one) et des hydrocarbures aromatiques (essentiellement par la production de styrène et 2-pentylfurane).

Dans le gel pois fermenté avec le consortium MEGAN-V, 37 composés volatils ont été identifiés. Après sept jours de fermentation, l'aire des pics totaux augmentait et atteignait $3,50E^{+08}$. Cette augmentation se traduit par une augmentation des hydrocarbures aromatiques (production de 2-méthyl furan, éthylbenzene, styrène et 2-pentylfurane) et des alcènes (production de hex-1-ene, non-1-ène et undec-1-ène). On note aussi la présence des esters dans ce type de gel (production d'éthyl propanoate, ethyl 3-méthylbutanoate et 3-méthylbutyl acetate).

Gel mixte (Fig30C)

30 composés volatils ont été identifiés après fermentation des gels mixtes avec le consortium MEGAN-A. Ces gels se caractérisaient principalement par une augmentation des alcools (éthanol, 2-méthyl-propan-1-ol, 3-méthylbutan-1-ol et 2-méthylbutan-1-ol), des aldéhydes_autres (2-méthyl

propanal et 3-méthyl butanal), et des cétones (production de butane-2,3-dione). Une production d'éthyle acetate a été détectée dans ce type de fermentation.

Dans les gels mixtes fermentés avec le consortium MEGAN-V, 21 composés volatiles ont été identifiés. Après sept jours de fermentation, une importante production d'esters (principalement éthyle acetate, éthyl-3-méthylbutanoate, 3-méthylbutyl acetate, éthyl-2-méthylpropanoate et 2-méthylbutanoic acid) était observée ainsi que des aldéhydes_autres (augmentation de l'abondance du 3-méthylbutanal et production de 2-méthylbutanal). Une production de butane-2,3-dione a été identifiée aussi dans ces gels mixtes.

Gel lait (Fig30D)

Dans les gels lait fermentés avec le consortium MEGAN-A, 34 composés volatils ont été identifiés. Après sept jours de fermentation, une importante augmentation de l'aire totale des pics a été observée ($8,06E^{+08}$). Cette augmentation était générée par la production des esters (éthyle acetate, ethyl propanoate, 3-méthylbutyl acetate, ethyl-2-méthylpropanoate et 2-méthylbutanoic acid), des alcools (éthanol, 2-méthylpropan-1-ol et 3-methylbutan-1-ol), des cétones (principalement butane-2,3-dione, hexan-2-one et heptan-2-one), et des aldéhydes_autres (acetaldehyde).

Dans les gels lait fermentés avec le consortium MEGAN-V, 27 composés volatiles ont été identifiés. Après sept jours de fermentation, on observait d'importantes modifications : la production d'alcools (éthanol et 3-méthylbutan-1-ol), d'acetaldehyde (aldéhydes_autres), et d'esters (éthyle acetate, éthyl propanoate, 3-méthylbutyl acetate, éthyl-2-méthylpropanoate, éthyl-2-méthylpropanoate et 2-méthylbutanoic acid).

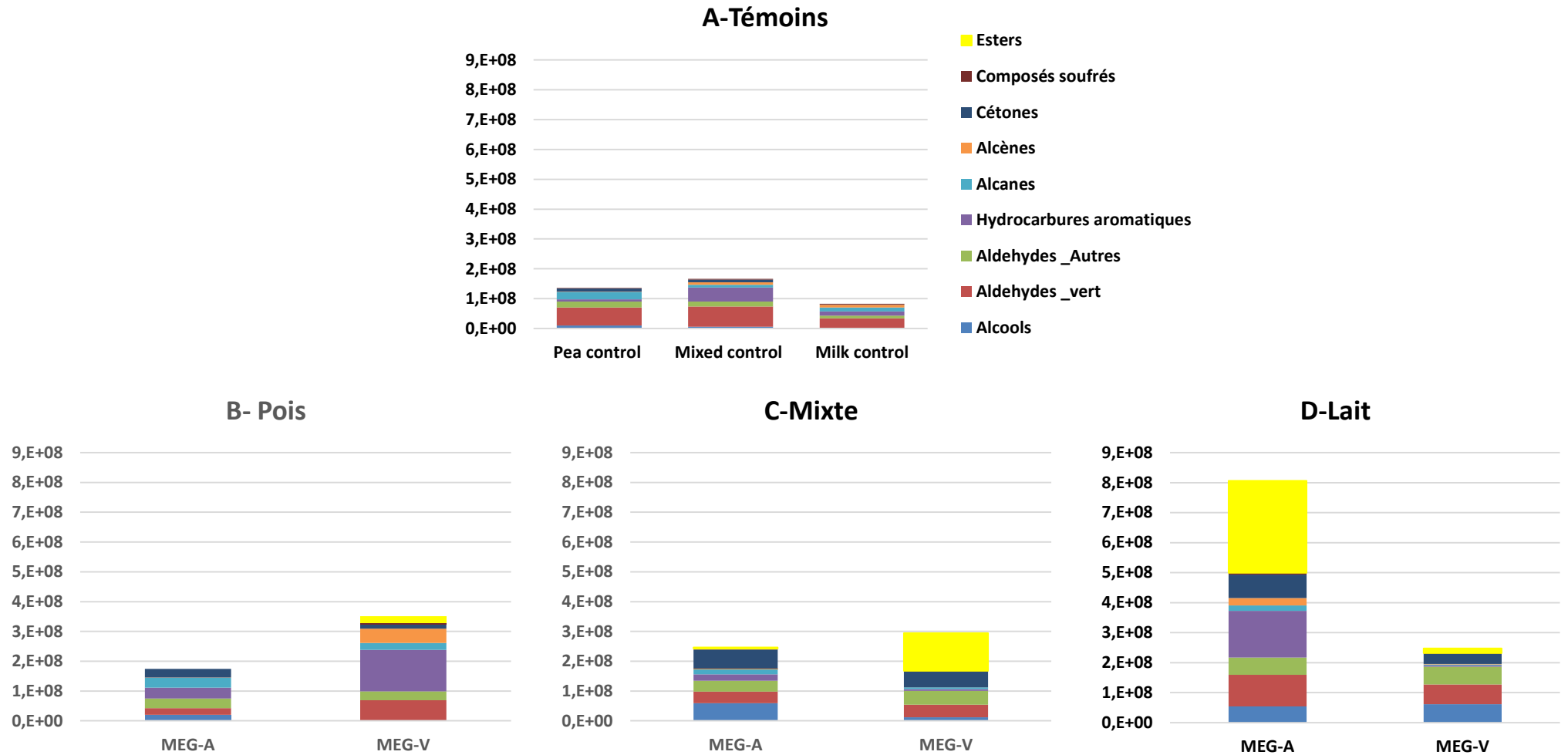


Figure 30. Composition en composés volatiles des différents gels fermentés avec deux types de consortia microbiens (MEGAN-A et MEGAN-V) après sept jours de fermentation. A : témoins (gel non fermenté, B : gel de pois fermenté, C : gel mixte fermenté ; D : gel lait

3. Conclusion

Dans cette étude, trois types de gels fermentés (pois, mixte et lait) avec deux types de consortia microbiens (MEGAN-A et MEGAN-V) ont été étudiés. Leur profil sensoriel ainsi que la composition en molécules volatiles ont été déterminés.

La **Figure 31** présente les différentes caractéristiques de ces produits fermentés selon le type de gel et de consortium microbien. Les résultats montrent que la croissance, quel que soit le milieu (pois, mixte pois/lait et lait), dépend fortement de la souche. Ainsi par exemple, la souche de *K. lactis* d'origine animale s'implante dans les 3 milieux, alors que la souche de *K. lactis* d'origine végétale ne s'implante pas, quel que soit le milieu. Le même comportement est observé pour les deux souches de *C. catenulata* testées. D'autre part, lorsque les 5 souches du consortium sont d'origine laitière (MEGAN-A), celles-ci s'implantent dans toutes les matrices et donnent des notes « pomme de terre », « grillée/torréfiée » pour le pois, des notes fromagères pour la matrice lait et mixte. Ces notes fromagères proviennent principalement de la production de composés volatils, appartenant en particulier aux méthyl cétones et alcools (2-méthylpropan-1-ol et 3-méthylbutan-1-ol) par les différents micro-organismes présents

Dans le cas où les 5 souches sont d'origine végétale sont ensemencées, les levures *Candida catenulata* et *Kluyveromyces lactis* sont en sous dominance ou ne s'implantent pas dans tous les gels. Les matrices lait et mixtes sont caractérisées par des notes fruitées et laitières comme « fruit fermenté », et « lait frais ». La présence des notes fruitées dans les gels mixte et lait, fermentés avec le consortium MEGAN-V, est générée probablement suite au développement de la levure *Geotrichum candidum*, c'est la levure majoritaire présente dans ces matrices. Elle est connue pour intervenir dans le catabolisme des acides aminés tels que l'acide glutamique, l'acide aspartique, la leucine, la phénylalanine et la méthionine, via son activité decarboxylase et oxydoreductase générant ainsi des alpha- céto-acides puis des aldéhydes qui sont ensuite réduits en alcools primaires correspondants, associés aux arômes "fruités" (éthanol, 2-méthylpropan-1-ol, 3-méthylbutan-1-ol et 2-méthylbutan-1-ol) [Boutrou and Guéguen \(2005\)](#). La présence de notes « fruits secs » dans les gels de pois pourrait être générée suite à la protéolyse de la viciline du pois par l'action des micro-organismes présents. Il a été démontré dans la littérature que ces peptides sont responsables de l'arôme chocolat au cours du processus de torréfaction [\(Voigt et al., 1994\)](#). Ces arômes sont associés à la présence de molécules volatiles telles que 3-méthylbutanal et 2-méthylbutanal qui proviennent du métabolisme de la leucine et de l'isoleucine [\(Smit et al., 2005\)](#)-

Les résultats d'évaluation sensorielle du profil d'odeur (**Fig. 29**) font apparaître des différences nettes, qui peuvent apparaître contradictoires par rapport aux résultats d'analyse des

composés volatils (**Fig. 30**). Ainsi par exemple, les deux milieux fermentés par le consortium MEGAN-V sont sensoriellement très proches et décrits par des notes fruitées, alors que leur profil de composés volatils diffère fortement l'un de l'autre. De façon analogue, le gel laitier fermenté par le consortium MEGAN-A est celui qui contient le plus de composés volatils, notamment une très grande quantité d'esters comparativement aux autres milieux, mais il est caractérisé globalement par une note fromagère. Ces différences peuvent être expliquées par le fait qu'une perception globale en analyse sensorielle est mesurée par les juges à l'inverse une mesure de toutes les molécules volatiles qui peuvent participer à cette perception globale est réalisée en GC-MS.

En conclusion, l'origine des souches a un impact sur les caractéristiques sensorielles et biochimiques des gels fermentés. Ainsi, pour terminer cette étude et aller plus loin dans la discussion de ces résultats, il serait intéressant de tester plusieurs souches d'origine végétale et animale

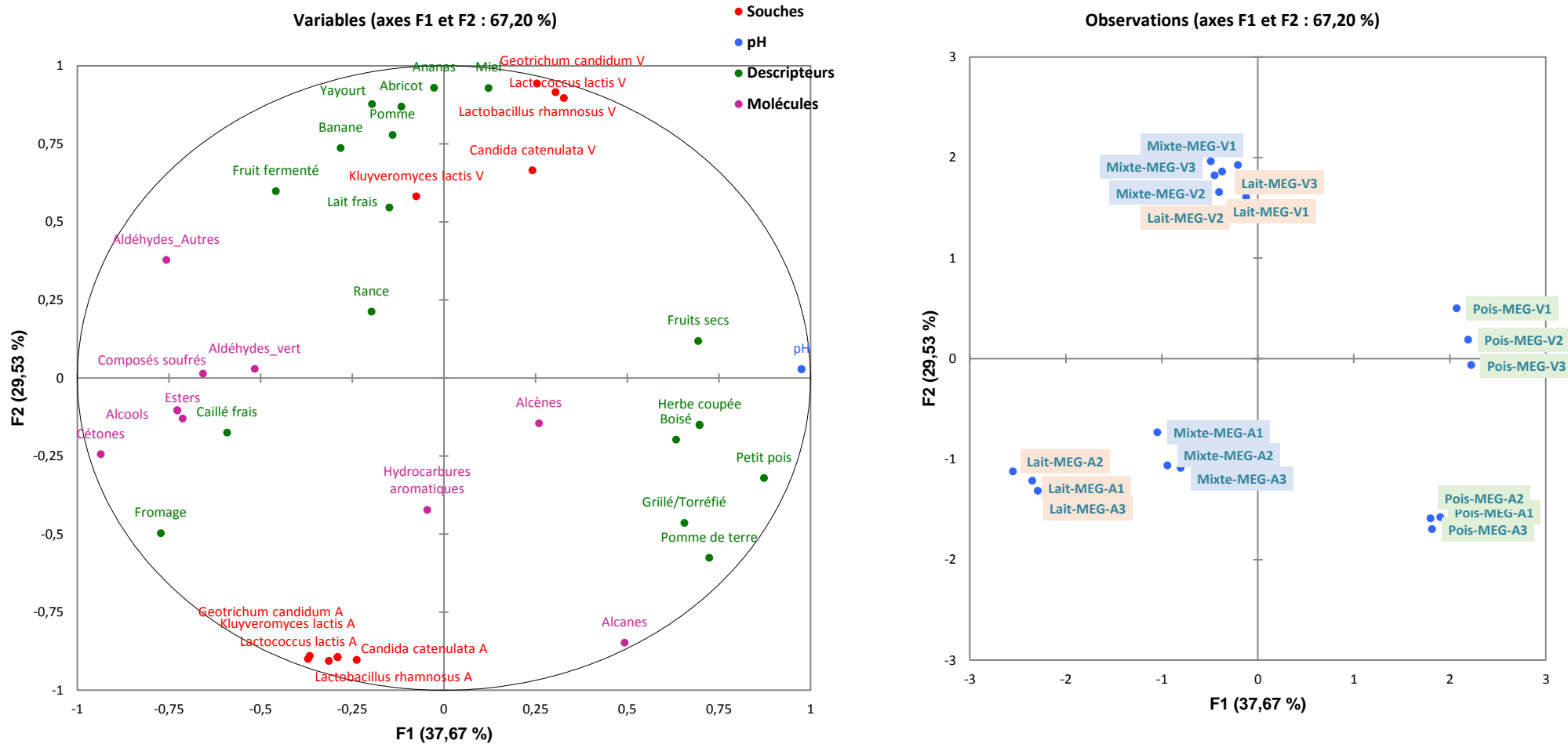


Figure 31. Analyse Factorielle Multiple (AFM) représentant les propriétés sensorielles, microbiologiques et analytiques des différents gels fermentés avec deux types de consortia microbien (MEGAN-A et MEGAN-V) à sept jours. Carte droite : carte des produits fermentés (Triplicats pour chaque produit sont présentés) ; carte gauche : carte des propriétés sensorielles, microbiologiques et physicochimiques associés aux produits. $RV(\text{souche-descripteurs})=0,61$. $RV(\text{souche-molécules})=0,26$. $RV(\text{molécules-descripteurs})=0,90$. Lettres A et B (attribuées aux souches) désignent le consortium MEGAN-A et MEGAN-V respectivement.

II.5. Etude de la composition volatile et non-volatile des gels fermentés enrichis en protéines végétales et leur perception

II.5.1. Résumé

Les travaux effectués dans la partie précédente ont permis d'évaluer les capacités de croissance des communautés microbiennes sélectionnées sur des gels enrichis en protéines de pois et de déterminer leurs propriétés sensorielles (profil aromatique) et physicochimiques (composition en molécules volatiles).

Il est reconnu que la perception des protéines végétales et en particulier celle du pois peut s'accompagner de défauts olfactifs (notes vertes) et sapides (amertume). Ainsi, cette partie du travail a pour objectif de comprendre le rôle de la fermentation sur ces gels enrichis en protéines de pois par (i) l'identification et la quantification des perceptions de ces gels fermentés par l'évaluation des caractéristiques olfactives (perception au nez et en bouche), des saveurs, puis (ii) d'identifier les molécules responsables de ces défauts en caractérisant les produits par différentes techniques analytiques (fractions volatiles et non volatiles). Pour cela, deux types de gels ont été étudiés, le premier est le gel végétal contenant 100% de protéines de pois et le deuxième est le gel mixte contenant 50% protéines de pois/50% protéines de lait. La fermentation de chacune de ces matrices a été réalisée avec quatre consortia microbiens différents : VEGAN, MEGAN-A, MEGAN-V et ExEco durant trois jours à 14°C.

Les résultats de cette étude montrent que les défauts olfactifs associés aux notes vertes des protéines de pois semblent principalement dus à la présence d'aldéhydes. La présence des défauts sapides, en particulier la perception d'amertume, pourrait être liée à la présence d'acides aminés hydrophobes. Nous avons observé qu'après fermentation des gels, l'amertume perçue augmente, ce qui pourrait être due à la dégradation des protéines en acides aminés hydrophobes ou à une protéolyse partielle libérant dans le milieu des peptides amers. L'analyse chromatographique couplée à l'olfactométrie a permis de montrer que la fermentation a contribué à diminuer significativement les notes vertes des gels de pois et mixtes avec les trois consortia testés (VEGAN, MEGAN-A et MEGAN-V). Elle a également permis de générer des molécules volatiles intéressantes, responsables de notes aromatiques fruitées et lactiques.

II.5.2. Publication

Publication n°4 à soumettre à Food Chemistry ou International Food Research

Modulation of volatile and non-volatile composition of pea protein based gels and their perception through fermentation with different microbial starters

^a UMR GMPA, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, 78850, Thiverval-Grignon, France

^b UMR Ingénierie Procédés Aliments, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, 91300, Massy, France

Abstract

To tend to a sustainable food system, it seems necessary to increase the proportion of plant protein in our diet, in particular by developing a food offer rich in plant protein. Fermentation of plant product could thus be used to develop innovative food products, with various flavor properties. The perception of this fermented product is mainly impacted by the used microbial communities. They may modify structure and texture of products, and also generate various volatile and non-volatile components responsible for taste and aroma perception. The objective of this study was also to investigate the impact of fermentation performed by different microbial communities on the perception of pea protein based gels and to understand the origin of this perception. Two types of gels were studied: pea gels containing 100% pea proteins and mixed gels containing 50% pea proteins and 50% milk proteins. Sensory analysis, performed with a trained panel, revealed that bitterness perception increased after fermentation, which could be due to hydrophobic amino acids resulting from protein hydrolysis. Results showed also that after three days of fermentation, the perceived intensity for the pea note decreased in pea gels fermented by three consortia on the four studied. In mixed gels, pea perception was similar before and after fermentation whatever the consortia used, whereas cheesy perception increased. To explain this sensory evolution, olfactometry experiments revealed that specific green aroma compounds, responsible for green off-note were suppressed thanks to fermentation in a pea-based product. Fermentation shows thus a high interest in elaboration of innovative food pea product.

Key words: beany notes, bitter, aroma compounds, fermentation, sensory analysis, olfactometry

1. Introduction

Peas (*Pisum sativum* L.) are an important vegetable source of proteins and are becoming a potential alternative to soybean in Europe (Boye et al., 2010). However, and similarly to other legumes, off-flavors in peas constitute a barrier to consumption and limit expansion of these proteins into main-stream food application (Roland et al., 2017). Unpleasant taste and aroma perceptions were identified in numerous studies with consequences on consumer acceptance. In particular, beany aroma and bitterness taste are described as the main off-notes. They are partially inherent in product and produced during harvesting, storage and processing (Murat et al., 2013).

Beany off-flavor, already described in many legumes such as soybeans or peas, is defined as a complex perception (Murat et al., 2012, 2013; Azarnia et al., 2011. Schindler et al., 2012). It could include the perception of musty/earthy, musty/dusty, sour aromatics, starchy, powdery feel, and also green/pea pod, nutty, or brown (VARA-UBOL et al., 2004, Murat et al., 2012, 2013). In literature, the main components identified as responsible for these undesirable beany odors belong to various families, such as aldehydes, ketones and alcohols (Vara-Ubol et al., (2004). Sulphur compounds and aromatic hydrocarbons also participate in beany perception (Roland et al., 2017). Different volatile compounds were used as reference to train a panel to beany perception: 3-methyl-1-butanol; pentanol; 1-octen-3-ol; trans, trans-2,4-heptadienal; acetophenone; 1-octen-3-one; and 3-isopropyl-2-methoxypyrazine. Other chemicals, such as hexanal, trans-2-hexenal, trans-2-octenal, and pentanal, commonly found in volatiles of soy products were described as beany only at any concentrations (VARA-UBOL et al., 2004).

Bitterness were widely described as a sensory defect in many plant products. Various molecules were identified in literature as responsible for bitterness, such as the peptides formed by amino acids (primarily L-Phe, L-Tyr, L-Trp, L-Leu, L-Val, L-Ile) (Meinlschmidt et al., 2016; Roudot-Algaron, 1996), and particularly, their hydrophobicity. The bitterness in pea proteins could also be related to the saponin content, mainly dependent on the pea variety (Heng et al., 2006) and on the method used for the protein extraction (Heng et al., 2004). Besides, isoflavones and flavonoids (Damodaran and Arora, 2013), isochlorogenic and chlorogenic acid (Arai et al., 1966) have also been identified as responsible for bitterness.

To increase the potential use of pea protein in food, it seems necessary to develop some applications in which the process can decrease these original off-notes, relative to bitterness and beany flavour. For that, fermentation could be a solution, as already highlighted in pea product fermented by lactic bacteria (Schindler et al., 2012; Youssef et al., 2016).

Microorganisms such as *Lactobacillus* strains are extensively used as a debittering starter adjuncts for the production of protein hydrolysates lacking bitter taste (Saha and Hayashi, 2001). Similar effects have been observed during hydrolysis with fungal (such as *Rhizopusoryzae*, *Aspergillusoryzae*, *Actinomucorelegans* and *Aspergillussojae*) protease preparations and microbial aminopeptidases hydrolyzing bitter peptides and liberating aromatic amino acids (also responsible for bitterness), which are also important precursors of aroma compounds (Meinlschmidt *et al.*, 2016).

To our knowledge, only few investigations have been performed on the effect of fermentation, by using complex microbial consortia, on the sensory characteristics of products based pea proteins, with a high pea content. In this context, this study focused on impact of the fermentation process on off-flavors perception of different pea based gels. We chose to focus on the role played by different type of microbial cultures in order to evaluate their ability to modify the perception of pea gels, in particular in modulation of beany flavor and bitter taste. To go further in understanding, the molecules responsible for perception were determined by identification of the composition in volatile and nonvolatile compounds.

2. Materials and methods

2.1 Raw materials

Pea protein isolate (PPI) (NUTRALYS® S85F) provided from Roquette Frères (Lestrem, France). Skim milk powder (SMP) was purchased from Lactalis (Bourgbarré, France) and Rapeseed oil (Fleur de Colza, Lesieur, France) was purchased from a local supermarket. Glucono delta-lactone (GDL, Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) was used for coagulation. Twenty strains from different phylogenetic groups (actinobacteria, firmicutes, proteobacteria and yeasts) belonging to the private collection of Genie and Microbiology of Food Process and University of Biodiversity and Microbial Ecology laboratories isolated from dairy and vegetable products, were used in this study (**Table S1**) (Annexe5)

2.2 Products

Two types of fermented gels were prepared in the same conditions, containing a total of 10% of proteins, with (i) 100% pea proteins (Pea Gel), or (ii) a mixture of pea proteins and milk powder (50/50) (Mixed gel). Twelve gels (two types of gel fermented with three different microbial starters (VEGAN, MEGAN-A and MEGAN-V) at two fermentation times (3 and 7 days) were prepared and fermented using the method described previously (Publication 3). After 3 days of fermentation, fermented gels were mixed using a strict protocol and then stored at -20°C during the study. For sensory analyses, all samples of gels were evaluated at 20°C.

2.3 Sensory evaluation

The sensory evaluation of gels was performed by successively two complementary methods used to evaluate the perception of fermented and non-fermented gels (control sample). First, a sensory profile was used to evaluate the perception in the mouth (aroma and taste perception) of the different gels focusing on six flavor attributes (bitter, pea, roasted/grilled, cheese/rind, fresh cream/butter and fruity) by a trained panel. In addition, a Check-all-That-Apply (CATA) test was used to characterize other or new sensory properties which could specifically appear on a sample. For that, a panel

of ten volunteers (7 women and 3 men) were recruited, based on their motivations for participating. All panelists gave their free and informed consent and received compensation for their participation. They were asked to not eat or drink for at least 1h before the study sessions.

All sensory analyses were carried out in an air-conditioned room (20 °C), in individual booths, under white light. Samples were labeled with randomly selected three-digit numbers. The samples were balanced following a Williams' Latin square experimental design order across panelists taking

care to avoid carry-over effects. Panelists were provided with mineral water (Evian, Danone, France) and a piece of apple to rinse their mouth and to limit persistence between samples.

2.4 Sensory profile and Check-All-That-Apply test

First of all, generation and selection of attributes was performed by the panel, conducting to the final reduced list of six attributes: bitter, pea, roasted/grilled, cheese/rind, fresh cream/butter and fruity. Training sessions were thus proposed to panelists, focused on attributes definition, ranking and intensity evaluation. For session evaluation, each of these six attributes was evaluated for the 14 samples by using a 10-point unstructured intensity scale and Fizz Acquisition software (Version 2.47A, Biosystemes, France). Samples were presented in monadic sequential mode in duplicate. A set of six products by session was proposed, leading to a total of 5 sessions of evaluation. At the end of the profiling assessment, the panel performances were validated in terms of global and individual homogeneity, discrimination ability and repeatability, using XLStat software (Version 2010.4.02, Addinsoft, France).

In complement to the reduced profile test, panelists could describe the product by checking complementary attributes. For that CATA test was performed containing 38 sensory attributes, organized in 6 families, as proposed in **Table 23**. The attributes were selected based on previous studies. Panelists were asked to check all the attributes (in complement to sensory profile) that they considered appropriate to describe each sample, using Fizz Acquisition Software (Biosystèmes, France).

Table 23. List of attributes used for CATA questionnaire presented in 6 classes

<i>Attribute classes</i>	Vegetal	Roasted/Grilled	Lactic	Fruity	Other	Taste
<i>Attributes</i>	Pea	Dried fruit	Butter	Citrus	Ethanol	Sweer
	Garlic/Onion	Smoked	Cooked milk	Banana	Sulfur	Bitter
	Potato	Dark chocolate	Fres hcream	Pineapple	Moldy	Acid
	Grass	Bread	Yoghurt	Apricot	Rancid	Salted
	Woody	Roasted/Grilled	Cheese	Apple		
	Fermented grass	Coffee	Rind	Fermented fruit		
		Spices	Acid curd			
		Burned	Fresh curd			
	Brioche	Whey				

2.5 Physicochemical characterization

Volatile and non volatile compounds in samples were identified by Gas-Chromatography coupled to Olfactometry and by ultra-high performance liquid chromatography.

2.5.1 Extraction and identification of volatile flavour components from fermented gels

Olfactometry experiments were conducted on four types of fermented gels: VEGAN-Pea gel, MEGAN-V pea gel, MEGAN-A mixed gel and MEGAN-V mixed gel, and on two non-fermented control gels: pea control and mixed control.

In order to study the impact of microbiological starters on composition of volatile flavor compounds, these last were identified in fermented gels by gas chromatography. For this part, only gels fermented by two microbial starters were studied. For pea gels, control sample, VEGAN-gel and MEGAN-V gel were analyzed, and for mixed gels, control sample, MEGAN-A gel and MEGAN-V gel were analyzed, conducting to 6 different products.

For all tests, samples were diluted 1/10 with cold Milli-Q water (Merck Milipore, Merck KGaA, Germany) at 4°C. Five milliliters of the mixture were homogenized using a Polytron® PT 2100 (VWR, Radnor, USA 10000g x 3S), and were placed in a water-jacketed purge and trap apparatus (purge and trap concentrator, Tekmar-Dohrman 3100, Tekmar, USA) at 40 °C (purge: 40°C/15min; Desorb: 225°C/2min) coupled to a gas chromatograph (Agilent technologies 3800) and a mass spectrometer detector (MSD 5975C, Agilent Technologies). The apparatus was equipped with a non-polar capillary column (DB-WAXs Polyéthylèneglycol 30 m x 0.25 mm; film thickness of 0.25 µm; Agilent 122-7032, USA). Oven temperature increased from 40°C to 60°C at a rate of 1°C/min then to 110°C at a rate of 2°C/min and to 220°C at a rate of 20°C/min.

Eight to ten panelists were selected from the sensory panel to perform olfactometry measures based on their motivation and availability. These eight panelists were already familiar with olfactometry analysis. They were instructed to signal each odour perceived throughout the sniffing session by pressing a push button. They were asked to describe verbally the perceived odour. Sniffing sessions lasted 25 min. All analysis (for each product and each panelist) were conducted in duplicate. Thus, two aromagrams and two chromatograms were obtained per panelist and per sample. Recording of vocabulary items was launched at the “start of injection” of the sample into the chromatography column. Olfactory classes were defined during data processing in order to highlight the key-odour zones of an aromagram. The identification of the volatile aroma compounds, corresponding to odour perceived by the panelists, was conducted by comparison of GC–MS and GC–

olfactometry experimental retention indexes, then by comparison between theoretical and experimental description.

2.5.2 Extraction and identification of non-volatile components from gels

To identify non-volatile compounds in gels, ultra-high performance liquid chromatography (LC-MS) was performed. Samples were diluted 1/5 with cold Milli-Q water (MerckMilipore, Merck KGaA, Germany). The mixture was homogenized using a Polytron® PT 2100 (VWR, Radnor, USA) and were centrifuged for 10mn at 10000g at 4°C. Supernatant was poured on Vivaspine pipe (filtration at 10000 Dalton) and centrifuged for 30mn at 8000g at 4°C. Filtrate solution was diluted at 1/10 with ultra-pure water quality HPLC-MS with 1% of LC MS formic acid.

These analyses were performed with an ultra-high performance liquid chromatography (Ultimate 3000, Thermo Fisher) coupled with a high resolution mass spectrometer (hybrid quadrupole - Orbitrap, Q-Exactive) on a Hypersil Gold Phenyl column (25903-152130 Thermo Fisher, 150 mm x 2.1 mm; granulometry 3 µm, oven temperature 25 °C). The mobile phase used was composed of ultra-pure quality water HPLC-MS, of acid nonafluoropentanoïque at 3mM and of acetonitrile quality HPLC-MS (0.25 mL/min, 120 bar, 14 min). Detection was realized with a diode array detector (scanning from 200 to 400 nm), a complete spectrum in positive ionization and a range of masses between 60/850 u.m.a. The HPLC-MS data were analysed with Trace Finder (Thermo Fisher) software using retention time and the ratio m/z.

2.6 Statistical analysis

Data analysis was performed using XLSTAT (Addinsoft, Paris, France, 2009) and Fizz Data Treatment (Biosystemes® 1999). For each sensory attribute, an ANOVA with product and subject as main effects and their interaction was performed to investigate the performance of the panel and to determine which attributes can significantly discriminate the products. When significant differences between products were revealed ($p < 0.05$), mean intensities were compared using the Newman-Keuls multiple comparison test to form different groups of products. Principal Component Analysis (PCA) was also performed on average data. In order to estimate the significance of differences between means, CATA test was conducted, followed by Cochran test at the 5% level. In addition to this, a Factorial Multiple Analysis (FMA) was performed to analyze the sensory profile and the initial volatile fingerprints as subsets of variables. The RV coefficient was calculated between the first two axes of the samples partial configuration to analyse similarity between sample configurations.

3. Results and discussion

3.1 Description of the flavor of fermented and non-fermented gels

The impact of fermentation on sensory characteristics was analyzed by sensory profile and CATA analysis. Only profile results are presented in this paper because the CATA analysis brought no other or supplementary sensory dimensions to characterize the samples. Results of sensory profile showed that fermented and non-fermented pea gels were perceived significantly different on bitter, pea and fresh cream perceptions (**Fig32**). More specifically, ANOVA results showed that all fermented pea gels were characterized by a higher intensity in bitterness and a lower intensity of fresh cream perceptions than those of the pea control ($P < 0.05$). Pea perceived intensity decreased after three days of fermentation for all consortia except for the MEGAN-V consortium. Fruity and cheese/rind perceptions were not modified by fermentation whatever the consortia used. Compared to the control sample, roasted/grilled notes were only perceived as lower in the MEGAN-V fermented gels.

For mixed gels, perception between fermented and non-fermented mixed gels was different in bitterness, cheese/rind and fresh cream notes (**Fig33**). Fermented mixed gels were perceived more intense in bitter and cheese/rind, and less intense in fresh cream than the non-fermented mixed control. Moreover, in fermented mixed gels, pea notes and fruity notes were perceived similarly to control sample (except in mixed-MEGAN-A and in VEGANgels which fruity note increased compared to control sample).

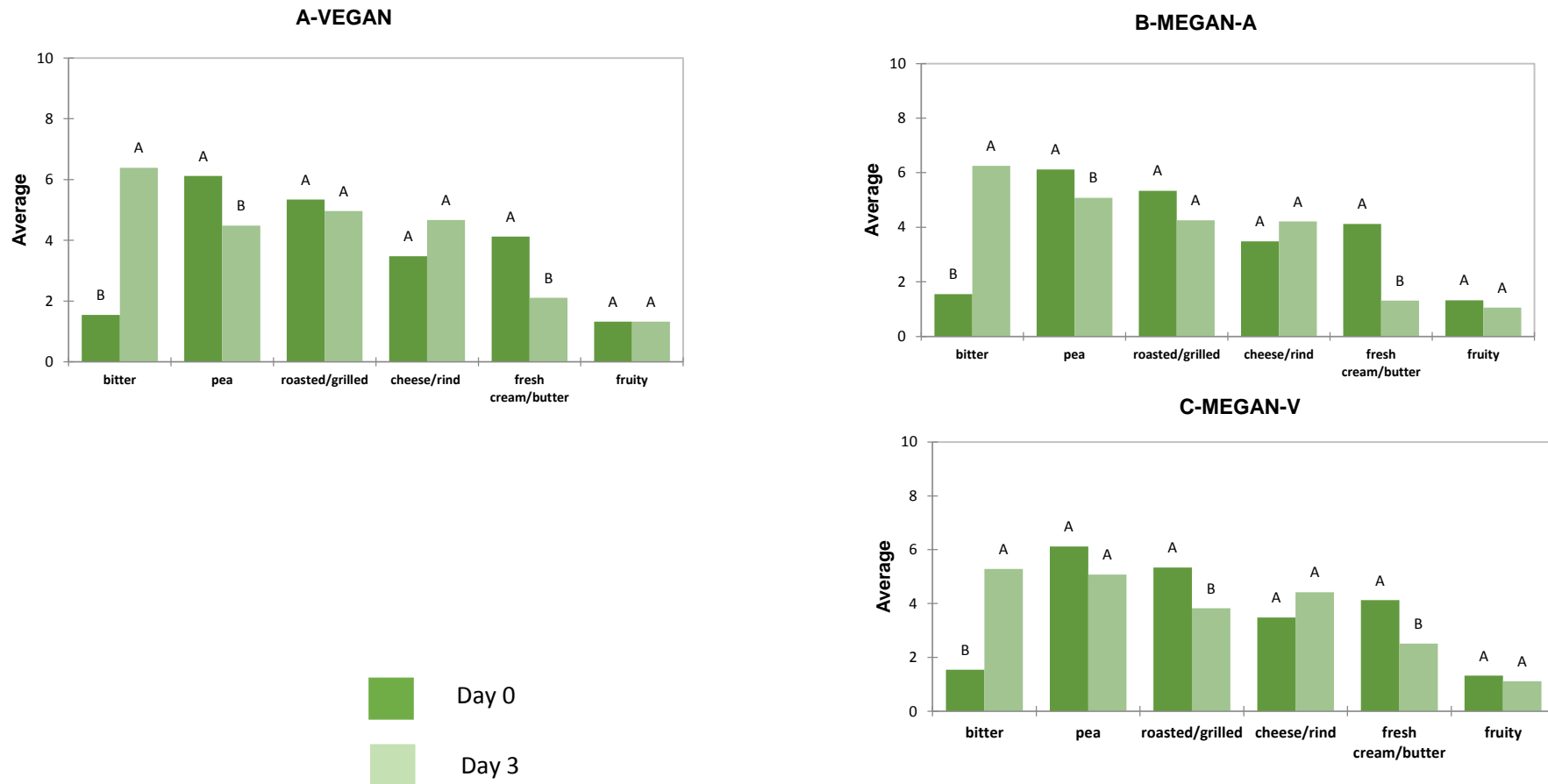


Figure 32. Average intensities of the sensory attributes evaluated during descriptive sensory analysis by panelists for pea gels. Fermentation effect between control sample (not fermented pea gel) and fermented sample (after three days of fermentation) determined by ANOVA on each sensory attribute. Letters A and B indicate means that significantly differ between products at $P < 0.05$ (Newman-Keuls test). A: VEGAN consortium, B: MEGAN-A consortium, C: MEGAN-V consortium.

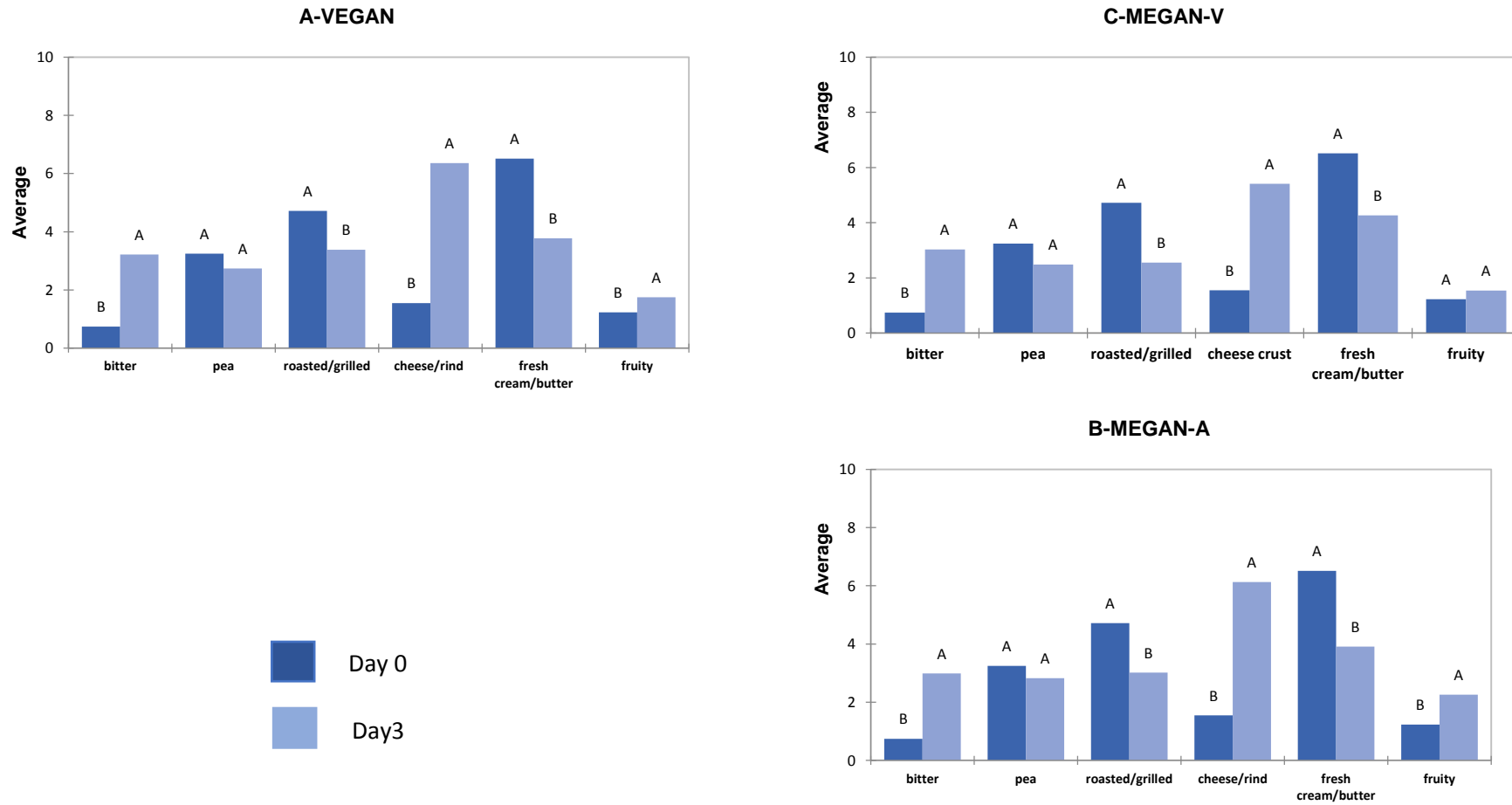


Figure 33. Average intensities of the sensory attributes evaluated during descriptive sensory analysis for mixed gels by panelists. Fermentation effect between control sample (not fermented mixed gel) and fermented sample (after three days of fermentation) determined by ANOVA on each sensory attribute. Letters A and B indicate means that significantly differ between products at $P < 0.05$ (Newman-Keuls test). A: VEGAN consortium, B: MEGAN-A consortium, C: MEGAN-V consortium

3.2. Description of the volatile compounds identified from GC–O analyses

The objective of olfactometry measurements was to highlight key aroma compounds developed in fermented gels for each type of matrix in comparison to control samples. Results showed no repetition effect with a threshold of 5% for all molecules, whereas significantly differences between the different fermented samples in comparison to non fermented gels were observed in the composition in volatile compounds ($P < 0.05$) (**TableS7**). For result presentation, we chose to present only the main odorant events, which presented more than 65% of the percentage of detection.

In pea control sample, 7 main odorant events (on 24 odorant events in total) were highlighted and could be linked to volatile molecules (**Tab24**). All odorant zones were mainly focused on vegetable and roasted/grilled notes. The most perceived events in terms of frequency of citation were linked to hexanal molecule, detected by 100% of the panelists and described as vegetal notes; 3-methylbutanal, detected by 85% of the panelists, was mainly described as roasted/grilled notes; propanal was detected by 70% of panelists and described by vegetal and lactic notes; pentanal was also detected by 70% of panelists and described as roasted/grilled notes. Acetaldehyde, butanal and propan-2-one were detected by 65% of panelists and described as lactic, vegetal and roasted/grilled notes respectively. In pea-VEGAN gels, 4 main odorant events (17 odorant events in total) could be linked to volatile molecules. The most perceived events in terms of frequency were associated on lactic notes due to the presence of acetaldehyde detected by 100% of panelists. 3-methylbutanal was perceived by 85% of panelists and described as roasted/grilled notes. Roasted/grilled notes were also generated by the presence of 2-methylbutanal and propan-2-one that were detected by 85% of panelists. In pea-MEGAN-V gels, 4 main odorant events (11 odorant events in total) could be linked to identify volatile molecules. These compounds were globally described by different odours such as fruity, lactic and roasted/grilled notes. The most perceived events in terms of frequency were linked to 2-methylpropanal and ethyl-2-methylpropanoate detected by all panelists and described as roasted/grilled and fruity notes respectively; pentan-2-one detected by 94% of panelists as lactic notes and ethyl 3-methylbutanoate detected by 88% of panelists as fruity notes.

In comparison to pea control, the perception of green notes in VEGAN and MEGAN-V fermented gels decreased considerably with the disappearance of molecules responsible for the beany notes such as hexanal and butanal. Interesting notes were appeared such as fruity and lactic notes. Some molecules were perceived differently between two samples due to the variation of their concentration in gels, for example, 3-methylbutanal was perceived as roasted/grilled and vegetal in

pea control and only roasted/grilled in VEGAN-gel. These differences can be explained by the increasing in the concentration of 3-methylbutanal during fermentation.

Table24. Odorant compounds identified in the pea gels: control sample (not fermented gel), pea VEGAN gels and pea MEGAN-V gels (after three days of fermentation). Blue: lactic zone, red; fruity zone, yellow: roasted/grilled zone and green; vegetal zone

RT	Compounds	CAS number	Experimental descriptors	% detection
Pea control (non-fermented gel)				
5.85	acetaldehyde	75-07-0	lactic (9), not identified (4)	65
6.52	propanal	123-38-6	vegetal (9)lactic (5)	70
6.8	propan-2-one	64-64-1	roasted/grilled (5), vegetal(4), other (4)	65
7.63	butanal	123-72-8	vegetal (9), lactique (4)	65
8.49	3-methyl butanal	590-86-3	roasted /grilled (10), vegetal (7)	85
10.2	pentanal	110-62-3	roasted/grilled (14)	70
16.88	hexanal	66-25-1	vegetal (20)	100
Pea-VEGAN				
5,85	acetaldehyde	75-07-0	lactic (12), not identified (5), other (3),	100
6,8	propan-2-one	64-64-1	roasted/grilled (10), fruity (7)	85
8,28	2-methyl butanal	96.17.3	roasted/grilled (11), vegetal (6)	85
8,49	3-methyl butanal	590-86-3	roasted/grilled (17)	85
Pea-MEGAN-V				
8.1	2-methylpropanal	78-84-2	roasted/grilled (11),vegetal (2), lactic (3)	100
11.6	ethyl-2-methylpropanoate	97-62-1	fruity (16)	100
12.1	pentan-2-one	107-87-9	lactic(10), fruity (4), roasted/grilled (1)	94
16.5	ethyl 3-methylbutanoate	108-64-5	fruity (14)	88

Tab25 shows results associated with mixed gels. In the mixed control gel, 4 odorant events (17 odorant events in total) could be linked to volatile molecules. These compounds were globally described by different types of odor mainly characterized by roasted/grilled and vegetal notes. The most perceived events in term of frequency of citation were linked to hexanal detected by 95% of panelists and described as vegetal notes; 2-methylbutanal and 3-methylbutanal were detected by 85% of panelists and described mainly as vegetal notes by the panelists. However other notes appeared as roasted/grilled and fruity notes due for example to the presence of propan-2-one detected by 84% of panelists respectively. In the MEGAN-A mixed gel, 5 odorant events (13 odorant events in total) could be linked to volatile molecules. The most perceived event in term of

frequency was linked to butane-2,3-dione detected by all panelists and described with butter notes. The molecules 2-methyl butanal and 3-methylbutanal were detected in this fermented gel and described by lactic notes, contrary to before fermentation in which vegetal notes were perceived. In the MEGAN-V mixed gel, 5 odorant events (10 odorant events in total) could be identified with volatile molecules. The most perceived events in term of frequency of citation were linked to 2-methyl propanal, detected by 100% of panelists and described as roasted/grilled notes; 2-methylbutanal or 3-methyl butanal detected by 93% of panelists and described as also roasted/grilled notes. Fruity notes appeared and could be due to the presence of ethyl-2-methylpropanoate and methylsulfanylmethane. Butane-2,3-dione was also detected by 93% of panelists and described as lactic notes. In comparison to mixed control, the perception of green notes after fermentation decreased considerably. Interesting notes appeared such as fruity and lactic notes.

In conclusion, the control gels were mainly characterized by the presence of aldehydes, affecting the overall perception with “green notes”. Aldehydes could be derived from either enzymatic or auto-oxidation of fatty acids - mainly linoleic and linolenic acids - present in peas (Murat *et al.*, 2013). Hexanal was characterized by fatty, green, grassy odor in pea and mixed gels (Azarnia *et al.*, 2011). The fermentation of gels led to a significant reduction in the total area counts of aldehydes. Besides, some volatile compounds were generated following fermentation. This is typically the case of 2-methylbutanal in VEGAN- pea gels - arising from isoleucine catabolism (Smit *et al.*, 2005)- which have malt, chocolate, roasted coffee notes. The presence of roasted/grilled notes in the fermented pea gels could also be associated with the proteolysis of vicilin in pea proteins by the action of micro-organisms. It has been shown that these peptides are responsible for the formation of the cocoa-specific aroma components during the roasting process. These components are obviously generated from the cocoa vicilin by the co-operative action of an aspartic endoprotease and a carboxy peptidase present in ungerminated cocoa seeds (Voigt *et al.*, 1994). Considering MEGAN-V consortium, fermentation of pea or mixed gels revealed the accumulation of esters, such as ethyl-2-methylpropanoate, ethyl 3-methylbutanoate due to growth of micro-organisms in particular yeast. Esters are well known to contribute to typical fruity notes in fermented products (Liu *et al.*, 2004). The 3-methylbutanoate is a fatty acid found in peas, soya, bean and other common food products (milk, fruits, cheese...). This acid can be produced as a bacterial metabolite during the leucine metabolism (Vergnais *et al.*, 1998). The presence of ethyl 3-methylbutanoate was previously reported by (Czerny and Schieberle, 2002) during the fermentation of lupin wheat flour. In agreement with this, preliminary studies of (Bader *et al.*, 2009) showed that 3-methylbutanoic acid, naturally present, considerably increased upon storage of the lupin seeds, probably due to microbial spoilage.

Table 25. Odorant compounds identified in the mixed gels: control sample (not fermented gel), mixed MEGAN-A gels and mixed MEGAN-V gels (after three days of fermentation). Blue: lactic zone, red; fruity zone, yellow: roasted/grilled zone, and green; vegetal zone

RT	Compounds	CAS number	Experimental descriptors	% detection
Mixed control (non-fermented gel)				
6.8	propan-2-one	64-64-1	roasted/grilled (11/16), fruity (2/16), vegetal (3/16)	84
8.28	2-methylbutanal	96.17.3	vegetal (7/17), not identified(6/17), lactic (4/17),	85
8.49	3-methylbutanal	590-86-3	vegetal (8/17),not identified (5/17), lactic (3/17),	85
16,88	hexanal	66-25-1	vegetal (19/20)	95
Mixed-MEGAN-A				
5.85	acetaldehyde	75-07-0	lactic (10/16), other (3/16), not identified (3/16),	80
8.1	2-methylpropanal	78-84-2	roasted/grilled (11/16), lactic (5/16)	80
8.28	2-methylbutanal	96.17.3	lactic (8/20), roasted/grilled (5/20),fruity (3/20), not identified (4/20),	100
8.49	3-methylbutanal	590-86-3	lactic(6/19),roasted/grilled(5/19),fruity(2/19), not identified (4/19), vegetal (2/19)	95
9.96	butane-2,3-dione	431-03-8	lactic (20/20)	100
Mixed-MEGAN-V				
8.1	2-methylpropanal	78-84-2	roasted/grilled (12/16), vegetal (2/16), lactic(2/16)	100
8.3	2-methylbutanal or 3-methylbutanal	96-17-3/590-86-3	roasted/grilled (11/14), vegetal (1/14), lactic(1/14), fruity (1/14)	93
9.96	butane-2,3-dione	431-03-8	lactic (12/14), fruity (2/14),	93
11.6	ethyl-2-methylpropanoate	97-62-1	fruity (14/14)	93
16.2	methylsulfanyl methane	624-92-0	fruity (12/12)	80

3.3 Identification of non-volatile components from fermented gels

16 amino acids were identified by LC-MS in fermented and not fermented gels. To illustrate their presence in the different fermented gels, a Principal Correspondence Analysis (PCA) was performed (**Fig34**). The first axis of the map, explaining 54.1% of the total variance, could separate pea and mixed gels. Except for the pea-VEG gels and control pea gels, characterized by a low amount of amino acids, and loaded negatively on the F1 and F2 axis, the other fermented pea gels (Pea-MEG-V, Pea-MEG-A) were characterized by high quantities of amino acids such as phenylalanine, leucine, valine, tyrosine, alanine and isoleucine. The fermented mixed gels could be clustered in two groups: the first group included mixed-VEGAN and mixed-MEGAN-V, characterized by a low concentration of amino acids similarly to control sample. The second group of products, composed with Mixed-

MEGAN-A, was characterized by a high amount of free amino acids like aspartic acid, glutamic acid and histidine. This result can be supposed that proteins in the control samples would be degraded into free amino acids during fermentation process, as suggested by (Gobbetti *et al.*, 1994).

3.4 Relationships between sensory characteristics, and volatile and non-volatile components in fermented gels

In order to study relations between sensory perception, volatile and non-volatile components of pea and mixed gels, a Multiple Factorial Analysis (MFA) was performed (**Fig35**). The first and second dimensions of this MFA of gels explained 64.9% of the information. The roasted/grilled notes, loaded positively on the F1 axis and negatively on the F2 axis, were mainly associated with some volatile molecules like furan2-pentyl and furan2-ethyl. The fruity notes, loaded positively on the F2 axis and negatively on the F1 axis, were associated to the presence of alcohols like ethanol, ethyl acetate and aspartic acid. Esters are well known to contribute to typical fruity notes in fermented products (Liu *et al.*, 2011). Results show that cheesy/rind notes were related to protein degradation and presence of free amino acids such as threonine and alanine.

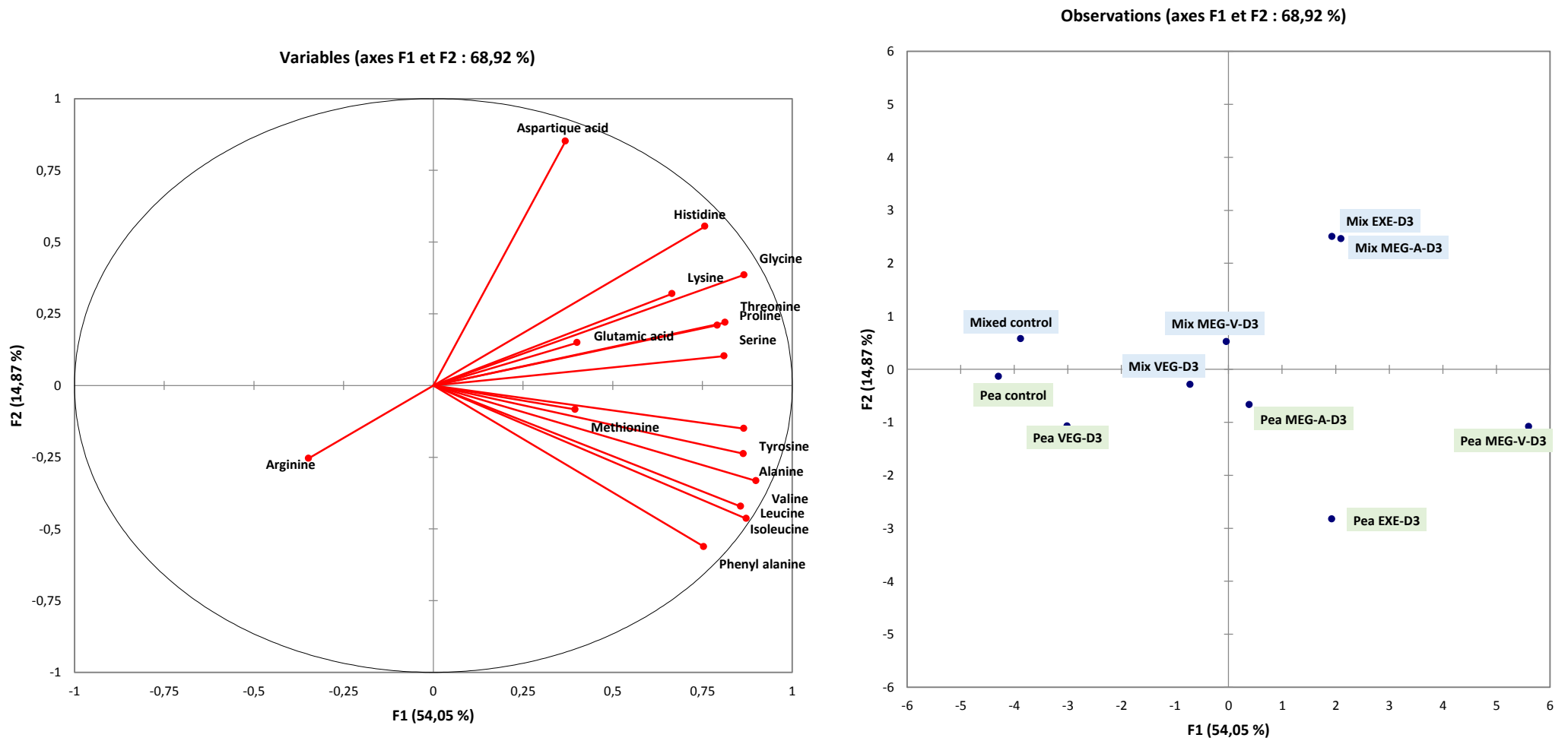


Figure 34. Amino acid composition of pea and mixed gels (not fermented gel and fermented gel at three days). A: map of amino acids composition, B: map of products (Blue: mixed gels, Green: Pea gels)

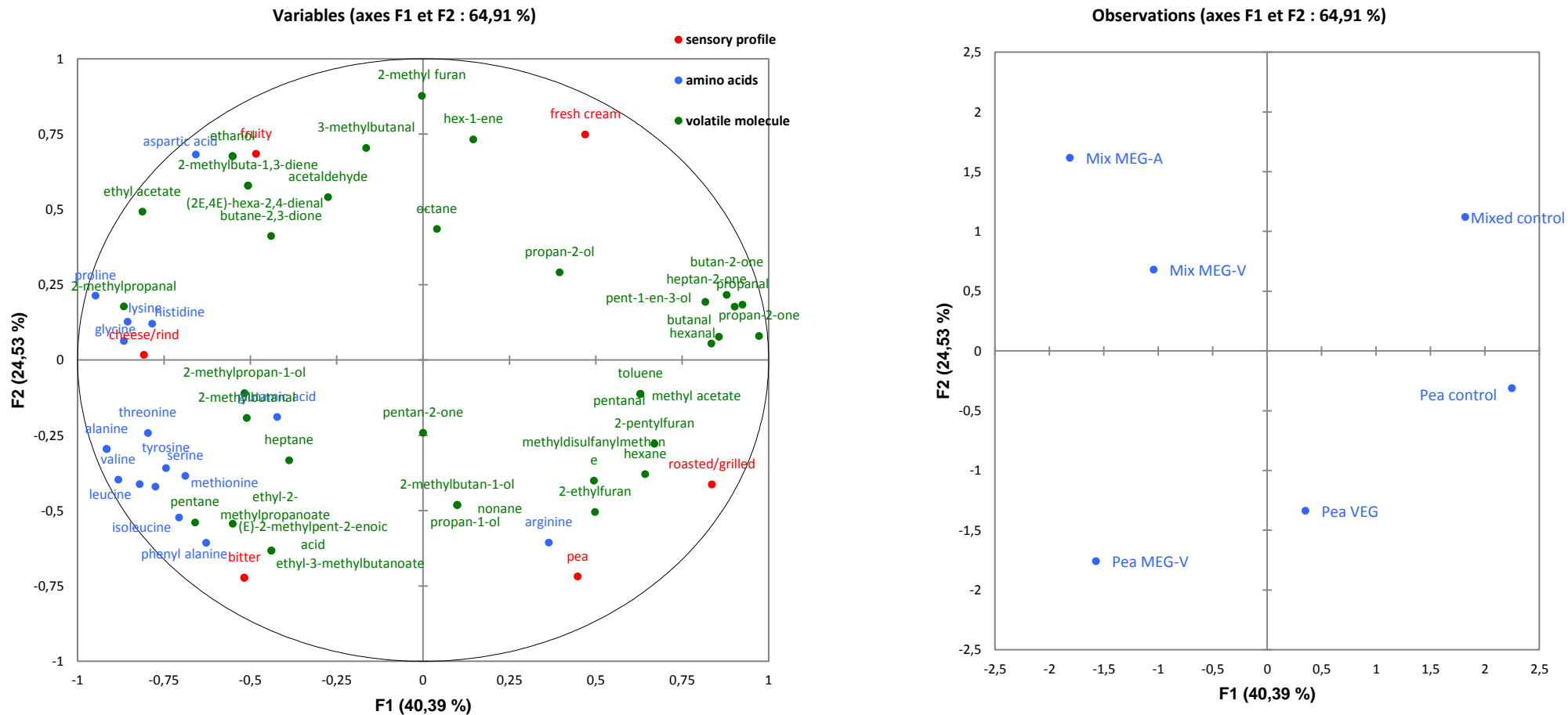
Bitterness perception was mainly related to the presence of high quantity of hydrophobic amino acids like phenylalanine, valine and isoleucine, which could have been generated by the degradation of proteins during fermentation. This result is in agreement with literature, because bitterness is often attributed to the release of low molecular weight peptides containing hydrophobic amino acid residues, particularly leucine and phenylalanine (Roudot-Algaron, 1996), although the exact cause is not fully understood and conflicting research exists in the literature. The hydrophobicity, primary sequence, spatial structure, molecular weight, and bulkiness of peptides have been studied as possible influences for bitterness (Kim *et al.*, 2008). This explains that the bitterness present in the other samples such as mixed gels could be related to other factors. Pea fermented gels were perceived more intense in bitterness than mixed gels, probably due to the presence of a higher concentration of pea proteins in pea gels.

4. Conclusion

This study was conducted to investigate the effects of fermentation with different microbial cultures on the sensory properties of pea-based gels. The results demonstrated that a number of changes occurred during fermentation, which were due to modification of the composition in volatile and non volatile compounds, with consequences on the sensory properties of the fermented gels. According to assessment of aroma profile, roasted/grilled notes were characteristics of the pea-VEG gels, contrary to pea-MEG-V gels characterized by fruity and roasted/grilled notes, lactic notes for mixed-MEG-A gels, and fruity and roasted/grilled notes for mixed-MEG-V gels. A major result is that specific green notes of pea, associated to the presence of aldehydes such as hexanal, decreased thanks to fermentation. In mixed gels, the cheesy notes increased, but the pea notes did not change after fermentation with all microbial starters. In pea gels, the pea notes decreased with all microbial starters in except of MEGAN-V. Besides, the bitterness perception increased during fermentation, whatever the used microbial starters in all tested gels. Some links allow to advance in the knowledge of the mechanisms at the origin of the perceptions of beany and bitterness flavors, but these perceptions stay multidimensional and complex.

5. Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the Carnot Qualiment Institute for its financial support. The authors also thank Anne Sophie Sarthou, Manon Surin and David Forest for their technical support. S. Ben-Harb thankfully acknowledges the Tunisian Ministry of Higher Education for the PhD fellowship that helped fund this research.



Chapitre III. Discussion générale

Les travaux réalisés dans le cadre de ce projet de thèse ont permis de mettre en avant des avancées scientifiques, tant au niveau de la connaissance des protéines de pois, de leur comportement au cours de la coagulation seules ou associées à d'autres types de protéines (protéines de lait), qu'au niveau de la fermentation et de la mise en œuvre de consortia microbiens adaptés à ce type de produit. L'objectif de ce travail était d'étudier la fermentation d'un aliment enrichi en protéines végétales afin d'en améliorer ses qualités sensorielles. Il s'agissait d'un vrai challenge, autant scientifique que technologique puisque s'il existe des connaissances sur les produits traditionnels fermentés, la conception de nouveaux produits fermentés et les démarches associées, restent un sujet peu documenté. Pour répondre à cet objectif, une stratégie fondée sur la complémentarité des approches microbiologiques, sensorielles et physicochimiques a été mise en œuvre. Les objectifs de cette discussion générale sont de mettre en lumière certains points importants et mettre en lien l'ensemble des résultats de la thèse.

Dans une première partie, nous proposons de faire un focus sur les résultats liés à la structuration des matrices avant fermentation et les résultats clés. Il s'agit d'une partie importante qui a demandé du travail expérimental qui a demandé différentes mises au point. Puis, nous présentons les deux consortia microbiens sélectionnés pour chaque type de matrice (en suspension) ainsi que leurs caractéristiques. Ensuite, nous discuterons de l'impact de la structure de la matrice sur le développement des communautés microbiennes et les propriétés sensorielles des produits. Enfin les résultats associés à l'impact du temps de fermentation sur les propriétés des matrices seront discutés.

1. Structuration des matrices

Cette partie du travail avait pour objectif de développer une stratégie de formulation d'une matrice gélifiée type « fromage », enrichie en protéines végétales à des niveaux élevés (au minimum 50% de la teneur totale en protéines constitué de protéines végétales). En s'appuyant sur la littérature et la connaissance des experts aussi bien sur le volet production des matières premières que sur le volet transformation, les protéines de pois ont été choisies comme matière première dans le produit à développer. Deux matrices ont été choisies : une matrice végétale (100% protéines de pois) et une matrice mixte (50% protéines de pois/50% protéines de lait) avec une teneur en matière grasse de 10% (huile de colza). Une matrice laitière avec la même teneur en protéines (100% protéines de lait) et en matière grasse a été ensuite rajoutée et a servi de référence. La teneur en protéines était identique pour les trois types de matrice.

Des tests préliminaires ont été effectués pour choisir les conditions expérimentales : concentration en protéines, et conditions de gélification. Dans un premier temps, souhaitant une teneur élevée en protéine, nous avons cherché à obtenir une suspension stable (pas de décantation visible après 5h à 20°C sans agitation) contenant le maximum de protéines de pois. Une concentration de 14,8% en protéines de pois dans une solution à 1% de NaCl a été retenue. Dans cette suspension, la solubilité des protéines de pois était faible (26%), à son pH naturel ($7,17 \pm 0,02$) et à température ambiante. Cette faible solubilité peut probablement s'expliquer par un degré de dénaturation élevée suite au procédé d'extraction utilisé (Shand *et al.*, 2007). Si initialement nous pensions que la présence des protéines de lait pourrait améliorer la solubilité des protéines de pois, les résultats obtenus ont montré un effet inverse avec une diminution de la solubilité. Cet effet négatif pourrait être probablement mieux caractérisé en optimisant les conditions expérimentales choisies tels que le pH, la température, et les paramètres de centrifugation. En s'appuyant sur la littérature différents types de coagulation ont été identifiées pour l'obtention de gels de protéines de lait et/ou végétales : coagulation thermique, coagulation enzymatique et la coagulation acide (GDL). Pour les conditions de coagulation, différents tests ont été effectués pour sélectionner les conditions conduisant à la formation de gel pour la matrice végétale, mixte et laitière qui sont présentés dans le premier chapitre de la thèse. L'objectif est de former des gels qui se ressemblent le plus à une structure d'un gel « fromage ».

Les propriétés rhéologiques et de microstructure dépendent principalement du type de coagulation mais aussi de la composition de la matrice (type de protéines/présence ou non de la matière grasse). L'ajout de la matière grasse dans tous types de matrice renforce les propriétés mécaniques des gels. Pour la coagulation thermique (**90 ° C pour 1 h suivi d'un refroidissement à 20 ° C**), le mélange protéines de pois-protéines de lait permet d'avoir des gels comparables aux gels de protéines de pois seules et plus fermes que les gels à 100% protéines de lait. Dans ces gels thermiques, les protéines de pois ont un rôle important dans la création des gels mixtes, et ils ont probablement interagi avec les protéines de lactosérum conduisant à la formation de liaisons covalentes (Roesch and Corredig, 2005). Pour la coagulation enzymatique (**chymosine (0,5%) + transglutaminase (0,3%) et CaSO₄ (0,3%)**), le rôle respectif des enzymes dépend du type de protéines : la chymosine agit principalement sur les micelles de caséines de lait et la TGase agit sur les protéines de pois et aussi sur les protéines de lait (principalement sur les caséines). Les résultats ont montré que le mélange de protéines de lait-protéines de pois diminue les propriétés rhéologiques des gels (G') en comparaison aux gels obtenus à partir de protéines de lait ou protéines de pois seules mais en gardant le même degré d'élasticité. La coagulation enzymatique permet d'obtenir des gels les plus élastiques et résistants par rapport aux autres types de gels (acides et thermiques). Une grande quantité d'eau

emprisonnée à l'intérieur du réseau du gel peut expliquer cette propriété (Munialo *et al.*, 2014). Enfin, la coagulation acide (**2% GDL**) a permis de générer des gels de pois plus fermes que les gels mixte et lait. Le pH final de la matrice peut expliquer en partie les différences observées entre les différentes structures. En effet, le pH final des gels de pois était plus faible que celui des gels de lait et mixte probablement expliqué par le fort pouvoir tampon des protéines laitières. Le gel de pois, à son point isoélectrique (4,6), avait un module G' plus élevé que les gels lait et mixte. Ces résultats montrent qu'il existe une dynamique compétitive entre les protéines dans les mélanges et que le mécanisme de formation d'agrégats n'est pas le même dans des suspensions de protéines « pures » (une seule source de protéine) que dans des suspensions mixtes (deux types de protéines). Ces résultats sont en accord avec les résultats de Roasch et collaborateurs (Roesch *et al.*, 2005), qui ont confirmé ces hypothèses avec les mélanges de caséines et soja. Cette interprétation peut également expliquer les différences entre les gels mixtes et les gels pois et lait pour les coagulations enzymatique et acide.

2. Caractéristiques des consortia sélectionnés pour la suspension végétale et mixte

Cette partie du travail a décrit les résultats d'un large criblage mettant en œuvre 55 souches, appartenant à des groupes phylogénétiques variés (Firmicutes (G1), Actinobacteria et Proteobacteria (G2), et Eucaryotes (G3), testées en culture pure ou en association de 3 à 9 souches, soit un total de 320 associations. Ce criblage a conduit à sélectionner 10 associations pour chacune des deux matrices, pois et mixte pois/lait, sur la base de leur aptitude à moduler le profil aromatique (odeurs) de ces milieux, évalué par la méthode Check-All-That-Apply (CATA). Le développement des différentes souches de ces différents consortia a été caractérisé de façon plus approfondie en utilisant à la fois des méthodes culture-dépendantes et la technique de métabarcoding 16S pour les bactéries. Deux consortia ont ensuite été retenus, V10 pour fermenter le milieu pois, appelé VEGAN et M7 pour fermenter le milieu mixtes pois/lait, appelé MEGAN. Le choix de ces deux consortia a été basé sur les résultats d'évaluation sensorielle et microbiologique (**Tab26**). Pour la suite du travail, *Bacillus altitudinis* a été ensuite retiré du consortia VEGAN.

Tableau 26. Caractéristiques des consortia microbiens sélectionnés pour la suspension végétale et mixte

Consortia microbien	Type de matrice	Nom des espèces	Biomasse à J0 (UFC/MI)	Biomasse à J3 (UFC/MI)	pH	Descripteur les plus citées
M7 (MEGAN)	Matrice mixte	<i>Geotrichum candidum</i>	1,46E+07	1,45E+09	4,73 ± 0,02	Pomme Fruits fermentés
		<i>Kluyveromyces lactis</i>				
		<i>Lactobacillus rhamnosus</i>				
		<i>Lactococcus lactis sub. Lactis</i>				
		<i>Candida catenulata</i>				
V10 (VEGAN)	Matrice végétale	<i>Candida catenulata</i>	1,11E+06	1,47E+09	6,32 ± 0,03	Pain Fruits fermentés Fleur
		<i>Geotrichum candidum</i>				
		<i>Yarrowia lipolytica</i>				
		<i>Bacillus altitudinis</i>				
		<i>Brevibacterium antiquum</i>				
		<i>Brevibacterium casei</i>				
		<i>Hafnia alvei</i>				
		<i>Lactobacillus rhamnosus</i>				
<i>Leuconostoc lactis</i>						

3. Impact de la structure de la matrice sur le développement des communautés microbiennes et les propriétés sensorielles des produits.

Deux types de consortia microbiens (VEGAN et MEGAN) ont été testés en émulsions (culture planctonique) puis en structure gélifiée (culture solide). Des différences au niveau des propriétés sensorielles et microbiologiques ont donc été soulignées et sont présentées dans la **Figure 36**.

La matrice végétale (100% protéines de pois) a étéensemencée par le consortium VEGAN en émulsion et en gels. En émulsion, les produits se caractérisent par des notes « fleurs » alors qu'en structure gélifiée, ils se caractérisent par des notes plutôt « pois », « pomme de terre » et « fruits secs ». On observe un meilleur développement de *Yarrowialipolytica* et *Leuconostoc lactis* dans les gels que dans l'émulsion ainsi que la présence d'une quantité plus importante de composés volatils appartenant aux familles des alcanes, alcènes et hydrocarbures aromatiques. La matrice mixte (50% protéines de pois/50% protéines de lait) a étéensemencée par le consortium MEGAN en émulsion et en gel. En émulsion, ce type de produit se caractérise par des notes fruitées telles que « pomme » et « fruits fermentés » qui sont associées à la présence d'esters et d'alcools. A l'inverse, en structure gélifiée, ce type de matrice est caractérisé par des notes plutôt laitières telles que « crème fraîche » et « yaourt » associées à la présence des cétones.

Les différences entre les émulsions et les gels,ensemencés avec le même consortium microbien, peuvent être expliquées par les différences au niveau de quelques paramètres au cours de la fermentation, qui sont :

- Les suspensions liquides agitées permettent d'oxygéner l'émulsion par rapport aux gels solides et de rendre plus facilement disponibles les sources d'énergie du milieu.
- De plus la température de fermentation est de 28°C pour les émulsions et de 14°C pour les gels
- Texture : matrice liquide (émulsions) conduisant à une croissance planctonique, à l'inverse une croissance sous forme de bio films dans les matrices solides (gels).

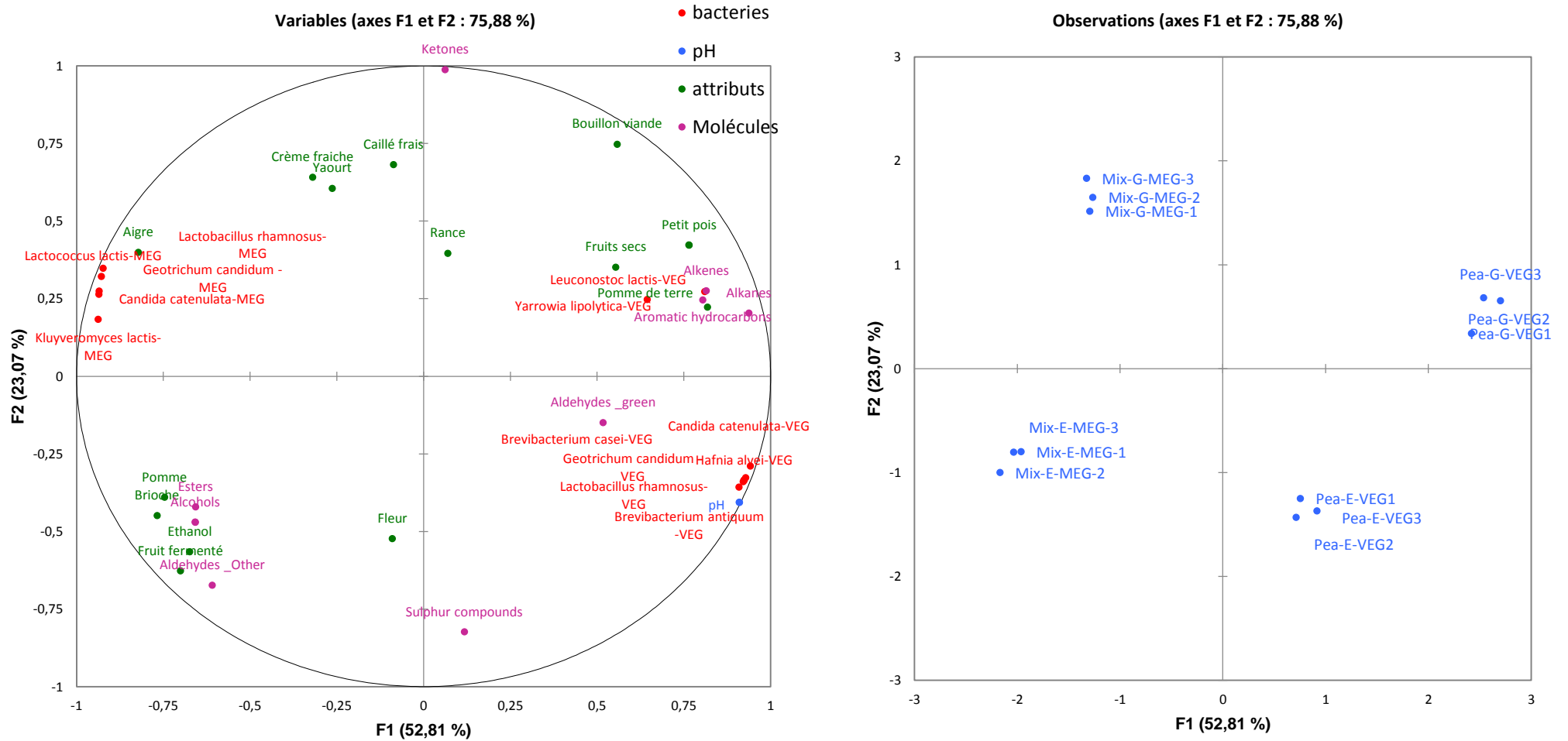


Figure 36. Analyse Factorielle Multiple (AFM) représentant les propriétés sensorielles, microbiologiques et analytiques des différents gels et émulsions fermentés avec deux types de consortia microbien VEGAN et MEGAN à trois jours. Carte droite : carte des produits fermentés (Tripliquats pour chaque produit sont présentés) ; carte gauche : carte des propriétés sensorielles, microbiologiques et physicochimiques associés aux produits. $RV(\text{souche-descripteurs})=0,52$. $RV(\text{souche-molécules})=0,52$. $RV(\text{molécules-descripteurs})=0,93$. MEG et VEG (attribuées aux souches) désignent le consortium MEGAN et VEGAN respectivement.

4. Maitrise de la flore endogène : impact de la matrice

Au cours de la fermentation, des isolats microbiens endogènes, non ensemencés, assignés au genre *Bacillus*, ont été détectés. Le genre *Bacillus* est connu pour être un puissant colonisateur dans les aliments végétaux. Il est même ensemencé de façon volontaire en tant que levain pour la fermentation alcaline de différents aliments à base de soja, de racines d'origine asiatique ou africaine (Steinkraus,1997, Tamang et al., 2016a,b). Les isolats issus des fractions de protéines de pois, sont assignés aux espèces *Bacillus licheniformis* et *Bacillus subtilis*, et semblent fortement adaptées à ce type de produit. Les résultats obtenus dans cette étude montrent que la croissance de cette flore endogène, présente initialement en sous -dominance dans les matrices fermentées est variable selon le type de fermentation (acide ou alcaline) générée mais aussi la composition des communautés microbiennes ensemencées.

La présence de lactose dans les émulsions mixtes a fortement influencé la fermentation, en réduisant fortement la valeur du pH du milieu par fermentation lactique, alors que l'absence de lactose dans les émulsions de pois a favorisé la fermentation alcaline. La fermentation lactique sert comme méthode de conservation des aliments car les bactéries lactiques exercent un effet antagoniste en inhibant les espèces pathogènes et les microflore indésirables telles que les espèces de *Bacillus*. Les activités antagonistes proviennent principalement de l'acidification du milieu, de la compétition entre les différentes espèces microbiennes présentes pour le substrat et de la production de composés antimicrobiens tels que les bactériocines (Tamang et al., 2009). La fermentation acide générée par les bactéries lactiques a conduit à l'inhibition de la flore acido-sensible y compris la flore endogène présente dans les protéines de pois. La majorité des bactéries lactiques ensemencées dans les matrices enrichies en protéines de pois, en particulier *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Leuconostoc lactis*, *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus plantarum* génère une diminution significative de la flore endogène type « *Bacillus* » (article 2). Pour éviter la contamination ultérieure par une flore endogène type *Bacillus*, la fermentation lactique doit être encouragée dans le cadre de la création de nouveaux produits enrichis en protéines végétales tel que le pois.

A l'inverse, la fermentation alcaline, générée dans les matrices pois exemptes de sucres, s'est avérée favoriser le développement de *Bacillus* dans ces matrices. Cependant, nous avons pu démontrer que la présence d'une flore microbienne abondante et diversifiée, présentant un fort potentiel de colonisation, permet d'inhiber et de limiter efficacement le développement de flores secondaires, indésirables et/ou pathogènes par effet barrière et/ou de production de substances antimicrobiennes (article 2).

5. Cinétique de fermentation : impact du temps de fermentation sur les propriétés des gels fermentés

Au cours de ces travaux de thèse, la fermentation des gels avec les différents types de consortia microbiens a été suivie durant trois et sept jours. Nous avons donc cherché à identifier l'impact du temps de fermentation sur les propriétés des gels fermentés. Pour cela, une carte AFM a été tracée permettant de mettre en lien toutes les données sensorielles, microbiologiques et physicochimiques associées aux produits fermentés (**Fig37**). Les gels végétaux (100% protéines de pois) fermentés, quels que soient les consortia microbiens inoculés, sont globalement toujours caractérisés par des notes vertes comme « pois », « herbe » et « boisé », à l'exception du gel fermenté avec le consortium VEGAN, caractérisé par des notes « fruits secs » et « grillé/torréfié ». Pour ce type de matrice, le temps de fermentation n'a pas d'impact sur les propriétés sensorielles alors que visuellement le gel pois après 7 jours de fermentation présente un aspect verdâtre avec une importante synérèse. Cette forte évolution visuelle des gels à 7 jours de fermentation a conduit à choisir les gels fermentés à 3 jours pour les analyses sensorielles. En ce qui concerne les gels mixtes et lait, le temps de fermentation n'a pas d'impact sur les propriétés des gels fermentés.

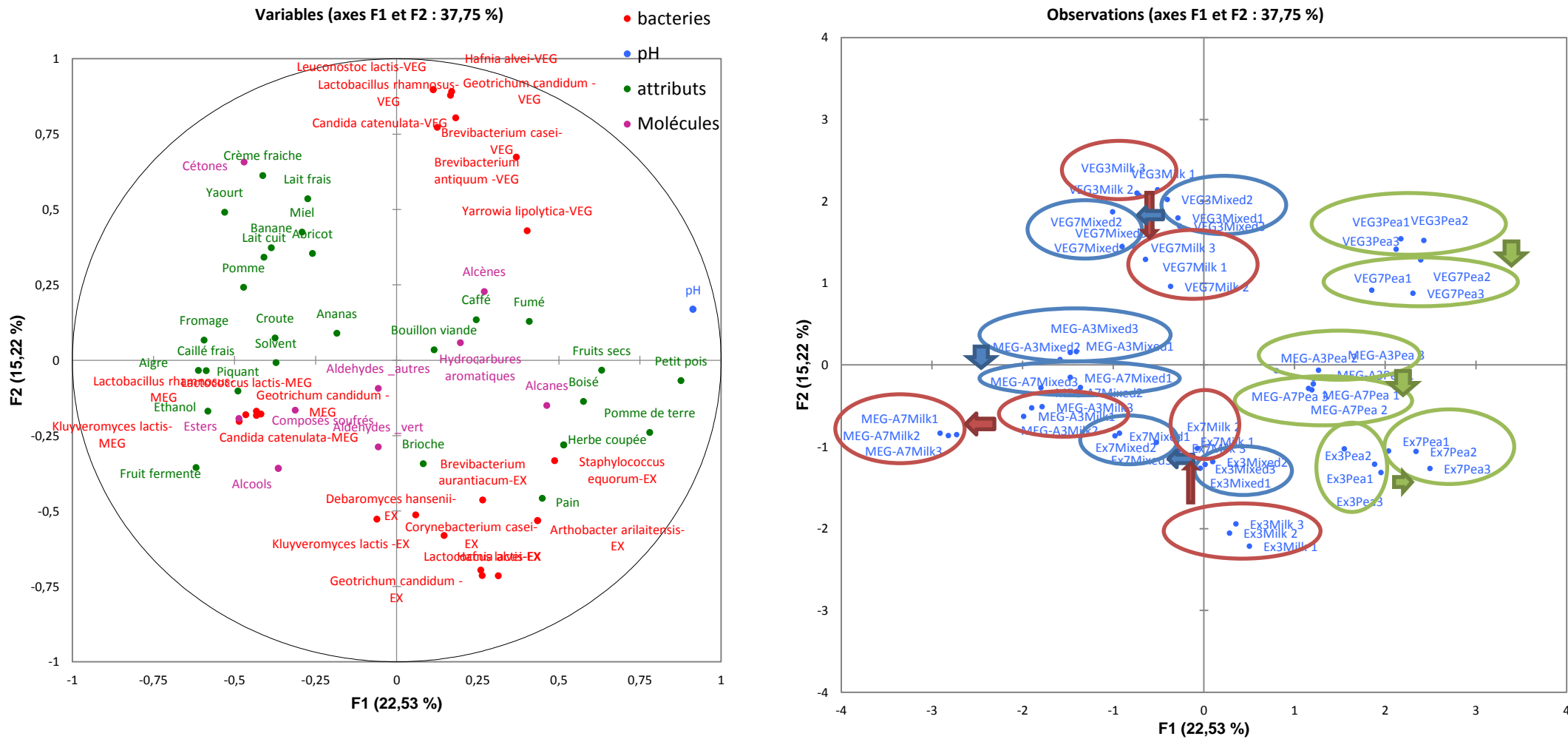


Figure 37. Analyse Factorielle Multiple (AFM) représentant les propriétés sensorielles, microbiologiques et analytiques des différents gels et émulsions fermentés avec trois types de consortia microbien (ExEco, VEGAN et MEGAN) à trois sept jours. Carte droite : carte des produits fermentés (Tripliquats pour chaque produit sont présentés, flèche représente l'évolution du produit de trois à Sept jours de fermentation) ; carte gauche : carte des propriétés sensorielles, microbiologiques et physicochimiques associés aux produits. $RV(\text{souche-descripteurs})=0,28$. $RV(\text{souche-molécules})=0,22$. $RV(\text{molécules-descripteurs})=0,34$. MEG et VEG (attribuées aux souches) désignent le consortium MEGAN et VEGAN respectivement.

Conclusions générales et perspectives

Proposer une offre alimentaire riche en produits végétaux appréciés par les consommateurs est un enjeu majeur permettant de tendre vers un système alimentaire plus durable. En effet, des défauts d'arôme, de saveur ou de texture ont été mis en évidence suite à l'incorporation de teneurs élevées en protéines végétales dans les aliments et en particulier de protéines de pois. Ces défauts sont un réel frein à l'acceptabilité des produits par les consommateurs. L'utilisation de ferments microbiens, composés de bactéries et de champignons offre un fort potentiel enzymatique de transformation et ainsi permet d'améliorer l'arôme des produits. Dans ce contexte, une démarche pluridisciplinaire, alliant physicochimie, microbiologie et analyse sensorielle, a permis d'étudier les bénéfices sensoriels apportés par la fermentation de gels riches en protéines de pois. Dans un premier temps, des matrices enrichies en protéines de pois ont été structurées et caractérisées. Puis, une sélection des communautés microbiennes avec des fonctionnalités cibles a été effectuée afin d'améliorer les propriétés sensorielles des produits. Enfin, la fermentation des matrices gélifiées a été étudiée avec une caractérisation fine de leur profil sensoriel (arôme et saveur) et de leur composition en molécules volatiles et en acides aminés libres.

Deux types d'émulsions contenant 10% de protéines et 10% d'huile de colza ont été étudiées : (i) la première est constituée de 100% de protéines de pois, et (ii) la deuxième est constituée d'un mélange de protéines de pois (50%) et de lait (50%). Sur la base de la connaissance de la matrice et des propriétés fonctionnelles des micro-organismes en particulier d'origine fromagère (protéolytique, aromatisante, texturante..), 56 souches microbiennes ont été sélectionnées. Une stratégie raisonnée d'assemblage des souches, basée d'une part sur la répartition équilibrée selon leur groupe phylogénétique, et d'autre part sur la connaissance experte des fonctions cibles aromatiques recherchées, a été mise en place. La croissance et l'abondance des micro-organismes dans les émulsions après trois jours de fermentation à 28°C ont été évaluées. Le potentiel aromatique des consortia a été cartographié par un panel sensoriel à l'aide de la méthode Check_All_That-Apply (CATA). En parallèle de la sélection des communautés microbiennes, différents types de coagulation ont été étudiés prenant en compte les contraintes liées au prétraitement des matières premières afin de réduire la flore endogène initialement présente dans les isolats protéiques de pois.

Ce travail de thèse a permis de montrer le fort potentiel d'implantation de la majorité des souchesensemencées pour l'émulsion végétale comme pour l'émulsion mixte. La composition de la matrice (type de protéines), le pH et la composition des communautés microbiennes modulent les voies métaboliques des différentes souchesensemencées et, par conséquent, le profil aromatique

produit. Des notes aromatiques spécifiques pour chaque émulsion ont été générées permettant de masquer la note végétale « verte » caractéristique du pois. Ainsi, deux consortia microbiens ont pu être sélectionnés sur la base de notes torrifiées et fruitées pour la matrice végétale (consortium VEGAN) et de notes fruitées/ lactiques pour la matrice mixte (consortium MEGAN). Ces consortia microbiens ont été sélectionnés en se basant sur (i) leur potentiel d'implantation dans la matrice, (ii) le profil aromatique et (iii) l'effet barrière contre la flore endogène (*Bacillus*). Des structures de gels offrant un large spectre de texture (crème dessert à pâte ferme) ont été également obtenus par les trois types de coagulation étudiés. Les propriétés rhéologiques et la microstructure de ces gels dépendent principalement du type de coagulation mais aussi de la composition de la matrice (type de protéines et présence ou non de matière grasse). Ensuite, les communautés microbiennes sélectionnées (VEGAN et MEGAN) ont étéensemencées dans les gels de pois et mixte, afin d'évaluer leur capacité de croissance et leur impact du point de vue sensoriel (arôme et saveur) et physicochimique. Une troisième matrice contenant 100% de protéines de lait et 10 % de matière grasse ainsi qu'un consortium modèle du fromage "Munster " (ExEco) ont été rajoutées et ont servi comme références. A l'issue de ces expérimentations, le travail de cette thèse a permis de montrer que le comportement des communautés microbiennes diffère d'une matrice à l'autre. En effet, le consortium VEGAN semble plus adapté pour la matrice végétale que les autres matrices, présentant ainsi des notes grillées/torrifiées. Le consortium MEGAN s'adapte bien aux matrices mixtes et lait générant des notes fruitées et fromagères. Ces résultats illustrent très bien la modulation des arômes des produits par le choix des écosystèmes microbiens. La dernière partie de cette étude a permis de mettre en évidence l'impact de la fermentation sur les défauts sensoriels des gels contenant des protéines de pois avec l'utilisation de différents consortia microbiens. Les résultats montrent que la fermentation permet de diminuer significativement les notes vertes de pois mais favorise l'amertume due à la libération d'acides aminés hydrophobes. Les notes vertes sont liées à la présence des composés volatils, alors que l'amertume est liée à la présence de composés non volatils dont en particulier les acides aminés hydrophobes.

Cette étude a donc permis de sélectionner des groupes spécifiques de souches microbiennes, capables de coloniser et de produire des arômes d'intérêt dans des matrices enrichies en protéines de pois. Ce projet de thèse démontre une preuve de concept de formulation de produits alimentaires innovants. Ce travail a permis d'acquérir des connaissances transférables à d'autres types de végétaux et pour d'autres matières premières moins raffinées (graine, farine). Il serait intéressant pour compléter cette étude d'étudier l'impact de la fermentation sur la digestibilité des protéines de pois, un paramètre qui peut être également considéré comme un frein à la consommation de ce type de protéines.

Actuellement des entreprises travaillent sur le développement de nouveaux produits enrichis en protéines végétales, acceptables par les consommateurs et qui s'adaptent au mode de vie du 21^{ème} siècle. Ces nouveaux produits pourraient contribuer à changer l'image des protéines végétales qui sont encore considérées comme l'aliment des pauvres. La consommation de protéines végétales en alimentation humaine doit être rendue plus attractive en jouant à la fois sur leurs origines, leurs caractéristiques nutritionnelles, organoleptiques, fonctionnelles et économiques. La montée du végétarisme et du flexitarisme en France et en Europe alimente la tendance à incorporer plus de protéines végétales dans les produits. Avec une image positive (bonne pour la santé et éco-respectueuses), les protéines végétales possèdent un potentiel fort de croissance dans les régimes alimentaires. Il est toutefois nécessaire pour cela de poursuivre l'éducation du consommateur pour lui expliquer ce que sont les protéines végétales, dans quelles denrées elles se trouvent et l'intérêt qu'elles peuvent présenter. Cette tendance ne doit pas venir en opposition à la consommation de viande, mais plutôt souligner la complémentarité nécessaire de ces deux sources de protéines qui se complètent en particulier pour l'apport en acides aminés par exemple.

A plus long terme, ce projet s'inscrit dans une démarche de développement de nouveaux produits inspirés de procédés traditionnels. Pour aller plus loin, il serait intéressant de mieux cibler les attentes des consommateurs sur des produits « fromage végétal affiné ». L'intégration des préférences des consommateurs dès les premières étapes de conception permettra ainsi de développer de nouveaux produits enrichis en protéines végétales aux propriétés nutritionnelles et sensorielles optimisées.

Références

A

- Adda, J., Dekimpe, J., Vassal, L., Spinnler, H.-E., 1989. Production de styrène par *Penicillium camemberti* Thom. *Le lait* 69, 115–120.
- Aiking, H., 2011. Future protein supply. *Trends Food Sci. Technol.* 22, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.005>
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Alexandraki, V., Tsakalidou, E., Papadimitriou, K., and Holzapfel, W. H. (2013). Status and Trends of the Conservation and Sustainable Use of Microorganisms in Food Processes. Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture. FAO Background Study Paper No. 65.
- Amoa-Awua, W.K., Terlabie, N.N., Sakyi-Dawson, E., 2006. Screening of 42 *Bacillus* isolates for ability to ferment soybeans into dawadawa. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 343–347. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.08.016>
- Ang, E.C., Boatright, W.L., 2003. Olfactory perception of major odorants found in the headspace of aqueous soy protein isolate slurries. *J. Food Sci.* 68, 388–393.
- Aponte, M., Blaiotta, G., La Croce, F., Mazzaglia, A., Farina, V., Settanni, L., et al. (2012). Use of selected autochthonous lactic acid bacteria for Spanish-style table olive fermentation. *Food Microbiology*, 30, 8–16.
- Arai, S., Suzuki, H., Fujimaki, M., Sakurai, Y., 1966. Studies on Flavor Components in Soybean: Part II. Phenolic Acids in Defatted Soybean Flour. *Agric. Biol. Chem.* 30, 364–369. <https://doi.org/10.1080/00021369.1966.10858609>
- Arfi, H. Spinnler, R. Tache, P. Bon, K., 2002. Production of volatile compounds by cheese-ripening yeasts: requirement for a methanethiol donor for S -methyl thioacetate synthesis by *Kluyveromyces lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 503–510. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0925-0>
- Ayad, E.H., Verheul, A., Engels, W.J., Wouters, J.T.M., Smit, G., 2001. Enhanced flavour formation by combination of selected lactococci from industrial and artisanal origin with focus on completion of a metabolic pathway. *J. Appl. Microbiol.* 90, 59–67.
- Azarnia, S., Boye, J.I., Warkentin, T., Malcolmson, L., Sabik, H., Bellido, A.S., 2011. Volatile flavour profile changes in selected field pea cultivars as affected by crop year and processing. *Food Chem.* 124, 326–335. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.041>

B

- Bader, S., Czerny, M., Eisner, P., Buettner, A., 2009. Characterisation of odour-active compounds in lupin flour. *J. Sci. Food Agric.* 89, 2421–2427. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3739>
- Barać, M., Čabrilo, S., Pešić, M., Stanojević, S., Pavličević, M., Maćej, O., Ristić, N., 2011. Functional Properties of Pea (*Pisum sativum*, L.) Protein Isolates Modified with Chymosin. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 8372–8387. <https://doi.org/10.3390/ijms12128372>
- Barkholt, V., Jørgensen, P.B., Sørensen, D., Bahrenscheer, J., Haikara, A., Lemola, E., Laitila, A., Frøkiær, H., 1998. Protein modification by fermentation: effect of fermentation on the potential allergenicity of pea. *Allergy* 53, 106–108.
- Barra, A., Baldovini, N., Loiseau, A.-M., Albino, L., Lesecq, C., Lizzani Cuvelier, L., 2007. Chemical analysis of French beans (*Phaseolus vulgaris* L.) by headspace solid phase microextraction (HS-SPME) and simultaneous distillation/extraction (SDE). *Food Chem.* 101, 1279–1284. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.12.027>
- Ben-Harb, S., Panouillé, M., Huc-Mathis, D., Moulin, G., Saint-Eve, A., Irlinger, F., Bonnarme, P., Michon, C., Souchon, I., 2017. The rheological and microstructural properties of pea, milk, mixed pea/milk gels and gelled emulsions designed by thermal, acid, and enzyme treatments. *Food Hydrocoll.* 77, 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.09.022>

- Berthier, F., Beuvier, E., Dasen, A., Grappin, R., 2001. Origin and diversity of mesophilic lactobacilli in Comté cheese, as revealed by PCR with repetitive and species-specific primers. *Int. Dairy J.* 11, 293–305. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00059-0](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00059-0)
- Bhat, R., Karim, A.A., 2009. Exploring the nutritional potential of wild and underutilized legumes. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 8, 305–331.
- Blandino, A., Al-Aseeri, M.E., Pandiella, S.S., Cantero, D., Webb, C., 2003. Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Res. Int.* 36, 527–543. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00009-7](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00009-7)
- Bokulich, N.A., Subramanian, S., Faith, J.J., Gevers, D., Gordon, J.I., Knight, R., Mills, D.A., Caporaso, J.G., 2013. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat. Methods* 10, 57–59. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2276>
- Boland, M.J., Rae, A.N., Vereijken, J.M., Meuwissen, M.P.M., Fischer, A.R.H., van Boekel, M.A.J.S., Rutherford, S.M., Gruppen, H., Moughan, P.J., Hendriks, W.H., 2013. The future supply of animal-derived protein for human consumption. *Trends Food Sci. Technol.* 29, 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.07.002>
- Bonaiti, C., Irlinger, F., Spinnler, H.E., Engel, E., 2005. An iterative sensory procedure to select odor-active associations in complex consortia of microorganisms: application to the construction of a cheese model. *J. Dairy Sci.* 88, 1671–1684.
- Bönisch, M.P., Huss, M., Weitzl, K., Kulozik, U., 2007. Transglutaminase cross-linking of milk proteins and impact on yoghurt gel properties. *Int. Dairy J.* 17, 1360–1371. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.01.019>
- Bott, L., Chambers, E., 2006. Sensory characteristics of combinations of chemicals potentially associated with beany aroma in foods. *J. Sens. Stud.* 21, 308–321.
- Bonnarme, P., Lapadatescu, C., Yvon, M., and Spinnler, H.-E. (2001). L-methionine degradation potentialities of cheese-ripening microorganisms. *J. Dairy Res.* 68.
- Boutrou, R., Guéguen, M., 2005. Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. *Int. J. Food Microbiol.* 102, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.028>
- Boye, J., Zare, F., Pletch, A., 2010. Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Res. Int.* 43, 414–431. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.003>
- Boyaval, P., Moreira, E., Desmazeaud, M.J., n.d. Transport of Aromatic Amino Acids by *Brevibacterium linens*. *J. Bacteriol.* 7.
- Burdock GA (2002): *Fanarali's Handbook of Flavor Ingredients*. Boca Raton, FL, CRC Press
- Bryant, C.M., McClements, D.J., 2000. Influence of NaCl and CaCl₂ on Cold-Set Gelation of Heat-denatured Whey Protein. *J. Food Sci.* 65, 801–804.
- Bryant, C.M., McClements, D.J., 1998. Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Trends Food Sci. Technol.* 9, 143–151.
- Burgos, J., Ordonez, J.A., Sala, F., 1972. Effect of ultrasonic waves on the heat resistance of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* spores. *Appl. Microbiol.* 24, 497–498.

C

- Camilleri, G.M., Verger, E.O., Huneau, J.-F., Carpentier, F., Dubuisson, C., Mariotti, F., 2013. Plant and Animal Protein Intakes Are Differently Associated with Nutrient Adequacy of the Diet of French Adults 1–3. *J. Nutr.* 143, 1466–1473. <https://doi.org/10.3945/jn.113.177113>
- Callon, C., Saubusse, M., Didiene, R., Buchin, S., Montel, M.-C., 2011. Simplification of a complex microbial antilisterial consortium to evaluate the contribution of its flora in uncooked pressed cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 145, 379–389. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.019>
- Cao-Hoang, L., Son, C.-K., Ha, H.P., Florence, H., Binh, L.T., Mai, L.-T., Tram, N.T.H., Khanh, T.T.M., Phu, T.V., Dominique, V., Yves, W., 2013. Tropical traditional fermented food, a field full of promise. Examples from the Tropical Bioresources and Biotechnology programme and other related French-Vietnamese programmes on fermented food. *Int. J. Food Sci. Technol.* 48, 1115–1126. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12064>

- Caplice, E., Fitzgerald, G.F., 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 50, 131–149.
- Caporaso, J.G., Bittinger, K., Bushman, F.D., DeSantis, T.Z., Andersen, G.L., Knight, R., 2010a. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics* 26, 266–267. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp636>
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R., 2010b. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
- Chandra-Hioe, M.V., Wong, C.H.M., Arcot, J., 2016. The Potential Use of Fermented Chickpea and Faba Bean Flour as Food Ingredients. *Plant Foods Hum. Nutr.* 71, 90–95. <https://doi.org/10.1007/s11130-016-0532-y>
- Chang, H., Kim, K., Nam, Y., Roh, S., Kim, M., Jeon, C., Oh, H., and Bae, J. (2008). Analysis of yeast and archaeal population dynamics in kimchi using denaturing gradient gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.* 126, 159–166.
- Chao, S.-H., Tomii, Y., Watanabe, K., and Tsai, Y.-C. (2008). Diversity of lactic acid bacteria in fermented brines used to make stinky tofu. *Int. J. Food Microbiol.* 123, 134–141.
- Chen, K.-I., Erh, M.-H., Su, N.-W., Liu, W.-H., Chou, C.-C., and Cheng, K.-C. (2012). Soyfoods and soybean products: from traditional use to modern applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 9–22.
- Chettri, R., and Tamang, J.P. (2015). *Bacillus* species isolated from tungrymbai and be kang, naturally fermented soybean foods of India. *Int. J. Food Microbiol.* 197, 72–76.
- Cholet, O., Henaut, A., Casaregola, S., and Bonnarne, P. (2007). Gene Expression and Biochemical Analysis of Cheese-Ripening Yeasts: Focus on Catabolism of L-Methionine, Lactate, and Lactose. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 2561–2570.
- Chunhachart, O., Itoh, T., Sukchotiratana, M., Tanimoto, H., and Tahara, Y. (2006). Characterization of γ -Glutamyl Hydrolase Produced by *Bacillus* sp. Isolated from Thai Thua-nao. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70, 2779–2782.
- Chango, A., Villaume, C., Bau, H.M., Nicolas, J.P., Méjean, L., 1995. Fractionation by thermal coagulation of lupin proteins: physicochemical characteristics. *Food Res. Int.* 28, 91–99.
- Chao, S.-H., Tomii, Y., Watanabe, K., Tsai, Y.-C., 2008. Diversity of lactic acid bacteria in fermented brines used to make stinky tofu. *Int. J. Food Microbiol.* 123, 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.010>
- Chardigny, J.-M., Walrand, S., 2016. Plant protein for food: opportunities and bottlenecks. *OCL* 23, D404. <https://doi.org/10.1051/ocl/2016019>
- Chen, K.-I., Erh, M.-H., Su, N.-W., Liu, W.-H., Chou, C.-C., Cheng, K.-C., 2012. Soyfoods and soybean products: from traditional use to modern applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 9–22. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4330-7>
- Chettri, R., Prakash Tamang, J., 2008. Microbiological Evaluation of Maseura, an Ethnic Fermented Legume-Based Condiment of Sikkim.
- Chettri, R., Tamang, J.P., 2015. *Bacillus* species isolated from tungrymbai and be kang, naturally fermented soybean foods of India. *Int. J. Food Microbiol.* 197, 72–76. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.021>
- Chihi, M.-L., Mession, J., Sok, N., Saurel, R., 2016. Heat-Induced Soluble Protein Aggregates from Mixed Pea Globulins and β -Lactoglobulin. *J. Agric. Food Chem.* 64, 2780–2791. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00087>
- Cholet, O., Henaut, A., Casaregola, S., Bonnarne, P., 2007. Gene Expression and Biochemical Analysis of Cheese-Ripening Yeasts: Focus on Catabolism of L-Methionine, Lactate, and Lactose. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 2561–2570. <https://doi.org/10.1128/AEM.02720-06>
- Chumchuere, S., MacDougall, D.B., Robinson, R.K., 2000. Production and properties of a semi-hard cheese made from soya milk. *Int. J. Food Sci. Technol.* 35, 577–581.
- Chunhachart, O., Itoh, T., Sukchotiratana, M., Tanimoto, H., Tahara, Y., 2006. Characterization of γ -Glutamyl Hydrolase Produced by *Bacillus* sp. Isolated from Thai Thua-nao. *Biosci.*

- Biotechnol. Biochem. 70, 2779–2782. <https://doi.org/10.1271/bbb.60280>
- Clark, A.H., Kavanagh, G.M., Ross-Murphy, S.B., 2001. Globular protein gelation—theory and experiment. *Food Hydrocoll.* 15, 383–400.
- Coda, R., Kianjam, M., Pontonio, E., Verni, M., Di Cagno, R., Katina, K., Rizzello, C.G., Gobbetti, M., 2017. Sourdough-type propagation of faba bean flour: Dynamics of microbial consortia and biochemical implications. *Int. J. Food Microbiol.* 248, 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.02.009>
- Cogan, T.M., Hill, C., 1993. Cheese Starter Cultures, in: Fox, P.F. (Ed.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Volume 1 General Aspects*. Springer US, Boston, MA, pp. 193–255. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2650-6_6
- Compaoré, C.S., Nielsen, D.S., Ouoba, L.I.I., Berner, T.S., Nielsen, K.F., Sawadogo-Lingani, H., Diawara, B., Ouédraogo, G.A., Jakobsen, M., Thorsen, L., 2013. Co-production of surfactin and a novel bacteriocin by *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* H4 isolated from Bikalga, an African alkaline *Hibiscus sabdariffa* seed fermented condiment. *Int. J. Food Microbiol.* 162, 297–307. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.013>
- Collins, M.D., Phillips, B.A., Zaroni, P., 1989. Deoxyribonucleic Acid Homology Studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39, 105–108. <https://doi.org/10.1099/00207713-39-2-105>
- Crafack, M., Mikkelsen, M.B., Saerens, S., Knudsen, M., Blennow, A., Lowor, S., Takrama, J., Swiegers, J.H., Petersen, G.B., Heimdal, H., Nielsen, D.S., 2013. Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 167, 103–116. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.024>
- Curioni, P.M.G., Bosset, J.O., 2002. Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00124-3](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00124-3)
- Czerny, M., Schieberle, P., 2002. Important Aroma Compounds in Freshly Ground Wholemeal and White Wheat Flour Identification and Quantitative Changes during Sourdough Fermentation. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6835–6840. <https://doi.org/10.1021/jf020638p>

D

- Damodaran, S., Arora, A., 2013. Off-Flavor Precursors in Soy Protein Isolate and Novel Strategies for their Removal. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 4, 327–346. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182650>
- Delarue, J., Lawlor, B., & Rogeaux, M. (2014). *Rapid Sensory Profiling Techniques and Related Methods* (1st ed.). Elsevier.
- Demarigny, Gerber, 2014. Usefulness of Natural Starters in Food Industry: The Example of Cheeses and Bread. *Food Nutr. Sci.* 05, 1679–1691. <https://doi.org/10.4236/fns.2014.517181>
- Demarigny, Y., 2012. Fermented food products made with vegetable materials from tropical and warm countries: microbial and technological considerations: Fermented plant products from warm countries. *Int. J. Food Sci. Technol.* 47, 2469–2476. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03087.x>
- Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M., Gobbetti, M., 2013. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiol.* 33, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.003>
- Djoullah, A., Djemaoune, Y., Husson, F., Saurel, R., 2015. Native-state pea albumin and globulin behavior upon transglutaminase treatment. *Process Biochem.* 50, 1284–1292. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.04.021>
- Drake, M.A., Chen, X.Q., Tamarapu, S., Leenanon, B., 2000. Soy protein fortification affects sensory, chemical, and microbiological properties of dairy yogurts. *J. Food Sci.* 65, 1244–1247.
- Dugat-Bony, E., Straub, C., Teissandier, A., Onésime, D., Loux, V., Monnet, C., Irlinger, F., Landaud, S., Leclercq-Perlat, M.-N., Bento, P., Fraud, S., Gibrat, J.-F., Aubert, J., Fer, F., Guédon, E., Pons, N., Kennedy, S., Beckerich, J.-M., Swennen, D., Bonnarme, P., 2015. Overview of a Surface-Ripened Cheese Community Functioning by Meta-Omics Analyses. *PLOS ONE* 10,

- e0124360. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124360>
 Dugat-Bony, E., Garnier, L., Denonfoux, J., Ferreira, S., Sarthou, A.-S., Bonnarme, P., Irlinger, F., 2016. Highlighting the microbial diversity of 12 French cheese varieties. *Int. J. Food Microbiol.* 238, 265–273. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.026>

E

- Edgar, R.C., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460–2461. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>
 Escalante, A., Giles-gomez, M., Hernandez, G., Cordovaaguilar, M., Lopezmunguia, A., Gosset, G., Bolivar, F., 2008. Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *Int. J. Food Microbiol.* 124, 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.003>
 Evelyn, Silva, F.V.M., 2015. Use of power ultrasound to enhance the thermal inactivation of *Clostridium perfringens* spores in beef slurry. *Int. J. Food Microbiol.* 206, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.013>

F

- Feng, X.M., Eriksson, A.R.B., Schnürer, J., 2005. Growth of lactic acid bacteria and *Rhizopus oligosporus* during barley tempeh fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 104, 249–256. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.005>
 Feng, Y., Zhang, M., Mujumdar, A.S., Gao, Z., 2017. Recent research process of fermented plant extract: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 65, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.04.006>
 Feng, Z., Gao, W., Ren, D., Chen, X., Li, J., 2013. Evaluation of bacterial flora during the ripening of Kedong sufu, a typical Chinese traditional bacteria-fermented soybean product: Evaluation of bacterial flora in Kedong sufu. *J. Sci. Food Agric.* 93, 1471–1478. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5918>
 Franz, C.M.A.P., Huch, M., Mathara, J.M., Abriouel, H., Benomar, N., Reid, G., Galvez, A., Holzapfel, W.H., 2014. African fermented foods and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 190, 84–96. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.033>
 Fritsch, C., Vogel, R.F., Toelstede, S., 2015. Fermentation performance of lactic acid bacteria in different lupin substrates-influence and degradation ability of antinutritives and secondary plant metabolites. *J. Appl. Microbiol.* 119, 1075–1088. <https://doi.org/10.1111/jam.12908>
 Fuhrmeister, H., Meuser, F., 2003. Impact of processing on functional properties of protein products from wrinkled peas. *J. Food Eng.* 56, 119–129.
 Fleet, G. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 11–22.
 Fleet, G.H., Heard, G.M., 1993. Yeasts—growth during fermentation. In: Fleet, G.H. (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, pp. 27 – 55.
 Forquin-Gomez, M. P., Weimer, B. C., Sorieul, L., Kalinowski, J., & Vallaey, T. (2014). The family Brevibacteriaceae. In *The Prokaryotes: Actinobacteria* (pp. 141-153). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. DOI: 10.1007/978-3-642-30138-4_169

G

- Gaspar, A.L.C., de Góes-Favoni, S.P., 2015. Action of microbial transglutaminase (MTGase) in the modification of food proteins: A review. *Food Chem.* 171, 315–322. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.019>
 García-Aguirre, M., Sáenz-Álvaro, V.A., Rodríguez-Soto, M.A., Vicente-Maguey, F.J., Botello-Álvarez, E., Jimenez-Islas, H., Cárdenas-Manríquez, M., Rico-Martínez, R., Navarrete-Bolaños, J.L., 2009. Strategy for Biotechnological Process Design Applied to the Enzymatic Hydrolysis of Agave Fructo-oligosaccharides To Obtain Fructose-Rich Syrups. *J. Agric. Food Chem.* 57, 10205–10210. <https://doi.org/10.1021/jf902855q>
 Gavrish, E.Y., Krauzova, V.I., Potekhina, N.V., Karasev, S.G., Plotnikova, E.G., Altyntseva, O.V.,

- Korosteleva, L.A., Evtushenko, L.I., 2004. Three New Species of Brevibacteria, *Brevibacterium antiquum* sp. nov., *Brevibacterium aurantiacum* sp. nov., and *Brevibacterium permense* sp. nov. *Microbiology* 73, 176–183. <https://doi.org/10.1023/B:MIC1.0000023986.52066.1e>
- Gerrard, J.A., 2002. Protein–protein crosslinking in food: methods, consequences, applications. *Trends Food Sci. Technol.* 13, 391–399.
- Gharsallaoui, A., Saurel, R., Chambin, O., Voilley, A., 2012. Pea (*Pisum sativum*, L.) Protein Isolate Stabilized Emulsions: A Novel System for Microencapsulation of Lipophilic Ingredients by Spray Drying. *Food Bioprocess Technol.* 5, 2211–2221. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0497-z>
- Gobbetti, M., Simonetti, M.S., Rossi, J., Cossignani, L., Corsetti, A., Damiani, P., 1994. Free D-and L-Amino Acid Evolution During Sourdough Fermentation and Baking. *J. Food Sci.* 59, 881–884.
- Guichard, E., 2002. Interactions between flavor compounds and food ingredients and their influence on flavor perception. *Food Rev. Int.* 18, 49–70. <https://doi.org/10.1081/FRI-120003417>
- Gueguen, J. (1991). *Ind. Proteins* 8 (2002) 6.
- Guéguen Jacques, Walrand Stéphane, Bourgeois Oriane, Les protéines végétales : contexte et potentiels en alimentation humaine, In *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, Volume 51, Issue 4, 2016, Pages 177-185, ISSN 0007-9960, <https://doi.org/10.1016/j.cnd.2016.02.001>.
- Gueguen, J., Barbot, J., 1988. Quantitative and qualitative variability of pea (*Pisumsativum* L.) protein composition. *J. Sci. Food Agric.* 42, 209–224. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740420304>
- Gueguen, J. (1991). Pea and fababean proteins. In B. J. F. Hudson (Ed.). *Developments in food proteins* (Vol. 7, pp. 5–78). London: ElsevierApplied Science
- ## H
- Han, B.-Z., Beumer, R.R., Rombouts, F.M., Nout, M.R., 2001. Microbiological safety and quality of commercial sufu—a Chinese fermented soybean food. *Food Control* 12, 541–547.
- Han BZ, Rombouts FM, Nout MJR, 2001 A Chinese fermented soybean food. *Int J Food Microbiol* 65(1–2):1–10
- Hansen, J.L., 2006. Heritability and Genetic Covariation of Sensitivity to PROP, SOA, Quinine HCl, and Caffeine. *Chem. Senses* 31, 403–413. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjj044>
- Helinck, S., Le Bars, D., Moreau, D., Yvon, M., 2004. Ability of Thermophilic Lactic Acid Bacteria To Produce Aroma Compounds from Amino Acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3855–3861. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.7.3855-3861.2004>
- Heng, L., van Koningsveld, G., Gruppen, H., van Boekel, M.A.J., Vincken, J.-P., Roozen, J., Voragen, A.G., 2004. Protein–flavour interactions in relation to development of novel protein foods. *Trends Food Sci. Technol.* 15, 217–224. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.018>
- Heng, L., Vincken, J.-P., van Koningsveld, G., Legger, A., Gruppen, H., van Boekel, T., Roozen, J., Voragen, F., 2006. Bitterness of saponins and their content in dry peas. *J. Sci. Food Agric.* 86, 1225–1231. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2473>
- Holzapfel, W., 1997. Use of starter cultures in fermentation on a household scale. *Food Control* 8, 241–258.
- ## I
- Imran, M., Bré, J.-M., Guéguen, M., Vernoux, J.-P., Desmasures, N., 2013. Reduced growth of *Listeria monocytogenes* in two model cheese microcosms is not associated with individual microbial strains. *Food Microbiol.* 33, 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.08.008>
- Imran, M., Desmasures, N., Vernoux, J.-P., 2010. From undefined red smear cheese consortia to minimal model communities both exhibiting similar anti-listerial activity on a cheese-like matrix. *Food Microbiol.* 27, 1095–1103. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.016>
- Irlinger, F, J Mounier, T. Vallaëys, C.Monnet, S.Landaud, S.Helinck, E.Spinner, P.Bonnarme, 2007. Bactéries et champignons des fromages un travail d'équipe exemplaire.

- Irlinger, F., In Yung, S.A.Y., Sarthou, A.-S., Delbès-Paus, C., Montel, M.-C., Coton, E., Coton, M., Helinck, S., 2012. Ecological and aromatic impact of two Gram-negative bacteria (*Psychrobacter celer* and *Hafnia alvei*) inoculated as part of the whole microbial community of an experimental smear soft cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 153, 332–338. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.022>
- Irlinger, F., Layec, S., Hélinck, S., Dugat-Bony, E., 2015. Cheese rind microbial communities: diversity, composition and origin. *FEMS Microbiol. Lett.* 362, 1–11. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnu015>
- Irlinger, F., Morvan, A., El Solh, N., Bergere, J.L., 1997. Taxonomic characterization of coagulase-negative staphylococci in ripening flora from traditional French cheeses. *Syst. Appl. Microbiol.* 20, 319–328.
- Irlinger, F., Mounier J. Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Curr Opin Biotechnol.* 2009;20:142–148. doi:10.1016/j.copbio.2009.02.016 PMID:19342218

J

- Jennessen, J., Schnürer, J., Olsson, J., Samson, R.A., Dijksterhuis, J., 2008. Morphological characteristics of sporangiospores of the tempe fungus *Rhizopus oligosporus* differentiate it from other taxa of the *R. microsporus* group. *Mycol. Res.* 112, 547–563. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.11.006>
- Jeanson, S., Floury, J., Gagnaire, V., Lortal, S., Thierry, A., 2015. Bacterial Colonies in Solid Media and Foods: A Review on Their Growth and Interactions with the Micro-Environment. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01284>
- Jeyaram, K., Mohendro Singh, W., Premarani, T., Devi, A.R., Chanu, K.S., Talukdar, N.C., Singh, M.R., 2008. Molecular identification of dominant microflora associated with “Hawaijar” — A traditional fermented soybean (*Glycine max* (L.)) food of Manipur, India. *Int. J. Food Microbiol.* 122, 259–268. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.026>
- Ju, Z.Y., Kilara, A., 1998. Properties of gels induced by heat, protease, calcium salt, and acidulant from calcium ion-aggregated whey protein isolate. *J. Dairy Sci.* 81, 1236–1243.
- Jung, J.Y., Lee, S.H., Kim, J.M., Park, M.S., Bae, J.-W., Hahn, Y., Madsen, E.L., and Jeon, C.O. (2011). Metagenomic Analysis of Kimchi, a Traditional Korean Fermented Food. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2264–2274.
- Jung, J.Y., Lee, S.H., Jeon, C.O., 2014. Microbial community dynamics during fermentation of doenjang-meju, traditional Korean fermented soybean. *Int. J. Food Microbiol.* 185, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.003>

K

- Kao, F.-J., Su, N.-W., Lee, M.-H., 2003. Effect of Calcium Sulfate Concentration in Soymilk on the Microstructure of Firm Tofu and the Protein Constitutions in Tofu Whey. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6211–6216. <https://doi.org/10.1021/jf0342021>
- Kato H, Rhue MR, Nishimura T (1989) Role of free amino acids and peptides in food taste. In: Flavor chemistry; trends and development, chap 13, (R Teranishi, RG Buttery, F Shahidi, eds). American Chemical Society, Washington, 159-174
- Kaysi, Y., Melcion, J.P., 1992. Traitements technologiques des protéagineux pour le monogastrique: exemples d’application à la graine de féverole. *INRA Prod. Anim.* 5, 3–17.
- Ketabi, A., Soleimani-Zad, S., Kadivar, M., Sheikh-Zeinoddin, M., 2008. Production of microbial exopolysaccharides in the sourdough and its effects on the rheological properties of dough. *Food Res. Int.* 41, 948–951. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.07.009>
- Kim, M.-R., Yukio, K., Kim, K.M., Lee, C.-H., 2008. Tastes and Structures of Bitter Peptide, Asparagine-Alanine-Leucine-Proline-Glutamate, and Its Synthetic Analogues. *J. Agric. Food Chem.* 56, 5852–5858. <https://doi.org/10.1021/jf7036664>
- Kim, O.-S., Cho, Y.-J., Lee, K., Yoon, S.-H., Kim, M., Na, H., Park, S.-C., Jeon, Y.S., Lee, J.-H., Yi, H., Won, S., Chun, J., 2012. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 716–721. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.038075-0>

- Kim, T.-W., Lee, J.-H., Kim, S.-E., Park, M.-H., Chang, H.C., Kim, H.-Y., 2009. Analysis of microbial communities in doenjang, a Korean fermented soybean paste, using nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.* 131, 265–271. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.001>
- Kim, Y., Cho, J.-Y., Kuk, J.-H., Moon, J.-H., Cho, J.-I., Kim, Y.-C., Park, K.-H., 2004. Identification and Antimicrobial Activity of Phenylacetic Acid Produced by *Bacillus licheniformis* Isolated from Fermented Soybean, Chungkook-Jang. *Curr. Microbiol.* 48, 312–317. <https://doi.org/10.1007/s00284-003-4193-3>
- Kimura, A., Fukuda, T., Zhang, M., Motoyama, S., Maruyama, N., Utsumi, S., 2008. Comparison of Physicochemical Properties of 7S and 11S Globulins from Pea, Fava Bean, Cowpea, and French Bean with Those of Soybean—French Bean 7S Globulin Exhibits Excellent Properties. *J. Agric. Food Chem.* 56, 10273–10279. <https://doi.org/10.1021/jf801721b>
- Kimaryo, V.M., Massawe, G.A., Olasupo, N.A., Holzapfel, W.H., 2000. The use of a starter culture in the fermentation of cassava for the production of “kivunde”, a traditional Tanzanian food product. *Int. J. Food Microbiol.* 56, 179–190. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00159-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00159-8)
- Kinney, A.J., 2003. Engineering soybeans for food and health.
- Kuo, L.-C., Cheng, W.-Y., Wu, R.-Y., Huang, C.-J., Lee, K.-T., 2006. Hydrolysis of black soybean isoflavone glycosides by *Bacillus subtilis* natto. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73, 314–320. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0474-7>
- Kling M, Hough I. The American carbon food print: understanding your food’s impact on climate change. Shellburne (USA): Brighter planet Inc; 2010. p. 1—17

L

- Labalette, F., Guiavarc’h, Y., 2016. Etat des lieux des productions et des échanges des légumineuses à graines. Projet COSELAG, AAP CASDAR 776, www.inra.fr/coselag
- Ladjal-Ettoumi, Y., Boudries, H., Chibane, M., Romero, A., 2016. Pea, Chickpea and Lentil Protein Isolates: Physicochemical Characterization and Emulsifying Properties. *Food Biophys.* 11, 43–51. <https://doi.org/10.1007/s11483-015-9411-6>
- Lan, C.-H., Son, C.-K., Ha, H.P., Florence, H., Binh, L.T., Mai, L.-T., Tram, N.T.H., Khanh, T.T.M., Phu, T.V., Dominique, V., Yves, W., 2013. Tropical traditional fermented food, a field full of promise. Examples from the Tropical Bioresources and Biotechnology programme and other related French-Vietnamese programmes on fermented food. *Int. J. Food Sci. Technol.* 48, 1115–1126. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12064>
- Langton, M., Hermansson, A.-M., 1992. Fine-stranded and particulate gels of β -lactoglobulin and whey protein at varying pH. *Food Hydrocoll.* 5, 523–539.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., Visconti, A., 2003. Antifungal Activity of Phenyllactic Acid against Molds Isolated from Bakery Products. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 634–640. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.634-640.2003>
- Leroy, F., De Vuyst, L., 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol.* 15, 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>
- Limón, R.I., Peñas, E., Torino, M.I., Martínez-Villaluenga, C., Dueñas, M., Frias, J., 2015. Fermentation enhances the content of bioactive compounds in kidney bean extracts. *Food Chem.* 172, 343–352. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.084>
- Liu, S., Han, Y., Zhou, Z., 2011. Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods. *Food Res. Int.* 44, 643–651. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.12.034>
- Liu, S.-Q., Holland, R., Crow, V.L., 2004. Esters and their biosynthesis in fermented dairy products: a review. *Int. Dairy J.* 14, 923–945. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.02.010>
- Lucey, Singh, 1998. Formation and physical properties of acid milk gels: a review. *Food Research International* 30, 529–542,

M

- Magoč, T., Salzberg, S.L., 2011. FLASH: Fast Length Adjustment of Short Reads to Improve Genome Assemblies. *Bioinformatics* btr507. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr507>

- Makri, E., Papalamprou, E., Doxastakis, G., 2005. Study of functional properties of seed storage proteins from indigenous European legume crops (lupin, pea, broad bean) in admixture with polysaccharides. *Food Hydrocoll.* 19, 583–594. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.10.028>
- Maltais, A., Remondetto, G.E., Subirade, M., 2008. Mechanisms involved in the formation and structure of soya protein cold-set gels: A molecular and supramolecular investigation. *Food Hydrocoll.* 22, 550–559. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.01.026>
- Marcone, M.F., 1999. Biochemical and biophysical properties of plant storage proteins: a current understanding with emphasis on 11S seed globulins. *Food Res. Int.* 32, 79–92.
- Magrini, M.-B., Modotti, M., Biarnès, V., Blossville, N., Duc, G., Guiavarc'h, Y., Jeuffroy, M.-H., Labalette, F., 2017. Fiches filières LAG. Projet COSELAG, AAP CASDAR 776, www.inra.fr/coselag
- Maubois, J.-L., Lorient, D., 2016. Dairy proteins and soy proteins in infant foods nitrogen-to-protein conversion factors. *Dairy Sci. Technol.* 96, 15–25. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0271-0>
- Marcelino, J., 2013. Lactic Acid Bacteria as Starter-Cultures for Cheese Processing: Past, Present and Future Developments, in: Kongo, J.M. (Ed.), *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. InTech. <https://doi.org/10.5772/55937>
- Mennella, J.A., Pepino, M.Y., Duke, F.F., Reed, D.R., 2010. Age modifies the genotype-phenotype relationship for the bitter receptor TAS2R38. *BMC Genet.* 11, 60.
- Meinschmidt, P., Schweiggert-Weisz, U., Brode, V., Eisner, P., 2016a. Enzyme assisted degradation of potential soy protein allergens with special emphasis on the technofunctionality and the avoidance of a bitter taste formation. *LWT - Food Sci. Technol.* 68, 707–716. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.023>
- Meinschmidt, P., Schweiggert-Weisz, U., Eisner, P., 2016b. Soy protein hydrolysates fermentation: Effect of debittering and degradation of major soy allergens. *LWT - Food Sci. Technol.* 71, 202–212. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.026>
- Meinschmidt, P., Ueberham, E., Lehmann, J., Schweiggert-Weisz, U., Eisner, P., 2016. Immunoreactivity, sensory and physicochemical properties of fermented soy protein isolate. *Food Chem.* 205, 229–238. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.016>
- Mession, J.-L., 2012. Influence de l'état protéique sur la dynamique de séparation de phase et de gélification dans un système ternaire aqueux à base de protéines de pois et d'alginate. Université de Bourgogne.
- Mession, J.-L., Chihi, M.L., Sok, N., Saurel, R., 2015. Effect of globular pea proteins fractionation on their heat-induced aggregation and acid cold-set gelation. *Food Hydrocoll.* 46, 233–243. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.11.025>
- Mession, J.-L., Roustel, S., Saurel, R., 2017a. Interactions in casein micelle – Pea protein system (part I): Heat-induced denaturation and aggregation. *Food Hydrocoll.* 67, 229–242. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.12.015>
- Mession, J.-L., Roustel, S., Saurel, R., 2017b. Interactions in casein micelle - pea protein system (Part II): mixture acid gelation with glucono- δ -lactone. *Food Hydrocoll.* 67, 229–242. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.12.015>
- Meyerhof, W., Batram, C., Kuhn, C., Brockhoff, A., Chudoba, E., Bufe, B., Appendino, G., Behrens, M., 2010. The Molecular Receptive Ranges of Human TAS2R Bitter Taste Receptors. *Chem. Senses* 35, 157–170. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjp092>
- Munialo, C. D., van der Linden, E., & de Jongh, H. H. J. (2014). The ability to store energy in pea protein gels is set by network dimensions smaller than 50 nm. *Food Research International*, 64, 482e491. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.038>.
- Molimard, P., Spinnler, H.E., 1996. Compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses: origins and properties. *J. Dairy Sci.* 79, 169–184.
- Mounier, J., Monnet, C., Vallaëys, T., Arditi, R., Sarthou, A.-S., Helias, A., Irlinger, F., 2008. Microbial Interactions within a Cheese Microbial Community. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 172–181. <https://doi.org/10.1128/AEM.01338-07>
- Mounier, J., Monnet, C., Jacques, N., Antoinette, A., Irlinger, F., 2009. Assessment of the microbial diversity at the surface of Livarot cheese using culture-dependent and independent approaches. *Int. J. Food Microbiol.* 133, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.020>
- Mounier, J., S. Goerges, R. Gelsomino, M. Vancanneyt, K. Vandemeulebroecke, 484 B. Hoste, N. M.

- Brennan, S. Scherer, J. Swings, G. F. Fitzgerald, and T. M. 485 Cogan. 2006. Sources of the adventitious microflora of a smear-ripened cheese. 486 *Journal of Applied Microbiology* 101:668-681.
- Montel, marie-christine, Bouton, Y., P, P., 2012. Ecosystemes des laits et des fromages au lait cru - enjeux pour leur maîtrise.
- Monnet, C., Ulve, V., Sarthou, A.-S., Irlinger, F., 2008. Extraction of RNA from Cheese without Prior Separation of Microbial Cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 5724–5730. <https://doi.org/10.1128/AEM.00716-08>
- Monnet, C., Back, A., Irlinger, F., 2012. Growth of Aerobic Ripening Bacteria at the Cheese Surface Is Limited by the Availability of Iron. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 3185–3192. <https://doi.org/10.1128/AEM.00085-12>
- Monnet,C,LouxV, GibratJF, SpinnlerE,BarbeV,VacherieB,etal.The *Arthrobacter arilaitensis* Re117 Genome Sequence Reveals Its Genetic Adaptation to the Surface of Cheese. Ahmed N,editor. *PLoS ONE*.2010;5:e15489. doi:10.1371/journal.pone.0015489PMID:21124797
- MonnetC,LouxV,BentoP, GibratJF, StraubC, BonnarmeP.Genome Sequence of *Corynebacterium casei* UCMA3821, Isolated from a Smear-Ripened Cheese. *JBacteriol*.2012;194:738–739. doi:10.1128/JB.06496-11PMID:22247534
- Monnet, C., Landaud, S., Bonnarme, P., Swennen, D., 2015. Growth and adaptation of microorganisms on the cheese surface. *FEMS Microbiol. Lett.* 362, 1–9. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnu025>
- Monnet, C., Correia, K., Sarthou, A.-S., Irlinger, F., 2006. Quantitative Detection of *Corynebacterium casei* in Cheese by Real-Time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6972–6979. <https://doi.org/10.1128/AEM.01303-06>
- Meinschmidt, Pia, Ueberham, E., Lehmann, J., Schweiggert-Weisz, U., Eisner, P., 2016. Immunoreactivity, sensory and physicochemical properties of fermented soy protein isolate. *Food Chem.* 205, 229–238. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.016>
- Murat, C., Bard, M.-H., Dhalleine, C., Cayot, N., 2013. Characterisation of odour active compounds along extraction process from pea flour to pea protein extract. *Food Res. Int.* 53, 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.03.049>
- Murat, C., Gourrat, K., Jerosch, H., Cayot, N., 2012. Analytical comparison and sensory representativity of SAFE, SPME, and Purge and Trap extracts of volatile compounds from pea flour. *Food Chem.* 135, 913–920. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.015>
- N**
- Nagai,T.,and Tamang,J.P.(2010).“Fermented soy beans and non-soybeans legume foods, ”in *Fermented Foods and Beverage sof the World*, eds J.P.Tamang, and K.Kailasapathy (NewYork,NY:CRCPress,TaylorandFrancisGroup), 191–224.
- Nam, Y.-D., Lee, S.-Y., Lim, S.-I., 2012. Microbial community analysis of Korean soybean pastes by next-generation sequencing. *Int. J. Food Microbiol.* 155, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.013>
- Nout, M.J.R., Kiers, J.L., 2005. Tempe fermentation, innovation and functionality: update into the third millenium. *J. Appl. Microbiol.* 98, 789–805. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02471.x>
- Nout MJR, Rombouts FM (1990) Recent developments in tempe research. *J ApplBacteriol* 69(5):609–633
- Nielsen, D. S., Schillinger, U., Franz, C. A. M. P., Bresciani, J., Amoa-Awua, W., Halzapel, W. H., et al. (2007). *Lactobacillus ghanensis* sp. nov., a motile lactic acid bacterium isolated from Ghanaian cocoa fermentations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 1468e1472.
- O**
- O’Kane, F.E., Happe, R.P., Vereijken, J.M., Gruppen, H., van Boekel, M.A.J.S., 2004. Heat-Induced Gelation of Pea Legumin: Comparison with Soybean Glycinin. *J. Agric. Food Chem.* 52, 5071–5078. <https://doi.org/10.1021/jf035215h>

- O’Kane, F.E., Vereijken, J.M., Gruppen, H., Boekel, M.A., 2005. Gelation behavior of protein isolates extracted from 5 cultivars of *Pisum sativum* L. *J. Food Sci.* 70, C132–C137.
- Oomah, B.D., Liang, L.S.Y., Balasubramanian, P., 2007. Volatile Compounds of Dry Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Foods Hum. Nutr.* 62, 177–183. <https://doi.org/10.1007/s11130-007-0059-3>
- Ouoba, L.I.I., Diawara, B., Amoa-Awua, W. kofi, Traoré, A.S., Møller, P.L., 2004. Genotyping of starter cultures of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* for fermentation of African locust bean (*Parkia biglobosa*) to produce Soumbala. *Int. J. Food Microbiol.* 90, 197–205. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00302-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00302-7)
- Odunfa, S.A., and Oyewole, O.B. (1997). African fermented foods. In *Microbiology of Fermented Foods*, B.J.B. Wood, ed. (Boston, MA: Springer US), pp. 713–752.
- Osborne, T. B. & Campbell, G. F. (1898). Proteins of the pea. *Journal of American Chemical Society*, 20, 348-362

P

- Pagot, Y., Belin, J.-M., Husson, F., Spinnler, H.-E., 2007. Metabolism of phenylalanine and biosynthesis of styrene in *Penicillium camemberti*. *J. Dairy Res.* 74, 180. <https://doi.org/10.1017/S0022029906002251>
- Padda, R.S., Pandey, K.K., Kaul, S., Nair, V.D., Jain, R.K., Basu, S.K., Chakrabarti, T., 2001. A novel gene encoding a 54 kDa polypeptide is essential for butane utilization by *Pseudomonas* sp. IMT37. *Microbiology* 147, 2479–2491.
- Pelgrom, P.J.M., Boom, R.M., Schutyser, M.A.I., 2015. Functional analysis of mildly refined fractions from yellow pea. *Food Hydrocoll.* 44, 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.09.001>
- Pelgrom, P.J.M., Vissers, A.M., Boom, R.M., Schutyser, M.A.I., 2013. Dry fractionation for production of functional pea protein concentrates. *Food Res. Int.* 53, 232–239. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.05.004>
- Pelzer, E., Bazot, M., Makowski, D., Corre-Hellou, G., Naudin, C., Al Rifai, M., Baranger, E., Bedoussac, L., Biarnès, V., Boucheny, P., Carrouée, B., Dorvillez, D., Foissy, D., Gaillard, B., Guichard, L., Mansard, M.-C., Omon, B., Prieur, L., Yvergnaux, M., Justes, E., Jeuffroy, M.-H., 2012. Pea–wheat intercrops in low-input conditions combine high economic performances and low environmental impacts. *Eur. J. Agron.* 40, 39–53. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2012.01.010>
- Peyer, L.C., Zannini, E., Arendt, E.K., 2016. Lactic acid bacteria as sensory biomodulators for fermented cereal-based beverages. *Trends Food Sci. Technol.* 54, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.05.009>
- Peralta, G.H., Wolf, I.V., Perotti, M.C., Bergamini, C.V., Hynes, E.R., 2016. Formation of volatile compounds, peptidolysis and carbohydrate fermentation by mesophilic lactobacilli and streptococci cultures in a cheese extract. *Dairy Sci. Technol.* 96, 603–621. <https://doi.org/10.1007/s13594-016-0291-4>
- Pham, T.T., Shah, N.P., 2007. Biotransformation of Isoflavone Glycosides by *Bifidobacterium animalis* in Soymilk Supplemented with Skim Milk Powder. *J. Food Sci.* 72, M316–M324. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00476.x>
- Pimentel, D., Pimentel, M., 2003. Sustainability of meat-based and plant-based diets and the environment. *Am. J. Clin. Nutr.* 78, 660S–663S.
- Plug, H., Haring, P., 1993. The role of ingredient-flavour interactions in the development of fat-free foods. *Trends Food Sci. Technol.* 4, 150–152.
- Price, K.R., Griffiths, N.M., Curl, C.L., Fenwick, G.R., 1985. Undesirable sensory properties of the dried pea (*Pisum sativum*). The role of saponins. *Food Chem.* 17, 105–115.
- Price, K.R., Roger Fenwick, G., 1984. Soyasaponin I, a compound possessing undesirable taste characteristics isolated from the dried pea (*Pisum sativum* L.). *J. Sci. Food Agric.* 35, 887–892.
- Price, M.N., Dehal, P.S., Arkin, A.P., 2010. FastTree 2 – Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. *PLoS ONE* 5, e9490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>
- Prillinger, H., Molnár, O., Eliskases-Lechner, F., Lopandic, K., 1999. Phenotypic and genotypic identification of yeasts from cheese. *Antonie Van Leeuwenhoek* 75, 267–283. <https://doi.org/10.1023/A:1001889917533>

R

- Rani, D. K., and Soni, S. K. (2007). "Applications and commercial uses of microorganisms," in *Microbes: a source of energy for 21st century*. ed S. K. Soni (Delhi : Jai Bharat Printing Press), 71–126.
- Ravyts, F., Vuyst, L.D., Leroy, F., 2012. Bacterial diversity and functionalities in food fermentations: Bacterial diversity and functionalities in food fermentations. *Eng. Life Sci.* 12, 356–367. <https://doi.org/10.1002/elsc.201100119>
- Remondetto, G.E., Subirade, M., 2003. Molecular mechanisms of Fe²⁺-induced β -lactoglobulin cold gelation. *Biopolymers* 69, 461–469.
- Roesch, R.R., Corredig, M., 2005. Heat-Induced Soy–Whey Proteins Interactions: Formation of Soluble and Insoluble Protein Complexes. *J. Agric. Food Chem.* 53, 3476–3482. <https://doi.org/10.1021/jf048870d>
- Renner, E. 1993. "Nutritional Aspects of Cheese." In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 557–79. Springer.
- Roland et al, 2017. Falvor Aspect of Pulse Ingredients. *Cereal Chem.* 58–65.
- Roudot-Algaron, F., 1996. Le goût des acides aminés, des peptides et des protéines: exemple de peptides sapides dans les hydrolysats de caséines. *Le lait* 76, 313–348.

S

- Sabate, J., Soret, S., 2014. Sustainability of plant-based diets: back to the future. *Am. J. Clin. Nutr.* 100, 476S–482S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.071522>
- Saha, B.C., Hayashi, K., 2001. Debittering of protein hydrolyzates. *Biotechnol. Adv.* 19, 355–370.
- Salampessy, J., Kailasapathy, K., & Thapa, N. (2010). Fermented fish products. In J. P. Tamang & K. Kailasapathy (Eds.), *Fermented Foods and Beverages of the World* (pp. 289-307
- Sarkar, Tamang, Cook, Owens, 1994. Kinema-a traditional soybean fermented food: proximate composition and microflora. *Food Microbiol.* 47–55.
- Satyanarayana, T., Kunze, G. (Eds.), 2009. *Yeast biotechnology: diversity and applications*. Springer, New York?
- Schindler, S., Zelena, K., Krings, U., Bez, J., Eisner, P., Berger, R.G., 2012. Improvement of the Aroma of Pea (*Pisum sativum*) Protein Extracts by Lactic Acid Fermentation. *Food Biotechnol.* 26, 58–74. <https://doi.org/10.1080/08905436.2011.645939>
- Schutyser, M.A.I., van der Goot, A.J., 2011. The potential of dry fractionation processes for sustainable plant protein production. *Trends Food Sci. Technol.* 22, 154–164. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.11.006>
- Selmane, D., 2010. Etude de l'extraction des protéines de coproduits d'abattage et de leur valorisation comme ingrédients fonctionnels. Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II.
- Shand, P.J., Ya, H., Pietrasik, Z., Wanasundara, P.K.J.P.D., 2008. Transglutaminase treatment of pea proteins: Effect on physicochemical and rheological properties of heat-induced protein gels. *Food Chem.* 107, 692–699. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.095>
- Shand, P.J., Ya, H., Pietrasik, Z., Wanasundara, P.K.J.P.D., 2007. Physicochemical and textural properties of heat-induced pea protein isolate gels. *Food Chem.* 102, 1119–1130. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.060>
- Shong, J., Jimenez Diaz, M.R., Collins, C.H., 2012. Towards synthetic microbial consortia for bioprocessing. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23, 798–802. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.02.001>
- Shrestha, A.K., Dahal, N.R., Ndungutse, V., 2013. *Bacillus* fermentation of soybean: A review. *J. Food Sci. Technol. Nepal* 6, 1–9.
- Singh, T.A., Devi, K.R., Ahmed, G., Jeyaram, K., 2014. Microbial and endogenous origin of fibrinolytic activity in traditional fermented foods of Northeast India. *Food Res. Int.* 55, 356–362. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.028>

- Smit, G., Smit, B., and Engels, W. (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 591–610.
- Sridevi, J., Halami, P.M., and Vijayendra, S.V.N. (2010). Selection of starter cultures for idli batter fermentation and their effect on quality of idlis. *J. Food Sci. Technol.* 47, 557–563.
- Steinkraus K.H (2002). Fermentations in World Food Processing. *Food Sci. Food Saf.* 23–32.
- Steinkraus, K.H., 1997. Classification of fermented foods: worldwide review of household fermentation techniques. *Food Control* 8, 311–317.
- Stiles, M.E., Holzapfel, W.H., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36, 1–29.
- Soullignac, L. (1995). Propriétés des levures fromagères : Influence des sources de carbones utilisées sur leur aptitudes a désacidifier les caillés et à former des composés d’arôme. Diss. Paris: Institut National Agronomique Paris-Grignon
- Su YC (1999) Traditional fermented food in taiwan: proceedings of the oriental fermented foods. *ApplMicrobiol* 1:15
- Shurtleff W, Aoyagi A (2012) History of natto and its relatives (1405– 2012). Soyinfo Center, Lafayette
- Smit, G., Smit, B., Engels, W., 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 591–610. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.04.002>
- Sobrino-López, A., Martín-Belloso, O., 2008. Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *Int. Dairy J.* 18, 329–343. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.11.009>
- Spinnler, H.E., Grosjean, O., Bouvier, I., 1992. Effect of culture parameters on the production of styrene (vinyl benzene) and 1-octene-3-ol by *Penicillium caseicolum*. *J. Dairy Res.* 59, 533. <https://doi.org/10.1017/S0022029900027205>
- Stanisavljevic, N., Vukotic, G., Pastor, F., Suznjevic, D., Jovanovic, Z., Strahinic, I., Fira, D., Radovic, S., 2015. Antioxidant activity of pea protein hydrolysates produced by batch fermentation with lactic acid bacteria. *Arch. Biol. Sci.* 67, 1033–1042. <https://doi.org/10.2298/ABS150130066S>
- Starzyńska-Janiszewska, A., Stodolak, B., Duliński, R., Mickowska, B., 2012. The influence of inoculum composition on selected bioactive and nutritional parameters of grass pea tempeh obtained by mixed-culture fermentation with *Rhizopus oligosporus* and *Aspergillus oryzae* strains. *Food Sci. Technol. Int.* 18, 113–122. <https://doi.org/10.1177/1082013211414771>
- Steele, D.H., Thornburg, M.J., Stanley, J.S., Miller, R.R., Brooke, R., Cushman, J.R., Cruzan, G., 1994. Determination of styrene in selected foods. *J. Agric. Food Chem.* 42, 1661–1665. <https://doi.org/10.1021/jf00044a015>
- Stefanovic, E., Fitzgerald, G., McAuliffe, O., 2017. Advances in the genomics and metabolomics of dairy lactobacilli: A review. *Food Microbiol.* 61, 33–49. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.08.009>
- Sirtori, C.R., Triolo, M., Bosisio, R., Bondioli, A., Calabresi, L., De Vergori, V., Gomaraschi, M., Mombelli, G., Pazzucconi, F., Zacherl, C., Arnoldi, A., 2012. Hypocholesterolaemic effects of lupin protein and pea protein/fibre combinations in moderately hypercholesterolaemic individuals. *Br. J. Nutr.* 107, 1176–1183. <https://doi.org/10.1017/S0007114511004120>
- Sun, X.D., 2011. Enzymatic hydrolysis of soy proteins and the hydrolysates utilisation: Enzymatic hydrolysis of soy proteins and the hydrolysates utilisation. *Int. J. Food Sci. Technol.* 46, 2447–2459. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02785.x>
- Sun, X.D., Arntfield, S.D., 2012. Molecular forces involved in heat-induced pea protein gelation: Effects of various reagents on the rheological properties of salt-extracted pea protein gels. *Food Hydrocoll.* 28, 325–332. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.12.014>
- Sun, X.D., Arntfield, S.D., 2011a. Dynamic oscillatory rheological measurement and thermal properties of pea protein extracted by salt method: Effect of pH and NaCl. *J. Food Eng.* 105, 577–582. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.03.008>
- Sun, X.D., Arntfield, S.D., 2011b. Gelation properties of salt-extracted pea protein isolate catalyzed by microbial transglutaminase cross-linking. *Food Hydrocoll.* 25, 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.05.002>
- Sun, X.D., Arntfield, S.D., 2010. Gelation properties of salt-extracted pea protein induced by heat

- treatment. *Food Res. Int.* 43, 509–515. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.039>
- Suzzi, G., Lanorte, M.T., Galgano, F., Andrighetto, C., Lombardi, A., Lanciotti, R., Guerzoni, M.E., 2001. Proteolytic, lipolytic and molecular characterisation of *Yarrowia lipolytica* isolated from cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 69, 69–77.
- Sugawara, E. (2010). “Fermented soy bean pastes miso and shoyu with reference to aroma,” in *Fermented Foods and Beverages of the World*, eds J.P. Tamang and K. Kailasapathy, (New York, NY: CRC Press, Taylor and Francis Group), 225–245. doi:10.1201/ebk1420094954-c7
- Swanson, B.G., 1990. Pea and Lentil Protein Extraction and Functionality 1. *Food Sci. Hum. Nutr.* 276–280.

T

- Tamang, J.P., 2015. Naturally fermented ethnic soybean foods of India. *J. Ethn. Foods* 2, 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.jef.2015.02.003>
- Tamang, J.P., 2003. Native microorganisms in the fermentation of kinema.
- Tamang, J.P., Shin, D.-H., Jung, S.-J., Chae, S.-W., 2016a. Functional Properties of Microorganisms in Fermented Foods. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00578>
- Tamang, J.P., Tamang, B., Schillinger, U., Guigas, C., Holzapfel, W.H., 2009. Functional properties of lactic acid bacteria isolated from ethnic fermented vegetables of the Himalayas. *Int. J. Food Microbiol.* 135, 28–33. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.016>
- Tamang, J.P., Watanabe, K., Holzapfel, W.H., 2016b. Review: Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00377>
- Tukker A, Huppel G, Guinée JB, Heijungs R, Koning AD, Oers LV, et al. Environmental Impact of products (EIPRO). Analysis of the life cycle environmental impacts related to the final consumption of the EU-25 Brussels: European Commission. Joint Research centre Institute for prospective technological studies. 5 technical report Series EUR 22284 EN); 2006. p. 1—136.
- Tong Dan, Dan Wang, Shimei Wu, Rulin Jin, Weiyi Ren, Tiansong Sun, 2017. Profiles of Volatile Flavor Compounds in Milk Fermented with Different Proportional Combinations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *Molecules* 22, 1633. <https://doi.org/10.3390/molecules22101633>
- Tzitzikas, E. N., Vincken, J.-P., de Groot, J., Gruppert, H., & Visser, R. G. F. (2006). Genetic Variation in Pea Seed Globulin Composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 425-433

U

- Utsumi S. - Plant food protein engineering. *Advances in Food and Nutrition Research*, 1992, 36, 89-208..

V

- Vara-Ubol, S., Chambers, E., Chambers, D.H., 2004. Sensory characteristics of chemical compounds potentially associated with beany aroma in foods. *J. Sens. Stud.* 19, 15–26.
- Vergnais, L., Masson, F., Montel, M.C., Berdagué, J.L., Talon, R., 1998. Evaluation of Solid-Phase Microextraction for Analysis of Volatile Metabolites Produced by Staphylococci. *J. Agric. Food Chem.* 46, 228–234. <https://doi.org/10.1021/jf970562a>
- Visessanguan, W., Benjakul, S., Potachareon, W., Panya, A., Riebroy, S., 2005. ACCELERATED PROTEOLYSIS OF SOY PROTEINS DURING FERMENTATION OF THUA-NAO INOCULATED WITH *BACILLUS SUBTILIS*. *J. Food Biochem.* 29, 349–366.
- Voigt, J., Biehl, B., Heinrichs, H., Kamaruddin, S., Marsoner, G.G., Hugi, A., 1994. In-vitro formation of cocoa-specific aroma precursors: aroma-related peptides generated from cocoa-seed protein by co-operation of an aspartic endoprotease and a carboxypeptidase. *Food Chem.* 49, 173–180.
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H., Whitman, W.B., 2009. *Bergey’s manual of systematic bacteriology*. Volume three, The firmicutes.

Second edition. Dordrecht ; New York : Springer, [2009] ©2009.

W

- Walstra, P., 1990. On the Stability of Casein Micelles. *J. Dairy Sci.* 73, 1965–1979. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78875-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78875-3)
- Wang, C.T., Ji, B.P., Li, B., Nout, R., Li, P.L., Ji, H., Chen, L.F., 2006. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme of *Bacillus subtilis* DC33, isolated from Chinese traditional Douchi. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33, 750–758. <https://doi.org/10.1007/s10295-006-0111-6>
- Wong, D., Vasanthan, T., Ozimek, L., 2013. Synergistic enhancement in the co-gelation of salt-soluble pea proteins and whey proteins. *Food Chem.* 141, 3913–3919. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.082>
- Wu, C.-H., Chou, C.-C., 2009. Enhancement of Aglycone, Vitamin K2 and Superoxide Dismutase Activity of Black Soybean through Fermentation with *Bacillus subtilis* BCRC 14715 at Different Temperatures. *J. Agric. Food Chem.* 57, 10695–10700. <https://doi.org/10.1021/jf902752t>

Y

- Yao, A.A., Egounlety, M., Kouame, L.P., Thonart, P., 2009. Les bactéries lactiques dans les aliments ou boissons amylicés et fermentés de l’Afrique de l’Ouest: leur utilisation actuelle, in: *Annales de Médecine Vétérinaire*. pp. 54–65.
- Yarza, P., Richter, M., Peplies, J., Euzéby, J., Amann, R., Schleifer, K.-H., Ludwig, W., Glöckner, F.O., Rosselló-Móra, R., 2008. The All-Species Living Tree project: A 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. *Syst. Appl. Microbiol.* 31, 241–250. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.07.001>
- Yousseef, M., Lafarge, C., Valentin, D., Lubbers, S., Husson, F., 2016. Fermentation of cow milk and/or pea milk mixtures by different starter cultures: Physico-chemical and sensorial properties. *LWT - Food Sci. Technol.* 69, 430–437. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.060>
- Yvon, M., Berthelot, S., Gripon, J.C., 1998. Adding α -ketoglutarate to semi-hard cheese curd highly enhances the conversion of amino acids to aroma compounds. *Int. Dairy J.* 8, 889–898.
- Yvon, M., Rijnen, L., 2001. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *Int. Dairy J.* 11, 185–201.

Z

- Zhu, Y., Tramper, J., 2013. Koji – where East meets West in fermentation. *Biotechnol. Adv.* 31, 1448–1457. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.07.001>

ANNEXES

Annexe 1

Tableau (Bibliographie)

Tableau S1. Composition en acide aminés des fractions albumines et globulines chez le pois (Guéguen, 1991)

Acides aminés	Albumine	Globuline
ASP	118	133
THR	56	34
SER	50	54
GLU	149	191
PRO	44	45
GLY	59	40
ALA	58	41
CYS	31	8
VAL	44	48
MET	13	7
ILE	48	47
LEU	48	84
TYR	47	34
PHE	45	55
TRP	15	6
LYS	93	65
HIS	26	26
ARG	56	82
Total	1000	1000

Annexe 2**Tableaux “Supplementary data” du projet d’article n°2**

Table S1 : Experimental design. Strains are clustered according to their phylum and/or their phylogenetic affiliation. For each combination, one or two representatives of each phylum are drawn. The process is repeated once (monocultures) or 10 times (3 to 9 species). The exact species combinations are available upon request.

Number of strains / combination	Number of combination						Total	Number of reshuffled replicates	Number of identical replicates per reshuffled replicate	Total consortia
	G1 (Firmicutes)		G2 (acid-sensitive bacteria)		G3 (Fungi)					
	<i>Lactic acid bacteria</i>	<i>Staphylococcus/Bacillus</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Yeast</i>	<i>Mold</i>				
1	10	6	14	6	12	7	55	1	1 to 3	90
3	1 (2 LAB +1 Staphylococcus or Bacillus)		1 (2 actinobacteria + 1 proteobacteria)		1 (2 yeasts + 1 Mold)		3	10	1	30
6	3 (G1+G2 and G1+G3 and G2+G3)						3	10	1	30
9	1 (G1+G2+G3)						1	10	1	10
TOTAL							62			160

Table S2 : Assembling and composition of microbial consortia for the fermentation of a ME mixed emulsion (50% of pea proteins and 50% milk proteins) and a PE pea emulsion (100% pea proteins)

Emulsion type	G1										G2										G3										Main aromatic sensory attributes describing the fermented pea and pea/milk solutions					
	name of microbial consortia										name of microbial consortia										name of microbial consortia															
	Bacillus altitudinis	Lactobacillus casei	Lactobacillus plantarum	Lactobacillus rhamnosus	Lactobacillus lactis	Leuconostoc lactis	Staphylococcus xylosus	Staphylococcus lentus	Weissella cibaria	Acinetobacter johnsonii	Brevibacterium antitiquum	Brevibacterium casei	Brevibacterium linens	Glutamicibacter arilaitensis	Psychrobacter celer	Corynebacterium casei	Hafnia alvei	Candida catenulata	Debaryomyces hansenii	Debaryomyces hansenii	Geotrichum candidum	Kluyveromyces marxianus	Kluyveromyces lactis	Kluyveromyces lactis	Mucor brunneogriseus	Mucor brunneogriseus	Mucor circineoloides	Mucor hiemalis	Pichia fermentans	Yarrowia lipolytica	Zygosaccharomyces rouxii					
	263	ATCC 334	CNRZ 211T	CNRZ212	S3	NCW1	Com1	Ca2	3385	3M05	CNRZ918	CIPI02111	ATCC 9172	Re117	91	2M01	GB01	ExfComLD	DH304	47(8)	ATCC 204307	38(10)	CLIB196	3550	UBOCC-A-109206	UBOCC-A-109052	UBOCC-A-109198	UBOCC-A-101359	177	CLIB183	26(8)					
Pea protein emulsion (PE)	V1																																Coffee, milk, butter, yogurt			
	V2																																	Coffee, milk, hazelnut		
	V3																																	Grilled hazelnut, caramel		
	V4																																	Brioche, fermented fruit, apricot		
	V5																																		Hazelnut, grilled peanut	
	V6																																		Chocolate, flower	
	V7																																		Sweet almond, sweat and apple	
	V8																																		Melted butter, cheese	
	V9																																		Pea, Bread	
	V10																																		Yogurt, Flower	
Pea and Milk protein emulsion (ME)	M1																																		Yogurt, nutmeg and ammonia	
	M2																																		Grass cut, sour	
	M3																																		Grapefruit, celery	
	M4																																		Apricot, chicory	
	M5																																		Fermented fruit, pineapple, apple, banana and ethanol	
	M6																																		Fermented fruit, pineapple, apple, banana and ethanol	
	M7																																		Fermented fruit, pineapple, apple, banana and ethanol	
	M8																																			Grapefruit, leather
	M9																																			Fresh milk, vanilla, whey acid and chestnut
	M10																																			Orange, cheese rind and acid whey

TableS3.List of attributes used for CATA question

<i>Attribute classes</i>	Vegetal	Roated/Grilled	Floral	Lactic	Fruity	Animal	Other
<i>Descriptors</i>	Pea	Dried fruit	Flower	Fresh milk	Citrus	Cow stable	Ammoniacal
	Garlic/Onion	Smoked	Honey	Cooked milk	Red fruit	Meat broth	Sulfur
	Potato	Dark chocolate		Fresh cream	Banana	Sweat	Acetic
	Fresh grass	Bread		Fresh butter	Pineapple		Rancid
	Grass	Roasted/Grilled		Melted butter	Apricot		Ethanol
	Woody	Coffee		Yoghurt	Apple		Propionic
	Fermented grass	Spicy		Cheese	Fermented fruit		Moldy
		Mint		Rind			Putrid
		Caramel		Acid curd			Sour
		Burned		Fresh curd			Neutral
		Chicory		Whey			Butyric
		Brioche					
	Vanilla						

Annexe 3**Tableaux/Figures “Supplementary data” du projet de publication n° 3****Table S1.** Composition of experimental synthetic communities of strains in combination and their characteristics

VEGAN	MEGAN	ExEco	Strains	Lactose		Galactose		Glucose		Lactate	Citrate	Aspartate	Lipase	Casein hydrolysis	References
				A	F	A	F	A	F	A	A				
			<i>Lactococcus lactis</i> , S3	-	+	-	+	-	+	-	-	nd	nd	+	Teuber, 2011 (Bergey's manual) ; Dugat-Bony et al., 2015
			<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , CNRZ212	-	+	-	+	-	+	-	-	nd	-	nd	Collins et al., 1989; Marcelino, 2013; Berthier et al., 2001
			<i>Leuconostoc lactis</i> , NCW1	-	+	-	+	-	+	-	-	nd	nd	nd	Schleifer, 2011 (Bergey's manual)
			<i>Staphylococcus equorum</i> , Mu2	+	nd	+	nd	+	nd	+	nd	-	+	nd	Monnet et al., 2015a
			<i>Hafnia alvei</i> , GB001	-	-	+	nd	+	nd	+	+	+	nd	+	Our study, Dugat-Bony et al., 2015
			<i>Brevibacterium aurantiacum</i> , ATCC9174	-	-	+	-	+	-	+	+	nd	+	+	Gavrish et al., 2004, Monnet et al., 2015a; Boyaval et al., 1983; Forquin-Gomez et al., 2014
			<i>Brevibacterium antiquum</i> , CNRZ918	-	-	-	-	+	-	+	nd	nd	+	+	Gavrish et al, 2004, Nadi et al., 2005
			<i>Brevibacterium casei</i> , CIP102111	-	-	+	-	+	-	+	+	+	nd	+	Gavrish et al, 2004, Forquin-Gomez et al., 2014
			<i>Corynebacterium casei</i> , UCMA3821	-	-	-	-	+	-	+	+	+	nd	nd	Monnet et al., 2015a
			<i>Glutamicibacter arilaitensis</i> , re117	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	Monnet et al., 2015a, Monnet et al., 2010
			<i>Candida catenulata</i> , Exfcom LD	-	-	+	nd		-	+	-	nd	nd	nd	Prillinger et al., 1999
			<i>Debaryomyces hansenii</i> , DH304	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	Monnet et al., 2015b; Soullignac, 1995
			<i>Geotrichum candidum</i> , ATCC204307	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	Dugat-Bony et al., 2015; Monnet et al., 2015b, Boutrou et Gueguen, 2005
			<i>Kluyveromyces lactis</i> , 3550	+	+	+	+	+	+	+	nd	nd	nd	+	Monnet et al., 2015b,
			<i>Yarrowia lipolytica</i> , CLIB 183	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	Monnet et al., 2015b,

Table S2. List of attributes used for CATA questionnaire presented in 5 classes

<i>classes</i>	Vegetal	Roasted/Grilled	Lactic	Fruity	animal	Other
	cut herb	onion/garlic	fresh milk	citrus	cowshed	Ethanol
	fermented herb	dried fruit	cooked milk	banana	meat broth	Sulfur
	woody	roasted/grilled	fresh curd	pineapple		Moldy
	pea	brioche	fresh cream	apricot		Rancid
	potato	dark chocolate	melted butter	apple		honey
<i>Attributes</i>		coffee	yogurt	fermented fruit		flower
		smoked	rind			sour
		bread	cheese			spicy
		spices				ammonia
						solvent
						neutral

FigS1. Fermented gels (pea, mixed and milk) with the different microbial communities (VEGAN, MEGAN, and ExEco)

Annexes

Table S3. Composition of volatile compounds of control samples and fermented gels with different microbial starters (MEGAN-A and MEGAN-V), results present the main compounds detected (peak area > 0,5% of the total area), "nd": not detected, "trace" : detected but peak area << 0,5% of the total area

Volatile compounds	Theoretical descriptors	CAS number	Control samples			Fermented samples - VEGAN-			Fermented samples - MEGAN-			Fermented samples -ExEco-		
			Pea	Mixed	Milk	Pea	Mixed	Milk	Pea	Mixed	Milk	Pea	Mixed	Milk
Alcools														
Ethanol	sweet	64-17-5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	7,95E+07	2,16E+07	nd	nd	nd
2-methylpropan-1-ol	wine, solvent, bitter	78-83-1	nd	nd	nd	nd	nd	9,17E+06	1,10E+07	2,61E+07	1,03E+07	nd	nd	nd
3-methylbutan-1-ol	whiskey, malt, burnt	123-51-3	trace	nd	nd	3,10E+07	nd	3,25E+07	6,25E+06	2,57E+07	2,09E+07	1,60E+07	1,61E+07	7,64E+06
2-methylbutan-1-ol	wine, onion	137-32-6	nd	nd	nd	3,67E+06	nd	5,83E+06	nd	6,26E+06	nd	nd	2,58E+06	nd
hexan-1-ol	resin, flower, green	111-27-3	6,50E+06	5,51E+06	nd	nd	nd	nd	2,63E+06	trace	nd	nd	nd	nd
Aldehydes_Green														
hexanal	grass, tallow, fat	66-25-1	2,16E+07	2,59E+07	9,15E+06	8,64E+06	8,02E+06	7,30E+06	1,18E+07	1,01E+07	2,45E+07	1,41E+07	9,09E+06	8,68E+06
propanal	solvent, pungent	123-38-6	trace	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
butanal	pungent, green	123-72-8	nd	nd	2,67E+06	3,46E+06	2,78E+06	1,60E+06	nd	nd	nd	nd	nd	1,43E+06
(E)-2-ethylbut-2-enal	flower	4170-30-3	2,53E+06	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
heptanal	fat, citrus, rancid	111-71-7	7,84E+06	9,75E+06	4,57E+06	6,19E+06	6,42E+06	6,04E+06	5,31E+06	6,22E+06	1,94E+07	8,28E+06	6,37E+06	5,52E+06
Nonanal	fat, citrus, green	124-19-6	1,59E+07	1,98E+07	9,27E+06	1,18E+07	1,37E+07	1,73E+07	8,83E+06	1,32E+07	3,52E+07	4,13E+07	2,10E+07	1,39E+07
(E)-non-2-enal	paper	2463-53-8	trace	nd	trace	nd	nd	nd	nd	nd	1,51E+06	1,26E+06	5,65E+05	nd
(E)-oct-2-enal	green	2363-89-5	trace	1,38E+06	7,19E+05	trace	trace	trace	1,17E+06	trace	1,41E+06	1,49E+06	trace	nd
Octanal	fat, soap, lemon, green	124-13-0	9,70E+06	1,16E+07	6,18E+06	7,53E+06	9,01E+06	8,31E+06	7,45E+06	8,44E+06	1,91E+07	1,41E+07	8,73E+06	7,77E+06

Annexes

Volatile compounds	Theoretical descriptors (Flavornet)	CAS number	Control samples			Fermented samples - VEGAN-			Fermented samples -MEGAN-			Fermented samples -ExEco-		
			Pea	Mixed	Milk	Pea	Mixed	Milk	Pea	Mixed	Milk	Pea	Mixed	Milk
Aldehydes_Other														
acetaldehyde	pungent, ether	75-07-0	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	nd	nd	2,52E+07	nd	1,44E+07	nd
2-methyl propanal	pungent, malt	78-84-2	2,13E+06	3,32E+06	1,65E+06	4,71E+06	1,40E+07	2,04E+07	1,08E+07	1,18E+07	9,63E+06	3,90E+06	1,00E+07	1,05E+07
2-methylprop-2-enal	floral	78-85-3	nd	3,57E+06	2,40E+06	1,86E+06	nd	nd	nd	nd	trace	1,75E+06	2,15E+06	1,56E+06
3-methylbutanal	malt	590-86-3	3,07E+06	5,21E+06	1,45E+05	2,68E+07	2,88E+07	2,74E+07	1,17E+07	1,85E+07	1,97E+07	1,39E+07	2,14E+07	1,48E+07
2-methylbutanal	cocoa, almond	96-17-3	1,21E+06	nd	trace	3,98E+06	5,63E+06	7,68E+06	2,96E+06	trace	nd	2,39E+06	3,30E+06	3,42E+06
(2E, 4E)-hepta-2,4-dienal	strawberry, fruit, tomato	1576-87-0	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	1,91E+06	nd	nd	nd	nd	nd
pentanal	fried	431302-4	trace	2,42E+04	nd	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
(E)-hept-2-enal	soap, fat, almond	18829-55-5	1,25E+06	1,70E+06	1,72E+06	1,37E+06	trace	trace	3,67E+06	nd	trace	1,54E+06	trace	nd
Decanal	soap, orange peel, tallow	112-31-2	1,87E+06	1,98E+06	2,19E+06	2,02E+06	2,89E+06	2,15E+06	1,54E+06	trace	nd	3,70E+06	trace	1,91E+06
Aromatic hydrocarbons														
2-methylfuran	chocolate	534-22-5	nd	2,93E+06	nd	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2,3-dihydrofuran	Not identified	1191-99-7	nd	nd	nd	Nd	nd	2,83E+06	nd	3,94E+06	nd	nd	nd	nd
Benzene	Not identified	71-43-2	1,05E+06	6,53E+06	3,07E+06	2,47E+06	1,03E+07	1,56E+06	5,42E+06	trace	1,84E+07	3,93E+06	9,76E+06	2,52E+06
ethylbenzene	Not identified	100-41-4	nd	nd	1,83E+06	Nd	trace	nd	nd	trace	nd	nd	nd	nd
Toluene	paint	108-88-3	1,01E+06	4,83E+06	2,74E+06	9,76E+05	3,85E+06	trace	2,53E+06	trace	5,33E+07	2,17E+06	8,71E+06	1,96E+06
Styrene	balsamic, gasoline	100-42-5	nd	2,11E+06	nd	Nd	nd	trace	1,18E+06	trace	8,46E+06	nd	5,48E+06	nd
benzaldehyde	almond, burnt sugar	100-52-7	3,03E+06	1,49E+07	2,52E+06	3,49E+06	5,02E+06	4,18E+06	4,13E+06	4,92E+06	1,33E+07	3,12E+06	9,93E+06	3,04E+06
2-methylbenzaldehyde	cherry	529-20-4	2,33E+06	2,15E+06	nd	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3-methylbenzaldehyde	Not identified	620-23-5	nd	nd	3,59E+06	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2-pentylfuran	green bean, butter	3777-69-3	nd	2,78E+06	trace	6,04E+06	3,21E+06	trace	1,29E+07	nd	8,05E+05	7,09E+06	1,96E+06	nd
1-benzofuran	Not identified	271-89-6	nd	1,29E+06	nd	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	7,57E+06	nd
pentylbenzene	Not identified	104-51-8	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,37E+06	nd
2-ethylfuran	sweet burnt earthy malty	3208-16-0	nd	3,49E+05	nd	7,62E+06	nd	nd	nd	nd	6,06E+07	1,03E+07	trace	nd

Annexes

Volatile compounds	Theoretical descriptors (Flavornet)	CAS number	Control samples			Fermented samples - VEGAN-			Fermented samples -MEGAN-			Fermented samples -ExEco-		
			Pea	Mixed	Milk	Pea	Mixed	Milk	Pea	Mixed	Milk	Pea	Mixed	Milk
Sulphur compounds														
methyldisulfanylmethane	onion, cabbage, putrid	624-92-0	2,20E+06	3,24E+06	1,50E+06	2,42E+06	4,31E+06	3,45E+06	nd	trace	trace	2,37E+06	3,38E+06	2,38E+06
methylsulfanylmethane	cabbage, sulfur, gasoline	75-18-3	nd	nd	9,13E+05	Nd	trace	1,40E+06	nd	nd	nd	nd	2,12E+06	1,47E+06
Alkanes														
pentane	alkane	109-66-0	7,76E+06	1,53E+06	nd	1,43E+07	nd	trace	1,74E+07	6,40E+06	nd	4,18E+06	nd	3,48E+07
hexane	alkane	110-54-3	1,20E+07	3,77E+06	1,42E+06	2,22E+06	3,19E+06	1,76E+06	5,53E+06	trace	trace	3,12E+06	5,46E+06	1,80E+06
Heptane	alkane	142-82-5	nd	nd	5,73E+06	Nd	nd	4,61E+06	nd	nd	7,72E+06	nd	nd	5,73E+06
Octane	alkane	111-65-9	3,20E+06	3,49E+06	1,88E+06	4,78E+06	4,67E+06	5,69E+06	8,87E+06	trace	7,49E+06	8,15E+06	5,75E+06	4,27E+06
undecane	alkane	1120-21-4	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	nd	trace	1,13E+06	8,90E+05	1,36E+06	1,12E+06
Decane	alkane	124-18-5	nd	nd	2,24E+06	Nd	nd	trace	nd	nd	nd	nd	1,67E+06	nd
Alkenes														
hept-1-ene	Not identified	25339-56-4	nd	2,23E+06	1,25E+06	Nd	trace	trace	nd	trace	1,47E+07	nd	1,95E+06	7,92E+05
oct-1-ene	Not identified	111-66-0	trace	trace	1,12E+06	Nd	trace	trace	trace	nd	nd	trace	1,73E+06	nd
hex-1-ene	Not identified	592-41-6	nd	2,69E+06	8,56E+05	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
non-1-ene	Not identified	124-11-8	nd	nd	1,02E+06	Nd	nd	nd	nd	trace	trace	nd	trace	nd
undec-1-ene	Not identified	821-95-4	nd	nd	1,93E+06	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
dec-1-ene	Not identified	872-05-9	nd	trace	1,60E+06	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
dodec-1-ene	Not identified	112-41-4	nd	nd	1,57E+06	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Annexes

Volatile compounds	Theoretical descriptors (Flavornet)	CAS number	Control samples			Fermented samples - VEGAN-			Fermented samples - MEGAN-			Fermented samples -ExEco-		
			Pea	Mixed	Milk	Pea	Mixed	Milk	Pea	Mixed	Milk	Pea	Mixed	Milk
Ketones														
3-methylbutan-2-one	camphor	563-80-4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2,18E+07	nd	nd	nd	nd	nd
butan-2-one	ether	78-93-3	5,03E+06	nd	nd	nd	nd	nd	3,03E+06	trace	nd	nd	nd	nd
propan-2-one	ether	67-64-1	9,06E+06	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
pentan-2-one	ether, fruit	107-87-9	nd	3,19E+06	nd	nd	nd	nd	1,04E+06	nd	nd	nd	nd	nd
heptan-2-one	soap	110-43-0	3,87E+06	2,18E+06	7,12E+05	1,20E+06	1,40E+06	trace	1,79E+06	trace	1,37E+07	trace	trace	4,05E+05
nonan-3-one	jasmin, fruity, spicy herbal	925-78-0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	6,46E+06	nd	nd	nd
hexan-2-one	ether	591-78-6	trace	1,69E+06	nd	nd	nd	nd	nd	nd	4,80E+07	nd	nd	nd
3-buten-2-one	sweet	78-94-4	nd	2,96E+05	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
6-methylhept-5-en-2-one	pepper, mushroom, rubber	110-93-0	nd	nd	nd	1,64E+06	1,81E+06	trace	nd	nd	1,09E+06	1,50E+06	trace	nd
butane-2,3-dione	butter creamy caramel	431-03-8	nd	nd	nd	nd	1,08E+08	5,14E+07	nd	5,82E+07	8,56E+06	nd	1,05E+07	nd
Esters														
ethyl acetate	pineapple	141-78-6	nd	nd	nd	nd	nd	trace	nd	4,37E+06	2,99E+08	nd	5,74E+06	2,30E+06
ethyl propanoate	fruity, apple, grape, bubble gum	105-37-3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3,11E+06	nd	nd	nd
2-methylpropyl acetate	fruity, banana, sweet	110-19-0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3,71E+06	nd	nd	nd
3-methylbutyl acetate	fruity, banana, sweet, green, ripe	123-92-2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,79E+06	nd	nd	nd

Annexe 4

Tableau "Supplementary data" du chapitre II.4

Annexes

Table S1. Composition of volatile compounds of control samples and fermented gels with different microbial starters (MEGAN-A and MEGAN-V), results present the main compounds detected (peak area > 0,5% of the total area), "nd": not detected, "trace" : detected but peak area << 0,5% of the total area

Volatile compounds	Theoretical descriptors (Flavornet)	CAS number	Pea			Mixed			Milk		
			Control	MEGAN-A	MEGAN-V	Control	MEGAN-A	MEGAN-V	Control	MEGAN-A	MEGAN-V
Alcools											
Ethanol	sweet	64-17-5	nd	nd	nd	nd	7,95E+07	nd	nd	2,16E+07	5,01E+07
2-methylpropan-1-ol	wine, solvent, bitter	78-83-1	nd	1,10E+07	nd	nd	2,61E+07	trace	nd	1,03E+07	nd
3-methylbutan-1-ol	whiskey, malt, burnt	123-51-3	trace	6,25E+06	nd	nd	2,57E+07	1,04E+07	nd	2,09E+07	1,13E+07
2-methylbutan-1-ol	wine, onion	137-32-6	nd	nd	nd	nd	6,26E+06	nd	nd	nd	nd
hexan-1-ol	resin, flower, green	111-27-3	6,50E+06	2,63E+06	nd	5,51E+06	trace	nd	nd	nd	nd
Aldehydes_Green											
hexanal	grass, tallow, fat	66-25-1	2,16E+07	1,18E+07	1,64E+07	2,59E+07	1,01E+07	9,42E+06	9,15E+06	2,45E+07	1,07E+07
propanal	solvent, pungent	123-38-6	trace	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
butanal	pungent, green	123-72-8	nd	nd	4,61E+06	nd	nd	nd	2,67E+06	nd	3,24E+06
(E)-2-ethylbut-2-enal	flower	4170-30-3	2,53E+06	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
heptanal	fat, citrus, rancid	111-71-7	7,84E+06	5,31E+06	1,21E+07	9,75E+06	6,22E+06	6,49E+06	4,57E+06	1,94E+07	7,72E+06
Nonanal	fat, citrus, green	124-19-6	1,59E+07	8,83E+06	1,94E+07	1,98E+07	1,32E+07	1,68E+07	9,27E+06	3,52E+07	3,03E+07
(E)-non-2-enal	paper	2463-53-8	trace	nd	1,02E+06	nd	nd	nd	nd	1,51E+06	nd
(E)-oct-2-enal	green	2363-89-5	trace	1,17E+06	1,43E+06	1,38E+06	trace	nd	7,19E+05	1,41E+06	1,04E+06
Octanal	fat, soap, lemon, green	124-13-0	9,70E+06	7,45E+06	1,46E+07	1,16E+07	8,44E+06	9,16E+06	6,18E+06	1,91E+07	1,30E+07
Aldehydes_Other											
acetaldehyde	pungent, ether	75-07-0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2,52E+07	1,39E+07
2-methyl propanal	pungent, malt	78-84-2	2,13E+06	1,08E+07	7,34E+06	3,32E+06	1,18E+07	1,35E+07	1,65E+06	9,63E+06	1,13E+07
2-methylprop-2-enal	floral	78-85-3	nd	nd	5,53E+06	3,57E+06	nd	nd	2,40E+06	trace	2,74E+06
3-methyl butanal	malt	590-86-3	3,07E+06	1,17E+07	8,25E+06	5,21E+06	1,85E+07	2,19E+07	1,45E+05	1,97E+07	2,31E+07
2-methylbutanal	cocoa, almond	96-17-3	1,21E+06	2,96E+06	trace	nd	trace	6,77E+06	trace	nd	5,74E+06
(2E,4E)-hepta-2,4-dienal	fried	431302-4	nd	1,91E+06	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
pentanal	almond, malt, pungent	110-62-3	trace	nd	nd	2,42E+04	nd	4,36E+06	nd	nd	nd
(E)-hept-2-enal	soap, fat, almond	18829-55-5	1,25E+06	3,67E+06	3,16E+06	1,70E+06	nd	nd	1,72E+06	nd	nd
Decanal	soap, orange peel, tallow	112-31-2	1,87E+06	1,54E+06	trace	1,98E+06	nd	nd	2,19E+06	nd	2,34E+06

Annexes

Volatile compounds	Theoretical descriptors (Flavornet)	CAS number	Pea			Mixed			Milk		
			Control	MEGAN-A	MEGAN-V	Control	MEGAN-A	MEGAN-V	Control	MEGAN-A	MEGAN-V
Aromatic hydrocarbons											
2-methyl furan	Chocolate	534-22-5	nd	nd	3,09E+07	trace	nd	nd	nd	nd	nd
2,3-dihydrofuran	Not identified	1191-99-7	nd	nd	nd	nd	3,94E+06	nd	nd	nd	nd
Benzene	Not identified	71-43-2	1,05E+06	5,42E+06	2,90E+07	6,53E+06	trace	nd	3,07E+06	1,84E+07	1,13E+06
ethylbenzene	Not identified	100-41-4	nd	nd	6,46E+06	nd	trace	nd	1,83E+06	nd	nd
Toluene	Paint	108-88-3	1,01E+06	2,53E+06	1,76E+07	4,83E+06	trace	nd	2,74E+06	5,33E+07	nd
Styrene	balsamic, gasoline	100-42-5	nd	1,18E+06	8,49E+06	2,11E+06	trace	nd	nd	8,46E+06	nd
benzaldehyde	almond, burnt sugar	100-52-7	3,03E+06	4,13E+06	1,66E+07	1,49E+07	4,92E+06	3,24E+06	2,52E+06	1,33E+07	3,24E+06
2-methylbenzaldehyde	Cherry	529-20-4	2,33E+06	nd	nd	2,15E+06	nd	nd	nd	nd	nd
3-methylbenzaldehyde	Not identified	620-23-5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3,59E+06	nd	nd
2-pentylfuran	green bean, butter	3777-69-3	nd	1,29E+07	1,20E+07	2,78E+06	nd	2,73E+06	trace	8,05E+05	nd
1-benzofuran	Not identified	271-89-6	nd	nd	7,73E+06	1,29E+06	nd	nd	nd	nd	nd
pentylbenzene	Not identified	538-68-1	nd	nd	2,94E+06	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2-ethylfuran	sweet burnt earthy	3208-16-0	nd	nd	nd	3,49E+05	nd	nd	nd	6,06E+07	nd
Sulphur compounds											
methylsulfonylmethane	onion, cabbage, putrid	624-92-0	2,20E+06	nd	trace	3,24E+06	trace	2,12E+06	1,50E+06	trace	2,90E+06
methylsulfanylmethane	cabbage, sulfur,	75-18-3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	9,13E+05	nd	nd
Alkanes											
pentane	Alkane	109-66-0	7,76E+06	1,74E+07	nd	1,53E+06	6,40E+06	5,73E+06	nd	nd	nd
hexane	Alkane	110-54-3	1,20E+07	5,53E+06	7,82E+06	3,77E+06	trace	nd	1,42E+06	trace	1,86E+06
Heptane	Alkane	142-82-5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	5,73E+06	7,72E+06	nd
Octane	Alkane	111-65-9	3,20E+06	8,87E+06	1,25E+07	3,49E+06	trace	nd	1,88E+06	7,49E+06	nd
undecane	Alkane	1120-21-4	nd	nd	1,97E+06	nd	trace	nd	nd	1,13E+06	nd
dodecane	Alkane	112-40-3	nd	nd	trace	nd	nd	nd	nd	nd	trace
Decane	Alkane	124-18-5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2,24E+06	nd	nd
Alkenes											
hept-1-ene	Not identified	25339-56-4	nd	nd	1,30E+07	2,23E+06	trace	nd	1,25E+06	1,47E+07	trace
oct-1-ene	Not identified	111-66-0	trace	trace	nd	trace	nd	nd	1,12E+06	nd	nd
hex-1-ene	Not identified	592-41-6	nd	nd	1,70E+07	2,69E+06	nd	nd	8,56E+05	nd	nd
non-1-ene	Not identified	124-11-8	nd	trace	7,98E+06	nd	trace	nd	1,02E+06	nd	nd
undec-1-ene	Not identified	821-95-4	nd	nd	1,02E+07	nd	nd	nd	1,93E+06	nd	nd
dec-1-ene	Not identified	872-05-9	nd	nd	nd	trace	nd	nd	1,60E+06	nd	nd
dodec-1-ene	Not identified	112-41-4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,57E+06	nd	nd

Annexes

Volatile compounds	Theoretical descriptors (Flavornet)	CAS number	Pea			Mixed			Milk		
			Control	MEGAN-A	MEGAN-V	Control	MEGAN-A	MEGAN-V	Control	MEGAN-A	MEGAN-V
Ketones											
3-methylbutan-2-one	Camphor	563-80-4	nd	2,18E+07	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
butan-2-one	Ether	78-93-3	5,03E+06	3,03E+06	nd	nd	trace	nd	nd	nd	nd
propan-2-one	Ether	67-64-1	9,06E+06	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
pentan-2-one	ether, fruit	107-87-9	nd	1,04E+06	nd	3,19E+06	nd	nd	nd	nd	nd
heptan-2-one	Soap	110-43-0	3,87E+06	1,79E+06	4,68E+06	2,18E+06	trace	nd	nd	1,37E+07	nd
nonan-3-one	jasmin, fruity, spicy herbal	925-78-0	nd	nd	9,39E+05	nd	nd	nd	nd	6,46E+06	trace
hexan-2-one	Ether	591-78-6	nd	nd	nd	1,69E+06	nd	nd	nd	4,80E+07	nd
1-phenylethanone	must, flower, almond	98-86-2	nd	nd	8,60E+06	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3-buten-2-one	Sweet	78-94-4	nd	nd	nd	2,96E+05	nd	nd	nd	nd	nd
6-methylhept-5-en-2-one	pepper, mushroom, rubber	110-93-0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,09E+06	nd
butane-2,3-dione	butter creamy caramel	431-03-8	nd	nd	nd	nd	5,82E+07	5,30E+07	nd	8,56E+06	3,29E+07
Esters											
ethyl acetate	Pineapple	141-78-6	nd	nd	nd	nd	4,37E+06	2,05E+07	nd	2,99E+08	2,21E+06
ethyl propanoate	fruity, apple, grape, bubble gum	105-37-3	nd	nd	4,35E+06	nd	nd	nd	nd	3,11E+06	1,08E+06
ethyl 3-methylbutanoate	fruity, apple, pineapple	108-64-5	nd	nd	1,52E+07	nd	nd	1,56E+07	nd	nd	nd
3-methylbutyl acetate	fruity, apple, orange, pineapple, green	123-92-2	nd	nd	3,23E+06	nd	nd	2,36E+07	nd	1,79E+06	3,42E+06
ethyl-2-methylpropanoate	sweet, fryuity, pungnt, alcoholic,	97-62-1	nd	nd	nd	nd	nd	3,65E+07	nd	nd	3,67E+06
2-methylpropyl acetate	fruity, banana, tutti fruity	110-19-0	nd	nd	nd	nd	nd	4,09E+06	nd	3,71E+06	nd
Acid											
2-methylbutanoic acid	cheesy, dairy, fruity, dirty	116-53-0	nd	nd	nd	nd	nd	1,32E+07	nd	nd	5,43E+06

Annexe5**Tableau "Supplementary data" du chapitre 5****TableS1.**Composition of experimental synthetic communities of strains in combination

	VEGAN	MEGAN_A	MEGAN_V
Strains	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , CNRZ212 <i>Leuconostoc lactis</i> , NCW1 <i>Hafnia alvei</i> , GB001 <i>Brevibacterium antiquum</i> , CNRZ918 <i>Brevibacterium casei</i> , CIP102111 <i>Candida catenulata</i> , Exfcom LD <i>Geotrichum candidum</i> , ATCC204307 <i>Yarrowia lipolytica</i> , CLIB 183	<i>Lactococcus lactis</i> , S3 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , CNRZ212 <i>Candida catenulata</i> , Exfcom LD <i>Geotrichum candidum</i> , ATCC204307 <i>Kluyveromyces lactis</i> , 3550	<i>Lactococcus lactis</i> , JIM2965 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LMG10772 <i>Candida catenulata</i> CLIB1179 <i>Geotrichum candidum</i> CLIB1154 <i>Kluyveromyces lactis</i> NCYC2997

Annexes

TableS2. Volatile compounds present in non-fermented and fermented pea and mixed gels. Comparison of quantities (peak area) for three consortia VEGAN, MEGAN-A and MEGAN-V. Within a table line, peak areas with different superscript letters are significantly different ($\alpha \leq 0.05$). Green letters refer to pea gels. Blue letters refer to mixed gels.

Volatile compounds	Sensory descriptors from literature (Flavornet)	CAS number	Control samples		Fermented samples			
			Pea	Mixed	VEGAN	MEGAN-A	MEGAN-V	
					Pea	Mixed	Pea	Mixed
Alcools								
Ethanol	sweet	64-17-5	nd ^b	8,05E+06 ^c	nd ^b	1,11E+08 ^a	1,32E+07 ^a	2,55E+07 ^b
2-methylpropan-1-ol	wine, solvent, bitter	78-83-1	nd ^b	nd	nd ^b	nd ^b	2,23E+06 ^a	3,86E+06 ^a
2-methylbutan-1-ol	wine, onion	137-32-6	nd ^b	nd	7,09E+06 ^a	nd	nd ^b	nd
pent-1-en-3-ol	butter, pungent	616-25-1	1,10E+06 ^a	8,58E+05 ^a	nd ^b	nd ^b	nd ^b	nd ^b
propan-1-ol	alcohol, pungent	71-23-8	nd ^b	nd	2,28E+06 ^a	nd	nd ^b	nd
propan-2-ol	alcohol, pungent	67-63-0	5,34E+06 ^a	1,10E+07 ^a	3,36E+06 ^b	nd ^b	2,71E+06 ^b	1,25E+07 ^a
Aldehydes_Green								
hexanal	grass, tallow, fat	66-25-1	1,96E+07 ^a	1,03E+07 ^a	1,54E+06 ^b	1,10E+06 ^c	3,03E+06 ^b	4,85E+06 ^b
propanal	solvent, pungent	123-38-6	5,26E+06 ^a	4,76E+06 ^a	3,69E+05 ^b	nd ^b	nd ^b	nd ^b
butanal	pungent, green	123-72-8	2,33E+06 ^a	1,11E+06 ^a	nd ^b	nd ^b	nd ^b	nd ^b
Aldehydes_Other								
acetaldehyde	pungent, ether	75-07-0	1,51E+06 ^a	nd ^b	nd ^b	3,62E+0 ^a	nd ^b	nd ^b
2-methylpropanal	pungent, malt	78-84-2	nd ^b	nd ^c	nd ^b	1,69E+07 ^b	1,97E+07 ^a	2,80E+07 ^a
3-methylbutanal	malt	590-86-3	2,89E+06 ^a	1,85E+06 ^b	2,56E+07 ^b	1,26E+07 ^a	8,67E+06 ^a	1,39E+07 ^a
2-methylbutanal	cocoa, almond	96-17-3	1,46E+06 ^a	7,11E+05 ^c	4,83E+06 ^b	2,03E+06 ^a	3,52E+05 ^b	7,33E+05 ^b
(2E,4E)-hexa-2,4-dienal	green, fruity, melon, fresh	142-83-6	nd	nd ^b	nd	2,09E+06 ^a	nd	nd ^b
pentanal	fried	431302-4	9,95E+06 ^a	nd	nd ^b	nd	nd ^b	nd
Aromatic hydrocarbons								
2-methyl furan	chocolate	534-22-5	nd	7,29E+05 ^a	nd	4,32E+05 ^b	nd	1,15E+06 ^c
Toluene	paint	108-88-3	1,73E+06 ^a	nd	nd ^b	nd	nd ^b	nd
2-pentylfuran	green bean, butter	3777-69-3	1,79E+06 ^a	nd	6,06E+05 ^b	nd	nd ^c	nd
2-ethylfuran	sweet burnt earthy malty	3208-16-0	4,01E+06 ^a	1,79E+06 ^a	1,21E+06 ^b	nd ^b	2,96E+06 ^a	2,56E+06 ^a
Sulphur compounds								
methyldisulfanylmethane	onion, cabbage, putrid	624-92-0	3,54E+06 ^b	7,11E+05 ^a	5,27E+06 ^a	6,13E+05 ^a	nd ^c	7,85E+05 ^a

Annexes

Volatile compounds	Sensory descriptors from literature (Flavornet)	CAS number	Control samples		Fermented samples			
			Pea	Mixed	VEGAN	MEGAN-A	MEGAN-V	
					Pea	Mixed	Pea	Mixed
Alkanes								
pentane	alkane	109-66-0	5,60E+06 ^b	2,32E+06 ^b	4,58E+06 ^b	5,39E+06 ^a	1,15E+07 ^a	6,20E+06 ^a
hexane	alkane	110-54-3	4,76E+06 ^b	3,70E+06 ^a	6,41E+06 ^a	1,24E+06 ^b	2,00E+06 ^c	3,69E+06 ^b
heptane	alkane	142-82-5	1,21E+06 ^b	nd ^b	nd ^c	nd ^b	2,81E+06 ^a	3,15E+06 ^a
Octane	alkane	111-65-9	1,81E+06 ^a	2,58E+06 ^b	2,80E+06 ^a	1,88E+06 ^b	nd ^b	5,51E+06 ^a
nonane	alkane	111-84-2	nd ^b	nd	2,41E+05 ^a	nd	nd ^b	nd
Alkenes								
hex-1-ene	Not identified	592-76-7	nd	nd ^b	nd	nd ^b	nd	8,92E05 ^a
2-methylbuta-1,3-diene	Not identified	78-79-5	nd	nd ^b	nd	2,68E+05 ^a	nd	nd ^b
Ketones								
butan-2-one	ether	78-93-3	7,31E+06 ^a	6,99E+06 ^a	2,42E+06 ^b	1,91E+06 ^c	2,79E+06 ^b	4,84E+06 ^b
propan-2-one	ether	67-64-1	3,40E+07 ^a	4,03E+07 ^a	1,83E+07 ^b	nd ^b	nd ^c	nd ^b
pentan-2-one	ether, fruit	107-87-9	nd ^b	5,96E+06 ^a	nd ^b	nd ^b	6,91E+0 ^a	nd ^b
heptan-2-one	soap	110-43-0	3,76E+06 ^a	1,97E+06 ^a	nd ^b	6,11E+05 ^b	nd ^b	nd ^c
butane-2,3-dione	butter creamy caramel	431-03-8	nd	nd ^c	nd	1,95E+07 ^b	nd	6,99E+07 ^a
Esters								
ethyl acetate	pineapple	141-78-6	nd ^b	nd ^b	nd ^b	2,88E+06 ^a	1,10E+06 ^a	1,62E+06 ^a
methyl acetate	fruity, banana, sweet	79-20-9	1,90E+06 ^a	nd	nd ^b	nd	nd ^b	nd
ethyl-2-methylpropanoate	sour, acid, fruity, berry	97-62-1	nd ^b	nd ^b	nd ^b	nd ^b	1,92E+06 ^a	7,33E+05 ^a
ethyl 3-methylbutanoate	fruity, pineapple	108-64-5	nd ^b	nd	nd ^b	nd	2,60E+06 ^a	nd
Acid								
(E)-2-methylpent-2-enoic acid	fruity, acidic, berry	3142-72-1	nd ^b	nd	nd ^b	nd	3,82E+06 ^a	nd

Titre : Formuler des consortia microbiens pour piloter les propriétés sensorielles des gels à base de protéines de pois : Mieux comprendre l'effet de la matrice et des communautés microbiennes sur les propriétés sensorielles
Mots clés : protéines végétales, fermentation, bénéfices sensoriels, consortia microbiens

Résumé : Les systèmes alimentaires occidentaux ne sont pas durables en termes d'impacts environnementaux et d'effet sur la santé. Une solution est de revisiter les modes de consommation en favorisant les produits à base de protéines végétales. Cependant, un des verrous à l'introduction des protéines végétales dans notre alimentation est leurs défauts sensoriels qui sont un frein à l'acceptabilité des produits par les consommateurs. La fermentation est un procédé ancien qui pourrait être un levier à ce verrou sensoriel. Dans ce contexte, l'objectif de ce projet de thèse est d'étudier les bénéfices sensoriels apportés par la fermentation de gels enrichis en protéines végétales à l'aide de consortia microbiens sélectionnés. Pour cela, une stratégie alliant analyses sensorielles, microbiologie et physicochimie a été mise en œuvre. Deux types de matrices contenant 10% de protéines et 10% d'huile de colza ont été étudiés : la première est constituée de 100% de protéines de pois et la deuxième est constituée d'un mélange de protéines de lait (50%) et de pois (50%). Sur la base des connaissances de la matrice et des propriétés fonctionnelles des micro-organismes, 56 souches microbiennes ont été sélectionnées. Une stratégie raisonnée d'assemblage de ces souches a été mise en place, basée sur la répartition équilibrée selon leur groupe phylogénétique, mais aussi sur la connaissance experte des fonctions cibles aromatiques recherchées. En parallèle, plusieurs procédés de gélification ont été étudiés pour structurer les gels. Dans un premier temps, la fermentation a été étudiée sur des émulsions non gélifiées pour permettre la sélection des communautés microbiennes spécifiques pour chaque matrice. Dans un second temps, le potentiel d'adaptation et de fonctionnement des écosystèmes sélectionnés ont été étudiés sur les émulsions gélifiées. La croissance et l'abondance des micro-organismes dans les gels après trois et sept jours de fermentation ont été évaluées sur milieu spécifique et le potentiel aromatique des consortia a été cartographié par un panel sensoriel.

Dans une dernière partie du travail, les défauts/bénéfices sensoriels de la fermentation ont été étudiés de point de vue sensoriel et analytique. Les résultats montrent un fort potentiel d'implantation des bactéries lactiques (principalement *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus casei*) et de la majorité des eucaryotes (en particulier *Mucor* et *Geotrichum*) pour l'émulsion mixte comme pour l'émulsion végétale. Même si les souches appartenant aux groupes *Actinobacteria* et *Proteobacteria* ne soient pas compétitives vis-à-vis de la flore endogène (*Bacillus*), certaines espèces comme *Hafnia alvei*, *Acinetobacter johnsonii* et *Glutamicibacter arilaitensis*, ont montré une forte croissance quand elles sont inoculées en associations. Des notes aromatiques spécifiques pour chaque émulsion ont été générées permettant de masquer la note végétale « verte » caractéristique du pois. Ainsi, deux consortia ont pu être sélectionnés sur la base de notes lactiques et fruitées pour l'émulsion végétale (VEGAN), et de notes fruitées pour l'émulsion mixte (MEGAN). Le potentiel d'adaptation de ces deux consortia dépendait de la composition et de la structure des gels. Ainsi, le consortium VEGAN semble bien adapté pour le gel végétal et génère des notes torréfiées/grillées, alors qu'il génère des notes laitières (crème fraîche/caillé frais) dans le gel mixte. Le consortium MEGAN s'implante très bien dans les deux types de gels, générant des notes fromagères et fruitées dans le gel mixte, mais ne permet pas de masquer les notes vertes dans le gel végétal. Les défauts sensoriels attribués aux notes vertes et à l'amertume sont liés principalement à la présence des aldéhydes et des acides aminés hydrophobes respectivement, mais restent encore à approfondir. Cette étude a permis de valider une preuve de concept de formulation de produits alimentaire fermentés et ouvre la voie vers de nombreuses innovations.

Title : Formulate microbial consortia to control the sensory properties of pea protein gels: Better understand the effect of matrix and microbial communities on the sensory properties

Keywords : plant proteins, fermentation, sensory benefits, microbial consortia

Abstract: Western food systems are not sustainable in terms of environmental impacts and health effects. One solution is to revisit consumption patterns by favoring products based on plant proteins. However, one of the barriers to the introduction plant proteins in our diet is their sensory defects which can be obstacles for the acceptability of products by consumers. Fermentation is an ancient process that could be a solution to this sensory issue. In this context, the aim of this PhD thesis is to study the sensory benefits provided by the fermentation of plant protein-based gels using selected microbial consortia. In order to accomplish this, a strategy combining sensory analyzes, microbiology and physicochemistry was implemented. Two types of matrices containing 10% protein and 10% rapeseed oil were studied: the first consists of 100% pea protein and the second consists of a mixture of milk proteins (50%) and pea proteins (50%). Based on knowledge of the matrix and the functional properties of microorganisms, 56 microbial strains were selected. A reasoned strategy of assembly of these strains was put in place, based on the balanced distribution according to their phylogenetic group, but also on the expert knowledge of the desired aromatic functions. In parallel, several gelling processes were studied to structure the gels. In the first step, the fermentation was studied on non-gelled emulsions to allow the selection of specific microbial communities for each matrix. In the second step, the adaptation and functioning potential of the selected ecosystems were studied on gelled emulsions. The growth and abundance of microorganisms in the gels after three and seven days of fermentation were evaluated on a specific growing medium

and the aromatic potential of the consortia was mapped by a sensory panel. In the final section of this study, the sensory defects / benefits of fermentation were studied from a sensorial and analytical point of view. The results show a high potential for implantation of lactic acid bacteria and the majority of eukaryotes (in particular *Mucor* and *Geotrichum*) for the mixed emulsion and for the vegetable emulsion. Although strains belonging to the *Actinobacteria* and *Proteobacteria* groups are not competitive with endogenous flora (*Bacillus*), certain species such as *Hafnia alvei*, *Acinetobacter johnsonii* and *Glutamicibacter arilaitensis*, have shown strong growth when inoculated into associations. Specific aromatic notes for each emulsion were generated to mask the green note characteristic of peas. Thus, two consortia were selected on the basis of lactic and fruity notes for the vegetable emulsion (VEGAN), and fruity notes for the mixed emulsion (MEGAN). The adaptation potential of these two consortia depended on the composition and structure of the gel. Thus, the VEGAN consortium seems well suited for vegetable gels and generates roasted / grilled notes, while it generates dairy notes (fresh cream / fresh curd) in the mixed gels. The MEGAN consortium implements itself very well in both types of gels, generating cheesy and fruity notes in the mixed gel, but does not mask the green notes in the vegetable gels. The sensory defects attributed to green notes and bitterness are mainly related to the presence of aldehydes and hydrophobic amino acids respectively, but still need to be deepened. This study validated a proof of concept of formulation of fermented food products and will create opportunities for innovation.