



HAL
open science

**Valorisation de sous-produits végétaux par fermentation
pour la production de composés à valeur ajoutée :
Production d'acide L-lactique par fermentation de pulpe
de carottes**

Justine Godard

► **To cite this version:**

Justine Godard. Valorisation de sous-produits végétaux par fermentation pour la production de composés à valeur ajoutée : Production d'acide L-lactique par fermentation de pulpe de carottes. Biochimie [q-bio.BM]. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSE1191 . tel-03394662

HAL Id: tel-03394662

<https://theses.hal.science/tel-03394662>

Submitted on 22 Oct 2021

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

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



N°d'ordre NNT : 2020LYSE1191

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 205
Ecole doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé (EDISS)

Spécialité de doctorat : Sciences de la vie, biologie, santé
Discipline : Biochimie

Soutenue publiquement le 21/10/2020, par :
Justine Godard

Valorisation de sous-produits végétaux par fermentation pour la production de composés à valeur ajoutée-Production d'acide L-lactique par fermentation de pulpe de carottes

Devant le jury composé de :

Comte, Gilles, Professeur, Université Claude Bernard-Lyon 1/UMR 5557CNRS/INRAE/Université Lyon 1/VETAGROSUP, Ecologie Microbienne, Président

Dary, Annie, Professeure, Université de Lorraine/Equipe CALBINOTOX, Rapporteur
Dhulster, Pascal, Professeur, Université de Lille/UMR1158-TRANSFRONTALIERE BIOECOAGRO, Rapporteur

Comte, Gilles, Professeur, Université Claude Bernard-Lyon 1/UMR 5557CNRS/INRAE/Université Lyon 1/VETAGROSUP, Ecologie Microbienne, Examineur

Leriche, Françoise, Maître de Conférences, VetAgroSup/UMR INRAE/Université Clermont Auvergne/VetAgroSup sur le fromage, Examinatrice

Oulahal, Nadia, Maître de Conférences, Université Claude Bernard-Lyon 1/Laboratoire BioDyMIA, Equipe mixte d'accueil Université Lyon 1/ISARA Lyon n°3733, Examinatrice

Degraeve, Pascal, Professeur, Université Claude Bernard-Lyon 1/Laboratoire BioDyMIA, Equipe mixte d'accueil Université Lyon 1/ISARA Lyon n°3733, Directeur de thèse

Wezel, Alexander, Directeur de la recherche, ISARA/Unité Agroécologie et environnement, Invité



THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 205
Ecole doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé (EDISS)

Spécialité de doctorat : Sciences de la vie, biologie, santé
Discipline : Biochimie

Soutenue publiquement le 21/10/2020, par :
Justine Godard

Valorisation de sous-produits végétaux par fermentation pour la production de composés à valeur ajoutée-Production d'acide L-lactique par fermentation de pulpe de carottes

Laboratoire d'accueil : Bioingénierie et Dynamique Microbienne aux Interfaces des Aliments- Equipe mixte d'accueil Université Lyon 1/ISARA – EA n°3733

Université Claude Bernard – LYON 1

Administrateur provisoire de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BENHADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Jean-François MORNEX
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur : M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : M. Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Éducation	Administrateur provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : M. Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administrateur provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

A Mamie'chat

Remerciements

Ce travail a pu être réalisé grâce au support financier du fond de dotation « TERRA-ISARA », et des cinq industriels partenaires du projet : Charles et Alice, Florette, Panzani, Philibert Savours et Pierre Martinet. Je les remercie pour avoir accepté de financer ce projet. Merci également d'avoir suivi ce projet, et des échanges que nous avons eu au cours des différents comités de pilotage.

Mes sincères remerciements Pascal Degraeve, pour avoir accepté la direction de cette thèse, votre aide, vos conseils pour la finalisation de ce manuscrit et votre disponibilité dans cette dernière ligne droite. Merci Alexander Wezel pour ton suivi au sein de l'ISARA, ton aide dans l'organisation de ces derniers mois et tes retours au début de la rédaction.

Merci Annie Dary et Pascal Dhulster d'avoir accepté d'être rapporteurs et d'évaluer mon travail de thèse. Merci également Françoise Leriche, Gilles Comte et Nadia Oulahal pour votre participation en tant qu'examineurs.

Merci Agnès Girard-Egrot et Gilles Comte pour vos conseils lors des comités de suivi de thèse.

Véronique, Sylvie, Nathalie et Arnaud, je vous remercie pour votre aide au labo. J'ai apprécié échanger avec vous au cours de ces trois années. L'équipe Philibert, Annabelle, Hanen et Dan, c'était chouette de partager des moments avec vous. Merci pour votre bienveillance et de m'avoir dépanné quand j'avais oublié de commander de la Taq... des sachets anaérobiose... des milieux... bref, merci !

Julianne et Sandrine, j'espère avoir été assez présente au cours de vos stages. J'ai eu de la chance que vous m'aidiez, vous avez été top ! Je vous souhaite le meilleur, vous le méritez ! Merci Abir, Julia, Marine, Marine, Olivia, Rym, Cécilia et Elodie pour votre présence au labo.

Merci Didier Hennequin et Vincent Payet pour votre aide en statistiques, d'avoir pris le temps de m'expliquer ce monde obscur. Merci Didier de m'avoir permis de donner des cours à l'université, c'était une bonne expérience. Merci Vincent pour ton aide précieuse sur la dernière ligne droite.

Un immense merci Joël et Florian pour votre soutien. De m'avoir aidé à trouver des solutions dans des situations que je pensais bloquées et de votre patience aussi. Merci d'avoir repéré les moments où j'avais le plus besoin d'écoute et de m'avoir accordé du temps.

Mille merci à tout le personnel de l'ISARA pour les pauses méridionales (?!), les pauses cafés du matin et d'avoir partagé vos expériences : Valérie, Marine et Mathieu (meilleure team pour les mots fléchés, même en confinement), Thomas (pour les blagues dont toi seul a le secret), Thierry (pour ta gentillesse), Emilien (pour ton aide sur l'enquête Alain Bonhomme), Valentine, Mathieu, Jean-François,

Robin, Soraya, Hager... et c'est honteux mais j'en oublie... Merci aussi à l'équipe AGE, j'ai eu le sentiment de faire partie de votre équipe parfois.

Merci Yan et Arnaud d'avoir accepté ma présence dans cette halle techno aux conditions d'hygiène et de sécurité très strictes. Je me sens privilégiée du coup ! Merci pour votre bonne humeur, vos rires trop forts (mais communicatifs) et de votre aide quand j'avais du mal à comprendre le fonctionnement, aussi simple soit-il, d'un robot mixeur.

Merci à toutes les personnes qui m'ont permis de lâcher prise parfois : toutes les personnes rencontrées pendant la formation « ma thèse en 180' », au groupe d'éloquence des Rancy, à la team Improse-toi. Vos conseils ont été précieux.

Je pense aussi à ceux qui m'ont donné envie de faire cette thèse : Anne (ta bienveillance et tes conseils m'aident depuis le lycée, merci), toute l'équipe du LMSM, Margot (merci de m'avoir permis de mettre mon nom sur mon tout premier article, c'est si spécial), toute l'équipe Déziel (merci de m'avoir transmis un esprit d'équipe si fort et de m'avoir donné des bases solides). Merci à tous de m'avoir accordé votre confiance alors que j'en manquais moi-même.

Mes bébés chercheurs, vous n'avez pas idée à quel point votre soutien a été indispensable. Je suis si heureuse/chanceuse/reconnaissante d'avoir partagé ces moments de vie avec vous. D'avoir partagé des histoires au bord du Rhône, de nombreux fous rires, des secrets, beaucoup d'amitié, des moments de bonheur dans vos vies (évid' je pense à Célie, Eliabel, Martin, Léon et la pitchounette)... Laura merci pour ta présence précieuse au bureau et pour les gardes de Darwin. Coralie et Alice, évidemment on a le meilleur bureau, vous étiez des co-bureau parfaites. Sarah, Edouard, Vincent, Annabelle, Manon, Eva, merci pour tous les échanges qu'on a pu avoir. Coralie, c'était vraiment chouette de pouvoir former une équipe microbio avec toi. N'oublie pas de me présenter tes enfants un jour ! Adeline, tes conseils ont été réconfortant dans les moments les plus délicats, merci d'avoir partagé tout cela avec moi. Mathilde et Agathe, vous êtes tellement de jolies personnes. Mille merci d'avoir été là tout simplement. Damien, je suis fière de faire partie de notre team des anciens, contente d'avoir partagé des cafés beaucoup trop matinaux, des barbecues au château, des fous rires au-delà des fous rires. Merci pour ton amitié pendant ces trois ans. Olivier, merci d'avoir été toujours présent et pour ton soutien sans faille. Viens un jour on va se balader autre part qu'à Gerland ? Je vous souhaite à tous beaucoup de réussite dans vos projets. Donnez-moi des nouvelles et invitez-moi à vos soutenances ! Je serai trop fière de vous voir devenir Docteur. Veillez bien les uns sur les autres.

Julie et Anthony vous avez été de vrais piliers pendant ces trois ans. J'espère qu'on aura la chance de refaire des soirées Syrius, des randonnées, d'enfin prendre le temps d'aller un weekend à Montpellier. Mon binôme, je suis tellement reconnaissante de t'avoir rencontrée. Merci de ta patience, de ton honnêteté. On se donne rendez-vous dans le sud ? Tu mérites le meilleur !

Mes amis, Maryame, ton amitié est tellement importante pour moi. Tant qu'on n'aura pas fait notre Rendez-vous en Terre inconnue, je ne te lâche pas ! Cyrielle, je suis chanceuse de t'avoir et de pouvoir toujours compter sur toi. Maëlle, Amandine, merci d'être là, des moments qu'on partage au pays.

Merci à ma meute familiale de m'avoir toujours encouragée à aller le plus loin possible et de croire en moi. Papa, maman, merci d'être un socle si solide. Doud' je suis si chanceuse d'être ta sœur.

Valorisation de sous-produits végétaux par fermentation pour la production de composés à valeur ajoutée - Production d'acide L-lactique par fermentation de pulpe de carottes

Résumé

Les enjeux de développement durable et de gestion des déchets sont de plus en plus considérés dans nos sociétés. Dans ce contexte, il est nécessaire de développer des recherches dans le but d'enrichir les connaissances scientifiques, et permettre de développer des systèmes de valorisation efficaces. Parmi les voies de valorisation pour le recyclage des sous-produits végétaux, issus de l'industrie agroalimentaire, la fermentation peut être utilisée pour la production de métabolites à valeur ajoutée. Le projet dans le cadre duquel j'ai préparé ma thèse a été mené avec l'appui de cinq industriels du secteur agroalimentaire qui souhaitent travailler sur la valorisation spécifique de leurs sous-produits végétaux : Charles et Alice, Florette, Panzani, Philibert Savours et Pierre Martinet. Les sous-produits associés sont respectivement des peaux de pommes, des épluchures de salades, du son de blé, du levain de germe de blé et de la pulpe de carottes. Dans un premier temps, des caractéristiques physico-chimiques (pH, teneur en eau, a_w), biochimiques (acidité titrable, fractions azotées), et biologiques (flores microbiennes des produits bruts) de chacune de ces 5 matrices ont été déterminées. Couplés à des essais de fermentation spontanée, les résultats ont dans un premier temps permis de sélectionner une matrice de référence : la pulpe de carottes. La fermentation spontanée des sous-produits a été étudiée en faisant varier les paramètres d'incubation, selon un plan d'expérience factoriel, pour la matrice modèle. Les observations réalisées ont permis de sélectionner les conditions de fermentation des quatre autres sous-produits. Les mesures d'acidité (pH et acidité titrable) et le suivi de flores microbiennes au cours du temps ont montré la fermentescibilité des sous-produits. Pour la pulpe de carotte, les paramètres de culture choisis (broyage, température, pourcentage d'eau et rafraîchis) et les niveaux fixés, n'ont pas permis de favoriser la production de molécules d'intérêt parmi celles suivies : les composés phénoliques, les acides organiques et les composés volatils. En accord avec les partenaires du projet, la troisième partie avait pour objectif de sélectionner une souche de *Lactobacillus*, à partir de la matrice modèle, pour produire de l'acide L-lactique. La souche de *Lactobacillus paracasei* A1L sélectionnée a montré sa capacité à produire de l'acide L-lactique dans des quantités plus importantes qu'en fermentation spontanée, bien que celles-ci restent faibles pour envisager une application industrielle (quantité maximale produite = 0,974 g/L). Les essais réalisés selon un plan d'expérience D-optimal ont permis d'évaluer les effets de la température, du pH, de l'ajout d'enzymes (hémicellulase et protéase) et du taux d'ensemencement. Les résultats montrent que la production d'acide L-lactique est favorisée à une température de 25°C, un pH initial de 8 et une quantité de microorganismes ensemencée de 10^8 UFC/mL. Au terme du projet, les connaissances acquises sur les dynamiques de fermentation, spontanée ou dirigée, sont des éléments qui permettront d'adapter les conditions de fermentation.

Mots-clés : valorisation, sous-produits végétaux, fermentation, production d'acide L-lactique

Valorization of edible plant by-products by fermentation for the production of added value compounds-Production of L-lactic acid by carrot-pulp fermentation

Abstract

Sustainable development and waste management issues are increasingly being considered in our societies. In this context, it is necessary to develop research to enrich scientific knowledge and enabling the development of efficient valorisation systems. Among the valorisation ways for the recycling of plant by-products from the food industry, fermentation can be used for the production of value-added compounds. My Ph D thesis project was carried out with the support of five food companies who wish to investigate specific valorisation routes for their by-products: Charles et Alice, Florette, Panzani, Philibert Savours and Pierre Martinet. The corresponding by-products are apple skins, salad peelings, wheat bran, wheat germ sourdough, and carrot pulp, respectively. First, matrix-specific physico-chemical (pH, water content, water activity (a_w)), biochemical (nitrogen fractions, titratable acidity), and biological (microbial flora of the raw products) characteristics were determined. Coupled with spontaneous fermentation trials, the results enabled the selection of carrot pulp as a reference matrix, for further experiments. Incubation parameters of the spontaneous fermentation of carrot pulp were then varied according to a factorial experimental design. The results made it possible to select the fermentation conditions for the other four by-products. Acidity measurements (pH and titratable acidity) and monitoring of microbial flora over time showed the fermentability of by-products. For carrot pulp, the selected culture parameters (grinding of raw material, temperature, percentage of water and refreshments) and the levels set did not favour the production of molecules of interest among those monitored: phenolic compounds, organic acids, and volatile compounds. A screening allowed to isolate a L-lactic acid producing *Lactobacillus* strain from carrot pulp. The selected *Lactobacillus paracasei* A1L strain showed its ability to produce L-lactic acid in higher quantities than in spontaneous fermentation, however this concentration remains too low for an industrial application (maximum quantity produced = 0,974 g/L). Trials built according to a D-optimal experimental design tested the effect of temperature, pH, enzyme addition (hemicellulase and protease) and inoculum load. The results show that L-lactic acid production is favoured at a temperature of 25°C, an initial pH of 8, and a 10^8 CFU/mL amount of microorganisms inoculated. The knowledge acquired on the dynamics of spontaneous fermentation or fermentation after inoculation, are elements that will allow to adapt the fermentation conditions in the future.

Keywords: valorisation, plant by-products, fermentation, L-lactic acid production

Table des matières

1. Introduction	1
2. Contexte bibliographique	7
2.1. Valorisation des sous-produits végétaux	7
2.1.1. Voies de valorisation.....	7
2.1.1.1. Production de métabolites.....	7
2.1.1.2. Production énergétique	10
2.1.1.3. Traitement agronomique	11
2.1.2. Types de fermentation.....	12
2.1.2.1. La fermentation en milieu solide et la fermentation submergée	12
2.1.2.2. La fermentation liquide.....	13
2.2. Les écosystèmes végétaux	14
2.2.1. Facteurs abiotiques.....	15
2.2.1.1. Définition d'un biotope	15
2.2.1.2. Caractéristiques intrinsèques des sous-produits végétaux étudiés	15
2.2.1.3. Paramètres physico-chimiques de fermentation	16
2.2.1.3.1. La température	16
2.2.1.3.2. Le potentiel d'oxydo-réduction	17
2.2.1.3.3. Le pH	18
2.2.1.4. Variation des paramètres par des plans d'expérience	19
2.2.2. Facteurs biotiques	19
2.2.2.1. Définition biocénose	19
2.2.2.2. Les microbiotes végétaux.....	20
2.2.2.3. La compétition microbienne	22
2.2.2.4. Les biofilms des végétaux.....	23
2.2.4. Capacité fermentescible des végétaux	24
2.3. Les bactéries lactiques.....	26
2.3.1. Taxonomie et caractéristiques	26

2.3.2.	La fermentation lactique.....	28
2.3.3.	Voies métaboliques complémentaires	31
2.3.3.1.	Voie du citrate	31
2.3.3.2.	Métabolisme azoté	33
2.3.3.3.	Métabolisme des composés phénoliques.....	34
2.3.3.4.	Production d'exopolysaccharides.....	35
2.3.3.5.	Production de bactériocines.....	35
2.3.4.	Le genre <i>Lactobacillus</i>	36
2.3.4.1.	Caractéristiques.....	36
2.3.4.2.	Ubiquité du genre	37
2.3.4.3.	<i>Lactobacillus plantarum</i>	38
2.3.4.4.	Spécificités de <i>Lactobacillus paracasei</i>	39
3.	Démarche expérimentale	41
3.1.	Axe 1 : évaluation du potentiel fermentaire des sous-produits.....	41
3.2.	Axe 1 : fermentation spontanée des sous-produits	42
3.3.	Axe 2 : optimisation de la production d'acide lactique.....	43
3.4.	Analyses statistiques	45
4.	Potentiel fermentaire des sous-produits végétaux.....	46
4.1.	Matériels et méthodes analytiques	46
4.1.1.	Matières premières	46
4.1.2.	Paramètres physico-chimiques	47
4.1.2.1.	pH et acidité titrable	47
4.1.2.2.	A_w et extrait sec	47
4.1.2.3.	Analyse des fractions azotées	47
4.1.3.	Identification et dénombrement des micro-organismes.....	48
4.2.	Résultats.....	49
4.2.1.	Caractérisation des sous-produits végétaux.....	49
4.2.1.1.	Caractérisation physico-chimique des matrices végétales	49
4.2.1.2.	Microflore natives des sous-produits végétaux.....	53
4.2.2.	Evolution des sous-produits en fermentation spontanée	58

4.2.2.1.	Le son de blé.....	58
4.2.2.2.	La pulpe de carottes.....	59
4.2.2.3.	Le levain de germe de blé	60
4.2.2.4.	La peau de pommes.....	61
4.2.2.5.	Les épluchures de salades.....	62
4.3.	Discussion.....	63
5.	Fermentations spontanées des cinq sous-produits végétaux	67
5.1.	Méthodes analytiques.....	67
5.1.1.	Dosage des acides aminés.....	67
5.1.2.	Biologie moléculaire	67
5.2.	Fermentation spontanée de la matrice modèle : la pulpe de carottes	67
5.2.1.	Résumé	67
5.2.2.	Article.....	69
5.3.	Fermentations spontanées des cinq sous-produits végétaux	88
5.3.1.	Résultats.....	88
5.3.1.1.	Construction de la démarche utilisée pour la fermentation spontanée des cinq sous-produits végétaux	88
5.3.1.2.	Comparaison globale des sous-produits bruts	91
5.3.1.3.	Evolution physico-chimique de l'environnement fermentaire	93
5.3.1.4.	Dynamique microbienne des systèmes fermentaires	95
5.3.1.4.1.	Evolution des flores viables cultivables.....	95
5.3.1.4.2.	Etude de la diversité au sein des flores bactériennes viables cultivables.....	96
5.3.1.4.2.1.	Diversité des flores : Flore Lactique Mésophile, <i>Lactobacillus</i> et <i>Enterococcus</i>	97
5.3.1.4.2.2.	Diversité de la flore acétique et des bactéries à Gram négatif	100
5.3.1.5.	Interactions entre les conditions de culture et l'évolution des communautés microbiennes.....	102
5.4.	Discussion.....	103
6.	Optimisation de la production d'acide lactique à partir du sous-produit modèle : la pulpe de carottes.....	109
6.1.	Matériel et méthodes analytiques.....	109
6.2.	Sélection d'un microorganisme producteur d'acide lactique.....	109

6.2.1.	Résumé	109
6.2.2.	Article.....	110
6.3.	Production d'acide L-lactique à partir de pulpe de carottes et l'ensemencement de <i>Lactobacillus paracasei</i> A1L	130
6.3.1.	Résultats.....	130
6.3.1.1.	Variation des conditions d'incubation sur la base d'un plan d'expérience D-optimal	130
6.3.1.2.	Conditions de culture favorables à la production d'acides organiques.....	132
6.3.1.3.	Evolution de la biocénose	138
6.3.1.3.1.	Dynamique des flores microbiennes	138
6.3.1.3.2.	Evolution de la diversité des <i>Lactobacillus</i> présumés en fonction des conditions d'incubation.....	141
6.3.1.3.3.	Evolution de la diversité de la flore mésophile totale en fonction des conditions d'incubation.....	144
6.4.	Discussion.....	146
7.	Discussion générale	151
7.1.	Discussion des axes et questions de recherche.....	151
7.1.1.	Capacité fermentescible et variabilité des cinq sous-produits végétaux	152
7.1.2.	Fermentation spontanée des cinq sous-produits végétaux.....	153
7.1.3.	Production d'acide L-lactique par fermentation et ensemencement d'une souche de <i>Lactobacillus paracasei</i>	155
7.1.4.	Projets annexes développés au cours du projet ValPro.....	162
7.2.	Limites et perspectives du projet.....	166
7.2.1.	L'utilisation de substrats/sous-produits bruts	167
7.2.1.1.	Mélange de sous-produits.....	167
7.2.1.2.	Ajout de substrats de synthèse	168
7.2.2.	Capacité d'un microorganisme à produire des composés d'intérêt à partir de végétaux bruts	168
7.2.2.1.	Screening de microorganismes issus des microbiotes digestifs des animaux.....	169
7.2.2.2.	Constitution de consortia microbiens aux activités complémentaires.....	170
7.2.3.	Limites d'application à échelle industrielle	171

7.2.3.1.	Caractérisation des interactions microbiennes et métaboliques.....	171
7.2.3.2.	Changement d'échelle et spécificités des types de fermentation	173
Conclusion		175

Liste des Figures

Figure 1 : Voies de gestion des déchets (d'après Waldron, 2009)	3
Figure 2 : Démarche générale mise en place pour la valorisation de sous-produits végétaux via des processus de fermentation	5
Figure 3 : Origines des composés obtenus à partir de végétaux.....	8
Figure 4 : Différentes réactions de méthanogénèse (d'après Moletta et Guillou, 2013)	11
Figure 5 : Facteurs biotiques et abiotiques caractérisant les écosystèmes végétaux	14
Figure 6 : Composition biochimique des produits végétaux bruts à l'origine des sous-produits végétaux (Tables Ciqual, Anses, 2017).....	24
Figure 7 : Relations phylogénétiques des bactéries à Gram positif et à faible pourcentage GC (GC%), basées sur la comparaison des séquences d'ARNr 16S (Björkroth et Koort, 2016)	26
Figure 8 : Schéma de synthèse des différentes voies métaboliques présentes chez les bactéries lactiques (Makarova et al., 2006)	28
Figure 9 : Métabolisme carboné des bactéries lactiques (d'après Drider et Prévost, 2009; Gänzle, 2015a)	30
Figure 10 : Voie de dégradation de l'acide citrique chez les bactéries lactiques (d'après Drider et Prévost, 2009; Gänzle, 2015a; Gemelas et al., 2014)	31
Figure 11 : Représentation des systèmes de transport (A), des peptidases intracellulaires (B) et de la régulation (C) du système protéolytique chez les bactéries lactiques (Savijoki et al., 2006)	33
Figure 12 : Arbre phylogénétique des groupes de <i>Lactobacillus</i> et <i>Pediococcus</i> réalisé à partir des séquences d'ARNr 16S (Salveti et al., 2012).....	37
Figure 13 : Classification des espèces du groupe <i>Lactobacillus casei</i> (Huang et al., 2018).....	40
Figure 14 : Démarche expérimentale menée pour la valorisation du sous-produit de pulpe de carottes	41
Figure 15 : Communautés microbiennes dénombrées sur milieux gélosés (log (UFC/ml)), à partir des sous-produits végétaux bruts (n=1).....	54
Figure 16 : Evolution de l'acidité et des communautés microbiennes au cours de la fermentation spontanée du son de blé (n=1).....	58
Figure 17 : Evolution de l'acidité et des communautés microbiennes au cours de la fermentation spontanée de pulpe de carottes (n=1).....	59
Figure 18 : Evolution de l'acidité et des communautés microbiennes au cours de la fermentation spontanée du levain de germe de blé (n=1).....	60
Figure 19 : Evolution de l'acidité et des communautés microbiennes au cours de la fermentation spontanée de peaux de pommes (n=1)	61

Figure 20 : Evolution de l'acidité et des communautés microbiennes au cours de la fermentation spontanée d'épluchures de salades (n=1).....	62
Figure 21 : Classification Ascendante Hiérarchique des résultats de fermentation spontanée observés à partir du sous-produit de pulpe de carottes, au départ (J0) et après neuf jours (J9). Les conditions de culture appliquées aux différents échantillons sont répertoriées dans le Tableau 2.....	89
Figure 22 : Analyse de facteurs multiples des cinq sous-produits végétaux, au départ de la fermentation.	92
Figure 23 : Evolution du pH au cours du temps, pour les cinq sous-produits végétaux placés à des conditions variables d'incubation (broyage, température, pourcentage d'eau ajouté et rafraîchissement).....	93
Figure 24 : Evolution de l'acidité titrable au cours du temps, pour les cinq sous-produits végétaux placés dans des conditions variables d'incubation (broyage, température, pourcentage d'eau ajouté et rafraîchissement).....	94
Figure 25 : Evolution de l'acidité titrable au cours du temps pour les cinq sous-produits végétaux.	95
Figure 26 : Analyse en Composante Principale des différences J9-J0 des différentes flores microbiennes et projection des variables supplémentaires	95
Figure 27 : Dendrogramme des profils de REP-PCR pour les colonies présumées de la Flore Lactique Mésophile (raclées sur milieu M17), à J0 de fermentation spontanée, et construit par le calcul des coefficients de similarité de Jaccard.	97
Figure 28 : Dendrogramme des profils de REP-PCR pour les colonies de la flore des <i>Lactobacillus</i> présumés (raclées sur milieu MRS), à J0 de fermentation spontanée, et construit par le calcul des coefficients de similarité de Jaccard (A) et analyse par ACP des coordonnées des bandes du gel (B)..	98
Figure 29 : Dendrogramme des profils de REP-PCR pour les colonies de la flore des <i>Lactobacillus</i> présumés (raclées sur milieu MRS), à J9 de fermentation spontanée et construit par le calcul des coefficients de similarité de Jaccard (A) et analyse par ACP des coordonnées des bandes du gel (B)..	99
Figure 30 : Dendrogramme des profils de REP-PCR pour les colonies de la flore acétique présumée (raclées sur milieu AAB), à J0 et J9 de fermentation spontanée, et construit par le calcul des coefficients de similarité de Jaccard.....	100
Figure 31 : ACP des coordonnées des bandes des gels de REP-PCR pour les colonies de la flore des Enterobacteriaceae présumées (raclées sur milieu VRBG), à J0 et J9 de fermentation spontanée....	101
Figure 32 : Analyse Factorielle Multiple des réponses mesurées après neuf jours d'incubation, pour les 20 essais de fermentation.	102
Figure 33 : Evolution du pH, de l'acidité titrable, de la quantité d'acide L-lactique et de l'acide acétique au cours de la fermentation de pulpe de carottes, selon un plan d'expérience D-optimal.	132

Figure 34 : Quantité d'acide L-lactique après deux jours de fermentation de pulpe de carottes, selon un plan d'expérience D-optimal, en fonction de la température d'incubation, du pH initial, du volume de solution enzymatique ajouté ((protéase (0,5 U/mL de solution) et une hémicellulose (1,5 U/mL de solution)) et de la quantité de <i>Lb. paracasei</i> A1Lensemencée.....	134
Figure 35 : Diagnostic graphique de la régression linéaire pour la production d'acide L-lactique.	135
Figure 36 : Quantité d'acide D-lactique après deux jours de fermentation de pulpe de carottes, selon un plan d'expérience D-optimal, en fonction de la température d'incubation, du pH initial, du volume de solution enzymatique ajouté ((protéase (0,5 U/mL de solution) et une hémicellulose (1,5 U/mL de solution)) et de la quantité de <i>Lb. paracasei</i> A1Lensemencée.....	136
Figure 37 : Quantité d'acide acétique après deux jours de fermentation de pulpe de carottes, selon un plan d'expérience D-optimal, en fonction de la température d'incubation, du pH initial, du volume de solution enzymatique ajouté ((protéase (0,5 U/mL de solution) et une hémicellulose (1,5 U/mL de solution)) et de la quantité de <i>Lb. paracasei</i> A1Lensemencée.....	137
Figure 38 : Evolution de la différence (J4-J0) de <i>Lactobacillus</i> présumés, au cours de la fermentation de pulpe de carottes, selon un plan d'expérience D-optimal, en fonction de la température d'incubation, du pH initial, du volume de solution enzymatique ajouté ((protéase (0,5 U/mL de solution) et une hémicellulose (1,5 U/mL de solution)) et de la quantité de <i>Lb. paracasei</i> A1Lensemencée.	139
Figure 39 : Evolution de la différence (J4-J0) de la flore mésophile totale, au cours de la fermentation de pulpe de carottes, selon un plan d'expérience D-optimal, en fonction de la température d'incubation, du pH initial, du volume de solution enzymatique ajouté ((protéase (0,5 U/mL de solution) et une hémicellulose (1,5 U/mL de solution)) et de la quantité de <i>Lb. paracasei</i> A1Lensemencée.	140
Figure 40 : Dendrogramme des profils de REP-PCR pour les colonies de la flore des <i>Lactobacillus</i> présumés (raclées sur milieu MRS), au départ de la fermentation de pulpe de carottes, selon le plan d'expérience D-optimal.....	141
Figure 41 : Dendrogramme des profils de REP-PCR pour les colonies de la flore des <i>Lactobacillus</i> présumés (raclées sur milieu MRS), après quatre jours de fermentation de pulpe de carottes, selon le plan d'expérience D-optimal.	142
Figure 42 : Analyse par ACP des coordonnées des bandes du gel REP-PCR, des profils de <i>Lactobacillus</i> présumés, au départ de la fermentation..	143
Figure 43 : Dendrogramme des profils de REP-PCR pour les colonies de la flore mésophile totale (raclées sur milieu PCA), au départ de la fermentation de pulpe de carottes, selon le plan d'expérience D-optimal.....	144

Figure 44 : Dendrogramme des profils de REP-PCR pour les colonies de la flore mésophile totale (raclées sur milieu PCA), après quatre jours de fermentation de pulpe de carottes, selon le plan d'expérience D-optimal.....	145
Figure 45 : Boxplots des concentrations de l'acide D-lactique J2-J0 (mg/L de surnageant) en fonction du taux de <i>Lactobacillus paracasei</i> A1Lensemencé.....	156
Figure 46 : Schéma général des axes développés au cours du projet ValRpo et perspectives d'optimisation.....	161

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques des végétaux selon leur nature	25
Tableau 2 : Plan d'expérience développé pour l'étude de la fermentation spontanée de cinq sous-produits végétaux (n=1).	43
Tableau 3 : Plan d'expérience D-optimal pour la production d'acide lactique, à partir de pulpe de carottes fermentée, par une souche de <i>Lactobacillus paracasei</i> (n=1).	44
Tableau 4 : Caractéristiques physicochimiques et biochimiques des sous-produits végétaux bruts.	49
Tableau 5 : Dosage des fractions azotées solubles dans l'eau (NS) et dans l'acide phosphotungstique (NPT) des sous-produits végétaux bruts.	50
Tableau 6 : Plan d'expérience appliqué lors de la fermentation spontanée des cinq sous-produits végétaux (n=1).	91
Tableau 7 : Valeurs attendues et réelles des modalités des facteurs pour le plan d'expérience D-optimal de la fermentation du sous-produit de pulpe de carottes, et la production d'acide L-lactique (n=1).	131
Tableau 8 : Conditions de fermentation les plus favorables à la production d'acide L-lactique.	150
Tableau 9 : Tableau récapitulatif des variations des réponses biochimiques observées pour l'ensemble des essais.	151
Tableau 10 : Tableau récapitulatif des variations des réponses microbiologiques observées au cours de l'ensemble du projet. Légende : LAB = bactéries lactiques, FA = flore acétique et FLM = Flore lactique mésophile.	152
Tableau 11 : Estimation des bénéfices de vente d'acide lactique et de phényl-éthyl alcool à partir de substrats végétaux et de MRS	164

Liste des abréviations

AAB : « Acetic Acid Bacteria »
ADEME : Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie
ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'Environnement et du travail
ATT/TTA : Acidité Titrable
 A_w : activité en eau
BEA : Bile-Esculine-Azide
CFC : « Cephalosporin-Fucidin-Cetrimide »
CGA : Chloramphenicol-Glucose-Agar
CitP : citrate perméase
CSPs : « Cold-Shock Proteins »
EPS : ExoPolySaccharides
FLM : Flore Lactique Mésophile
FMAR : Flore Mésophile Aérobie Revivable
FAO : "Food and Agriculture Organization"
FDA : "Food and Drug Administration"
GC : "Gas Chromatography"
HSPs : "Heat-Shock Proteins"
IAA : Industries AgroAlimentaires
LAB : « Lactic Acid Bacteria », Bactéries lactiques
MRS : de Man-Rogosa-Sharpe
MS : "Mass Spectrometry"
NPT : azote soluble dans l'acide phosphotungstique
NS : azote soluble dans l'eau
NT : azote total
PLA : "Poly Lactic Acid"
Prt : protéase de paroi
PTS : système phosphotransférase phosphoénolpyruvate dépendant
SPME : « Solid Phase MicroExtraction »
SSF : « Solid State Fermentation »
ValPro : Projet de recherche : Les fermentations au service de la valorisation des sous-produits de l'industrie agro-alimentaire

Publications

- Godard, J., Hennequin, D., Hallier, A., and Demarigny, Y. (2018). Evolution of carrot pulps during spontaneous fermentation. *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research*, 6, 95-106.
- Godard, J., and Demarigny, Y. (2019). Selection of *Lactobacillus paracasei* strains from grated carrots by-products for L-lactic acid production. *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research*, 7, 106-116.

Communications orales

- Godard, J., Hallier, A., Hennequin, D., Payet, V., Sarneo, D., Degraeve, P. et Demarigny, Y. (2017). Les fermentations au service de la valorisation des sous-produits végétaux. *Congrès national de la Société Française de Microbiologie*, 11 octobre, Paris, France
- Godard, J. et Demarigny, Y. (2018). Capacité de fermentation d'une pulpe de carottes. *Congrès national de la Société Française de Microbiologie*, 8 octobre, Paris, France

Chapitre 1

Introduction

L'introduction permet de présenter le contexte global des enjeux liés à la valorisation des sous-produits végétaux et de rappeler la volonté des industriels du secteur agroalimentaire, et plus largement des sociétés à augmenter leur efficacité dans le traitement de leurs déchets. Cette partie présente également les avantages d'utiliser les fermentations dans le but de produire des métabolites d'intérêt. Enfin, les questions scientifiques approfondies au cours de ce projet sont présentées.

1. Introduction

A l'heure actuelle, les ressources pour la production d'énergie, de nouveaux matériaux ou la production de composés d'intérêt industriel sont de plus en plus limitées. En parallèle, les modes de consommation, notamment dans le secteur agroalimentaire, tendent à augmenter les déchets générés lors de la transformation de produits ou liés au gaspillage. Face à cet enjeu, les industries du secteur et les collectivités doivent être plus efficaces en terme de gestion et de valorisation des déchets (Balet, 2016). Cette étude s'inscrit dans cette dynamique en cherchant à valoriser des déchets de produits agricoles d'origine végétale en tant que substrat pour la production de composés utilisables dans d'autres secteurs industriels et ayant une valeur ajoutée. Un avantage de ces ressources réside dans le fait qu'elles n'entrent pas en concurrence avec les produits destinés à l'alimentation humaine.

En 2013, l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) estimait à 1,6 billion le nombre de tonnes de déchets générées chaque année, au niveau mondial (FAO, 2013). D'un point de vue économique, ces pertes représenteraient 936 billions de dollars. Pour les entreprises de l'industrie agroalimentaire (IAA), ceci s'explique notamment par les coûts engagés pour la gestion des déchets. La part des fruits et légumes représente environ 43% du total des déchets, alors qu'ils ne représentent que 2% chacun des terres cultivées. En France, en 2016, la quantité de déchets organiques était de 8,6 millions de tonnes (Ademe, 2019). En 1999, la part représentée par la filière fruits et légumes était de 2,5 millions de tonnes (Moletta et Guillou, 2013). Dans le contexte sociétal actuel, les questions environnementales et de développement durables sont largement présentes. Des campagnes de sensibilisation menées notamment par l'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME) tendent à sensibiliser les consommateurs sur la nécessité de réduire la production de déchets. Les enjeux liés à la prise en charge et au traitement des déchets de l'industrie agroalimentaire se situent à cinq niveaux : environnemental, économique, réglementaire, technologique et sociétal.

Pour les IAA, la gestion des déchets est régie par une réglementation favorisant la protection de l'environnement. De plus, elle permet de borner la définition et l'utilisation des déchets. Ainsi, un déchet se définit comme : « Tout résidu d'un processus de production, de transformation ou d'utilisation, toute substance, matériau, produit ou plus généralement tout bien abandonné ou que son détenteur destine à l'abandon. » ("Code de l'environnement - Légifrance") (Moletta et Guillou, 2013). En 2020, cet article du code de l'environnement a été complété par des textes de loi qui prévoient de prévenir et réduire la production de déchets ("LOI n° 2020-105 du 10 février 2020 relative à la lutte contre le gaspillage et à l'économie circulaire (1) - Légifrance"). Elle tend à encadrer le transport des produits en termes de distance parcourue et de quantité prise en charge. Cette loi

favorise la valorisation des déchets par leur réutilisation, leur recyclage, ou la production d'énergie. Enfin, elle diffuse les bilans des actions menées, et leurs effets sur l'environnement et la santé publique auprès des consommateurs. Les biodéchets sont par définition : « tout déchet non dangereux biodégradable de jardin ou de parc, tout déchet non dangereux alimentaire ou de cuisine, issu notamment des ménages, des restaurants, des traiteurs ou des magasins de vente au détail, ainsi que tout déchet comparable provenant des établissements de production ou de transformation de denrées alimentaires. » (Balet, 2016).

Les déchets végétaux de l'IAA sont principalement issus des premières étapes de transformation lors du triage des matières premières et du parage des légumes abimés, ou ne correspondant pas aux critères de qualité (Moletta et Guillou, 2013; Panda *et al.*, 2016).

Les déchets peuvent être classés selon :

- Leur origine : collectivités publiques, domestique ou industrielle (Abu Yazid *et al.*, 2017)
- Leur nature physico-chimique : inerte, organique, banale, toxique, ultime
- Leur dangerosité : non dangereux, dangereux, inertes (selon la classification européenne du 18 décembre 2014, applicable au 1^{er} juin 2015)

Les déchets des IAA ont une origine industrielle et sont essentiellement de nature organique. Les trois principales voies de valorisation sont le compostage, l'alimentation animale et la méthanisation (Ademe, 2019). Un procédé de valorisation est défini comme : « Toute opération dont le résultat principal est que des déchets servent à des fins utiles en substitution à d'autres substances, matières ou produits qui auraient été utilisés à une fin particulière, ou que des déchets soient préparés pour être utilisés à cette fin, y compris par le producteur de déchets » (Ordonnance n° 2010-1579 du 17 décembre 2010 portant diverses dispositions d'adaptation au droit de l'Union européenne dans le domaine des déchets). D'après le Comité national des co-produits, rattaché à l'Institut de l'Élevage, un co-produit désigne un produit valorisé d'un point de vue technologique, en tant que nouveau produit par exemple, et/ou économique, en ayant une valeur ajoutée. Les co-produits sont obtenus à partir des sous-produits générés au cours des processus de transformation. Leur état physique et biologique étant variable, des traitements préalables à la valorisation peuvent être nécessaires. Dans un rapport publié en 2000 par l'ADEME, les termes de « coproduit » et de « sous-produit » renvoient à une valorisation respectivement totale ou partielle des matières végétales issues de la transformation des matières premières (Besancenot *et al.*, 2000). La valorisation fait référence ici à la valeur économique du produit. Dans le cadre de la thèse, les produits à disposition sont valorisés en alimentation animale, sous forme de dons, ou revendus en tant que matière première à des sociétés externes. En participant à ce projet, les industriels partenaires souhaitent augmenter la valeur de leurs sous-produits par la

synthèse de composés à plus haute valeur ajoutée. Les matrices végétales seront donc désignées par le terme de « sous-produit » dans la suite du manuscrit.

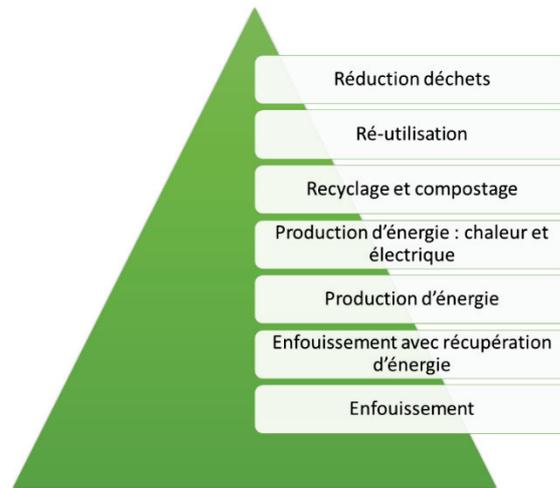


Figure 1 : Voies de gestion des déchets (d'après Waldron, 2009)

Le compostage, la revente comme nourriture animale et la méthanisation sont les procédés de valorisation les plus étudiés et mis en place à ce jour (Figure 1). Le compostage permet de traiter la matière organique via la dégradation aérobie de la matière (Moletta et Guillou, 2013). Le compost obtenu peut être réutilisé pour enrichir les sols agricoles (Balet, 2016). Ce processus se déroule en deux étapes : la fermentation et la maturation. La fermentation permet la dégradation de la matière organique. Les microorganismes présents vont consommer l'oxygène du milieu, se développer et produire de la chaleur, du CO₂ et de l'eau. Des acides organiques vont également être libérés, engendrant une acidification du milieu. La métabolisation des molécules azotées, telles que les protéines ou l'urée, conduit à une production d'ammoniaque. La maturation conduit à la production de molécules humiques (acides fulviques et humiques).

La méthanisation est un processus anaérobie qui convertit la matière organique ou minérale, en méthane et en gaz carbonique (Moletta et Guillou, 2013). Les gaz obtenus permettent la production d'énergie sous forme de chaleur ou d'électricité. Elle est réalisée par les microorganismes méthanogènes. La méthanisation se déroule en trois étapes : l'hydrolyse et l'acidogénèse, l'acétogénèse et la méthanogénèse. En France, cette méthode est de plus en plus employée dans le secteur agricole : l'installation d'unités de méthanisation dans des fermes a ainsi été multipliée par six entre 2010 et 2016 (Balet, 2016).

Actuellement, les fermentations sont principalement utilisées et développées pour la production de produits alimentaires fermentés (Gänzle, 2015a). Dans ce cadre, elles améliorent les qualités organoleptiques et nutritionnelles des produits, ainsi que leur conservation. La fermentation

en milieu solide semble la plus adaptée à la production de molécules d'intérêt, telles que les biocarburants, les acides organiques, les biosurfactants, les composés aromatiques ou les enzymes (Abu Yazid *et al.*, 2017; Diaz *et al.*, 2018; John *et al.*, 2007a). Parmi les acides organiques produits, l'acide lactique est une molécule intéressante, utilisée dans l'industrie cosmétique, pharmaceutique, alimentaire et pour la fabrication de bioplastique (Panda *et al.*, 2016). En effet, l'acide polylactique (PLA) est un bioplastique constitué de sous-unités d'acide lactique. Le recours à ce type de matériau permettrait de réduire les plastiques produits à partir de ressources pétrochimiques. Actuellement, 90% de l'acide lactique produit est issu de la fermentation et 10% de la synthèse chimique. Une des stratégies envisagées pour produire de l'acide lactique est d'utiliser des substrats organiques renouvelables et peu onéreux (John *et al.*, 2007a). Les déchets végétaux répondent à ces critères. Bien que leur composition soit variable, des études ont montré la possibilité de produire cette molécule à partir de matrices végétales. Elles peuvent être de trois natures (Alves de Oliveira *et al.*, 2018; John *et al.*, 2007a) :

- Des fruits : pomme, banane, orange
- Des légumes : pomme de terre, chou, carotte
- Des céréales : blé, orge

Les principaux microorganismes producteurs identifiés dans la littérature sont : *Rhizopus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Mucor* et *Monilia* (Abu Yazid *et al.*, 2017; John *et al.*, 2007a). L'acide lactique est une molécule qui peut être utilisée comme additif alimentaire et est reconnue comme sûre par la FDA (Food and Drug Administration). La variation des conditions physico-chimiques est également un paramètre à prendre en compte pour optimiser la production d'acide lactique (Tang *et al.*, 2016) .

Les processus de fermentation pour la transformation de végétaux en produits alimentaires comestibles sont largement décrits dans la littérature, comme par exemple la production du kimchi, de la choucroute ou la fermentation d'olives. Dans le cas des déchets végétaux, les connaissances sur les fermentations spontanées et dirigées, restent à approfondir afin d'adapter les processus à la nature du sous-produit, sa composition ou encore son état physique, ces critères étant dépendants des processus de transformation à l'origine des sous-produits. La valorisation de ces bio-ressources est également motivée par les IAA qui souhaitent maximiser la réutilisation de leurs déchets via la production de composés d'intérêt tels que des enzymes, des acides organiques ou des biosurfactants. La chimie verte permet d'utiliser les déchets comme substrat pour les métabolismes microbiens. Ainsi, elle permet l'emploi de matières premières renouvelables, de réduire les coûts de production et de réduire au maximum les volumes de déchets générés. En postulat de cette étude, l'objectif est de

considérer les sous-produits végétaux à leur état brut et de produire des métabolites d'intérêt par pilotage des conditions de fermentation, le but étant de simplifier les procédés technologiques et de limiter l'utilisation de pré-traitements (Diaz *et al.*, 2018; Waldron, 2009). Le projet ValPro dans le cadre duquel se sont inscrits mes travaux de thèse a été construit avec cinq partenaires industriels travaillant activement sur ces problématiques : un producteur de desserts aux fruits : Charles et Alice, un traiteur : Pierre Martinet, un producteur de levains de panification : Philibert Savours, un acteur des produits de 4^{ème} gamme¹ : Florette et un fabricant de pâtes et de sauces : Panzani. Les sous-produits étudiés (de la peau de pommes, de la pulpe de carottes, du levain de germe de blé, des épluchures de salades et du son de blé) ont été fournis par ces 5 industriels.

Dans ce contexte, ce travail pose les questions de recherche suivantes :

- Quel est le potentiel fermentaire des sous-produits végétaux de l'étude ?
- Comment évoluent les différents sous-produits en fermentation spontanée ? Est-il possible d'orienter les voies métaboliques dans le but de produire des métabolites d'intérêt ?
- Les écosystèmes évoluant de façon spontanée permettent-ils l'installation et le développement de microorganismes exogènes ajoutés ? A partir de pulpe de carottes, quels sont les paramètres d'incubation les plus favorables à la production d'acide lactique par une souche de *Lactobacillus paracasei* ?

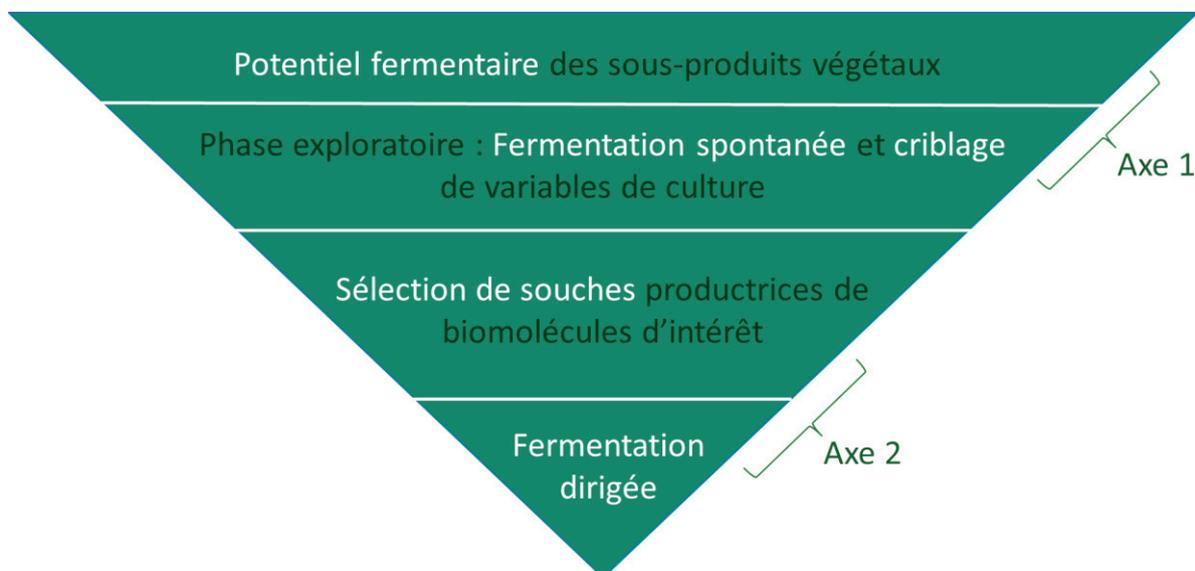


Figure 2 : Démarche générale mise en place pour la valorisation de sous-produits végétaux via des processus de fermentation

¹ Les produits de quatrième gamme désignent les fruits et légumes frais, conditionnés sous atmosphère modifiée.

Chapitre 1 : Introduction

Pour répondre à ces questions, la démarche générale de ce travail a été abordée selon deux axes. Le premier a consisté à faire varier les conditions physico-chimiques de culture en fermentation spontanée dans le but d'évaluer le potentiel fermentaire des cinq sous-produits végétaux et de produire des molécules d'intérêt (Figure 2). Le second utilise l'ajout volontaire d'un microorganisme sélectionné dans le but de produire de l'acide lactique par fermentation dirigée (Figure 2). Le plan de ce manuscrit reprend la démarche générale de ce projet. Dans un premier temps, le contexte bibliographique présentera les voies de valorisation des produits végétaux, les contextes biotiques et abiotiques de telles matrices, et enfin les communautés microbiennes majoritaires lors de la fermentation : les bactéries lactiques (LAB). Ensuite, les matériels et méthodes seront détaillés. Les résultats seront discutés au fur et à mesure du manuscrit afin d'expliquer les choix qui ont abouti à la démarche expérimentale utilisée. Ainsi, le potentiel fermentescible des cinq matrices végétales (la peau de pommes, la pulpe de carottes, le levain de germe de blé, les épiluchures de salades et le son de blé) du projet sera évalué. Les essais de fermentation spontanée, menés sur l'ensemble des matrices seront présentés. Enfin, les expérimentations réalisées dans le but d'optimiser la production d'acide lactique seront discutées. Une discussion et une conclusion générale termineront ce manuscrit.

Chapitre 2

Contexte bibliographique

Le contexte bibliographique présente les connaissances sur lesquelles repose la construction de la démarche expérimentale du projet ValPro. Ainsi, les moyens de bio valorisation des végétaux sont développés, et notamment via l'exemple des sous-produits. Les caractéristiques des écosystèmes végétaux sont présentées en définissant les composantes de biotope et de biocénose. Enfin, les bactéries lactiques fréquemment associées à la fermentation spontanée des végétaux font l'objet de la dernière partie de ce chapitre.

2. Contexte bibliographique

Cette partie a pour but de contextualiser le projet en évoquant dans un premier temps la filière de valorisation des sous-produits végétaux. Les connaissances acquises sur les matrices elles-mêmes seront ensuite présentées, sur la base de critères biotiques et abiotiques. Enfin, les bactéries lactiques, identifiées dans de nombreuses fermentations végétales spontanées seront présentées.

2.1. Valorisation des sous-produits végétaux

2.1.1. Voies de valorisation

D'après l'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Énergie (ADEME), « tous les producteurs ou détenteurs d'une grande quantité de déchets composés majoritairement de biodéchets, définis par l'article R. 541-8, autres que les déchets d'huiles alimentaires, doivent assurer le tri à la source en vue de leur valorisation organique (article R. 543-226) » ("Code de l'environnement - Légifrance").

La qualification d'un biodéchet peut toutefois être précisée. Il est alors possible de retenir les définitions suivantes :

- Sous-produit : « produit secondaire issu de la fabrication ou de la préparation d'un produit principal. »
- Co-produit : « produit annexe d'un processus industriel, dont la fabrication n'est pas directement recherchée, mais qui est valorisé économiquement. »

Dans le secteur agroalimentaire, ces déchets sont principalement valorisés par épandage, compostage, incinération ou en tant qu'alimentation animale. Cependant, les voies de valorisation, dont certaines restent à développer, reposent sur trois approches :

- Production de métabolites : source de molécules à haute valeur ajoutée
- Énergétique : incinération, production de biogaz
- Agronomique : épandage, compostage

2.1.1.1. Production de métabolites

Les végétaux sont une source potentielle de composés d'intérêt variés pouvant être directement extraits. Mais, ils peuvent aussi être utilisés comme substrats pour la production de biocomposés, via les processus de fermentation (Figure 3).

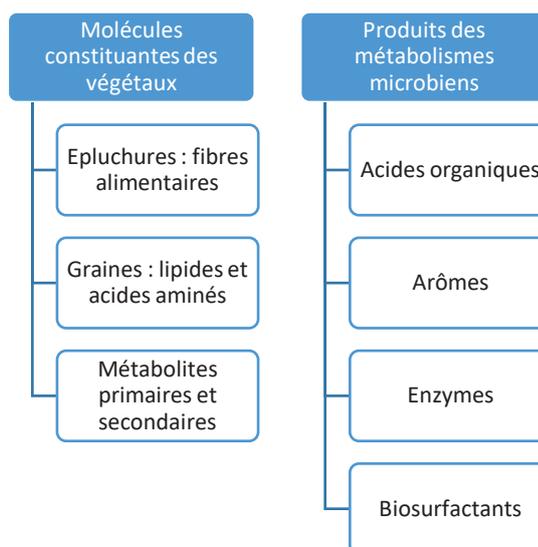


Figure 3 : Origines des composés obtenus à partir de végétaux

Selon Louis Pasteur, la fermentation désigne « la vie microbienne sans air » et définit des voies métaboliques produisant de l'énergie à partir de substrats organiques, et où le NADH est oxydé par réduction d'un accepteur final d'électron (Bourdichon *et al.*, 2012). Le pyruvate est l'accepteur d'électrons au cœur des voies fermentaires mobilisées par les microorganismes, telles que la fermentation lactique ou la fermentation alcoolique. D'un point de vue industriel, la fermentation désigne les procédés technologiques permettant le développement microbien et la production de métabolites, en condition aérobie ou anaérobie (Couto et Sanromán, 2006; Guiraud, 2012). La conception des fermenteurs utilisés dépend du type de fermentation réalisée : en milieu liquide, submergée ou en milieu solide. Les fermentations sont utilisées depuis le néolithique par l'homme dans le but de conserver les produits alimentaires, et d'en améliorer les qualités organoleptiques et nutritionnelles (Bourdichon *et al.*, 2012). La conservation est le résultat de la production de molécules antimicrobiennes par les flores du milieu, telles que les acides organiques, les bactériocines, l'éthanol et les formes réactives de l'oxygène (ex : peroxyde d'hydrogène) (Zagorec et Christieans, 2013).

Le premier groupe de composés d'intérêt inclut toutes les molécules directement extraites à partir des végétaux. Les épluchures de fruits ou de légumes sont notamment composées de fibres alimentaires dont la lignine, la cellulose ou l'hémicellulose. L'hémicellulose est une structure polysaccharidique fermentescible par l'intestin qui participe par exemple à l'équilibre du microbiote (Banerjee *et al.*, 2017). Chantaro *et al.* (2008) ont identifié les fibres de peau de carotte comme une source potentielle de composés antioxydants. Enfin, à partir d'épluchures de pomme, la pectine peut également être extraite (Banerjee *et al.*, 2017; Kowalska *et al.*, 2017).

Les pépins et les noyaux sont des sous-produits riches en lipides (ex : raisin ou tomate) (Banerjee *et al.*, 2017; Kowalska *et al.*, 2017). Ces derniers incluent les acides gras, les cires, les caroténoïdes, les

stéroïdes ou encore certaines vitamines. L'industrie cosmétique peut utiliser ce type de composés pour la formulation de crèmes aux propriétés émoullissantes et anti-âge. Les huiles, présentes à hauteur de 10 à 50% dans les pépins de fruits, peuvent être source d'antioxydants. Par exemple, l'huile extraite à partir de pépins de pommes, contient des acides oléique et linoléique, des minéraux et de l'iode (oligo-élément). Les pépins et noyaux résiduels lors de la transformation des fruits et légumes (ex : épluchage) peuvent également être riches en acides aminés essentiels (ex : histidine) et en acides aminés aromatiques (ex : phénylalanine) (Banerjee *et al.*, 2017).

Les métabolites primaires et secondaires sont constitués de biomolécules telles que les composés phénoliques, les alcaloïdes, les huiles volatiles ou les gommes (Banerjee *et al.*, 2017; Kowalska *et al.*, 2017). Les polyphénols sont des composés bioactifs utilisés comme antioxydants. Ils ont la capacité de capturer les radicaux libres et d'éviter ainsi les réactions d'oxydation à l'origine de la dégradation organoleptique et nutritionnelle des aliments. Le marc de pomme contient de l'acide chlorogénique. Des phénols extraits d'olives et de moûts de raisins sont actuellement commercialisés.

Le second groupe de molécules d'intérêt obtenues à partir des sous-produits résulte des métabolismes fermentaires. Des études s'intéressent notamment à la production d'acides organiques (citrique, acétique et lactique) à partir de déchets végétaux. L'acide citrique est le conservateur le plus utilisé en industrie alimentaire ; il peut être produit par des moisissures (*Saccharomyces* et *Aspergillus*). L'acide acétique retrouvé dans le vinaigre résulte de la fermentation aérobie et anaérobie par *Acetobacter* et *Gluconobacter* (Hutkins, 2006). Autre exemple, la fermentation de sous-produits de fruits, tels que l'ananas, permet de produire du vinaigre par l'intermédiaire des microorganismes *Acetobacter* et *Saccharomyces* (Singh et Singh, 2007). L'acide lactique est utilisé dans les secteurs pharmaceutique, cosmétologique, alimentaire ou plasturgique. Ses dérivés, par exemple les esters de lactate, ont notamment un pouvoir émulsifiant. De plus, les polymères d'acide polylactique (PLA, Poly Lactic Acid) sont des molécules intéressantes pour la production d'emballages écologiques et biodégradables. La production industrielle de l'acide lactique est réalisée à 90% par fermentation (Diaz *et al.*, 2018). L'utilisation de substrats renouvelables (comme les déchets végétaux) diminue la consommation énergétique globale (Eş *et al.*, 2018). Par exemple, des essais ont montré que la production d'acide lactique était possible à partir de déchets de mangue, de pomme de terre, de maïs, d'orange et de pois verts par *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus delbrueckii* (Kowalska *et al.*, 2017; Panda *et al.*, 2016). A partir de mangue, les rendements maximums étaient obtenus à pH 10 après six jours d'incubation à une température de 35°C (Jawad *et al.*, 2013).

Les arômes sont également des molécules au potentiel industriel intéressant. Ils peuvent être produits par les microorganismes ou par synthèse chimique. L'avantage d'une production par

fermentation est que les arômes produits peuvent être considérés comme naturels. La fermentation à l'état solide de marc de pomme par *Saccharomyces* et *Hanseniaspora* a permis d'identifier 132 composés volatils (Kowalska *et al.*, 2017). La nature des composés produits était dépendante des souches de levures utilisées.

Des études envisagent également la production de biosurfactants à partir de sous-produits. Les caractéristiques hydrophiles et hydrophobes de ces composés chimiques leur confèrent des propriétés tensioactives intéressantes. Leur capacité à réduire les tensions de surface permet d'envisager leur utilisation comme molécules émulsifiantes, détergentes, solubilisantes ou lubrifiantes (Abbasi *et al.*, 2012; Campos *et al.*, 2013). Les biosurfactants peuvent être de nature lipopeptidique, glycolipidique, polysaccharidique, sous forme de complexes protéiques, lipopolysaccharidiques, phospholipidiques ou d'acides gras (Geys *et al.*, 2014). L'usage de ces molécules, biodégradables et peu toxiques, est envisagé par exemple pour la décontamination des environnements pollués. Nalini et Parthasarathi (2018), ont ainsi optimisé la production de rhamnolipides via la fermentation en milieu solide de sous-produits d'huiles (de coco, d'arachide, de tournesol, de palme...). Les rhamnolipides produits ont montré un intérêt pour lutter contre les fusarioses des aubergines. L'effet antimicrobien est en partie lié aux propriétés tensioactives des biosurfactants et à leur capacité à diminuer l'adhésion des microorganismes aux surfaces (Campos *et al.*, 2013). De plus, ils impactent directement les structures cellulaires par augmentation de la perméabilité membranaire. Cela aboutit *in fine* à la lyse des microorganismes.

Enfin, les sous-produits peuvent être utilisés comme substrat pour la production d'enzymes (Panda *et al.*, 2016). Celles-ci sont majoritairement produites par des moisissures (*Penicillium*, *Aspergillus* et *Rhizopus*), mais également des bactéries (*Pseudomonas* ou *Bacillus*). Des enzymes de nature différente peuvent être obtenues : les amylases, les enzymes lignocellulolytiques et pectinolytiques, les tannases, les protéases, les lipases et les invertases.

2.1.1.2. Production énergétique

L'utilisation de sous-produits pour la production de biogaz est une alternative intéressante à l'utilisation d'énergie fossile. La cellulose des végétaux est un substrat particulièrement intéressant, car riche en sucres.

La production de méthane via la digestion anaérobie est largement décrite dans la littérature (Moletta et Guillou, 2013; Singh *et al.*, 2012). Trois étapes sont nécessaires : l'hydrolyse, l'acidogénèse et la méthanogénèse. L'hydrolyse des macromolécules va générer des monomères de polyholosides, des fragments de protéines et des lipides, à une vitesse lente. Les monomères obtenus sont ensuite

rapidement transformés en acides gras volatils, entraînant une diminution du pH. Lors de l'acétogénèse, les microorganismes acétogènes peuvent produire de l'acétate par transformation directe du substrat, ou la réduction du dihydrogène et du dioxyde de carbone. Ces produits métaboliques vont ensuite être assimilés par les microorganismes méthanogènes et réduits en méthane et en eau. La méthanogénèse a lieu selon différentes réactions illustrées en Figure 4.

	Réaction	
$4 \text{ H}_2 + \text{CO}_2$	\rightarrow	$\text{CH}_4 + 2 \text{ H}_2\text{O}$
$4 \text{ HCOO}^- + 2 \text{ H}^+$	\rightarrow	$\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{ HCO}_3^-$
$\text{HCOO}^- + 3 \text{ H}_2 + \text{ H}^+$	\rightarrow	$\text{CH}_4 + 2 \text{ H}_2\text{O}$
$4 \text{ CO} + 2 \text{ H}_2\text{O}$	\rightarrow	$\text{CH}_4 + 3 \text{ CO}_2$
$4 \text{ CH}_3\text{OH}$	\rightarrow	$3 \text{ CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{ H}_2\text{O}$
$\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2$	\rightarrow	$\text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$
$4 \text{ CH}_3\text{NH}_2 + 2 \text{ H}_2\text{O} + 4 \text{ H}^+$	\rightarrow	$3 \text{ CH}_4 + \text{CO}_2 + 4 \text{ NH}_4^+$
$2 (\text{CH}_3)_2\text{NH} + 2 \text{ H}_2\text{O} + 2 \text{ H}^+$	\rightarrow	$3 \text{ CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{ NH}_4^+$
$4 (\text{CH}_3)_3\text{N} + 6 \text{ H}_2\text{O} + 4 \text{ H}^+$	\rightarrow	$9 \text{ CH}_4 + 3 \text{ CO}_2 + 4 \text{ NH}_4^+$
$2 \text{ CH}_3\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2 + 2 \text{ H}_2\text{O}$	\rightarrow	$3 \text{ CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{ CH}_3\text{CH}_2\text{NH}_2$
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O}$	\rightarrow	$\text{CH}_4 + \text{HCO}_3^-$

Figure 4 : Différentes réactions de méthanogénèse (d'après Moletta et Guillou, 2013)

La production de bioéthanol est également étudiée (Singh *et al.*, 2012). Ce biocarburant est produit par fermentation en milieu solide à partir des polysaccharides retrouvés dans la cellulose, l'hémicellulose et la lignine des végétaux. Les étapes pour la production de bioéthanol comprennent un prétraitement, une saccharification et une fermentation. De nombreux microorganismes sont employés, par exemple *Saccharomyces*, *Zymomonas* ou *Escherichia coli*. Les principaux axes de développement des processus de production se concentrent sur la réduction de lignine via des prétraitements performants, l'utilisation de souches microbiennes capables d'assimiler des pentoses et des hexoses, et tolérantes à des grandes quantités d'éthanol.

2.1.1.3. Traitement agronomique

Le compostage est la voie privilégiée pour la valorisation des déchets de fruits. En revanche, le taux d'humidité élevé de ceux-ci les rend peu adaptés à l'incinération (Banerjee *et al.*, 2017). Les déchets de fruits principalement, peuvent être utilisés pour la production de bio charbon. Additionnés aux sols

agricoles, ils favorisent la séquestration du carbone et augmentent le pH. De plus, ils constituent des habitats privilégiés pour les microorganismes et des sites d'échanges nutritifs pour les plantes.

Actuellement, les déchets sont valorisés en produisant des bioénergies, en tant qu'auxiliaires agricoles ou pour obtenir des molécules d'intérêt. Les deux premières voies de valorisation sont largement décrites dans la littérature via les techniques de compostage, d'épandage ou de méthanisation. Le développement de la valorisation via les fermentations implique l'optimisation des conditions d'incubation en fonction du sous-produit et du type de molécule dont on souhaite améliorer la production.

2.1.2. Types de fermentation

D'un point de vue technologique, les fermentations peuvent être qualifiées de fermentation solide, submergée ou liquide. Elles sont caractérisées par des rapports de phase solide, liquide et gazeuse différents. La conformation des fermenteurs est dépendante de ce critère. Enfin, les microorganismes ajoutés comme ferments doivent être adaptés aux conditions de fermentation.

2.1.2.1. La fermentation en milieu solide et la fermentation submergée

La fermentation en milieu solide est caractérisée par de la matière solide, lignocellulosique dans le cas des végétaux, et une quantité moindre d'eau (Abu Yazid *et al.*, 2017; Laufenberg *et al.*, 2003). Elle est à l'origine de nombreuses fermentations spontanées telles que l'ensilage ou le compostage. Elle est caractéristique de la production d'aliments fermentés comme les olives, la choucroute ou le tofu produit à partir de soja. Ce type de fermentation est également adapté à la production d'éthanol, de biomasse, d'enzymes, d'acides organiques, d'acides aminés, de molécules antimicrobiennes, de biosurfactants et de molécules aromatiques (Abu Yazid *et al.*, 2017; Couto et Sanromán, 2006). La fermentation submergée définit un milieu où les particules sont en suspension dans un liquide (Martins *et al.*, 2011; Singhania *et al.*, 2010). La phase aqueuse correspond au milieu de culture utilisé pour la croissance des ferments ajoutés lors de la fermentation. Contrairement à la fermentation en milieu solide, la fermentation submergée est plus adaptée à la croissance des bactéries que des levures et des moisissures.

La teneur en eau, et plus précisément l'activité de l'eau (a_w), est le paramètre discriminant ces deux types de fermentation (Laufenberg *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2011; Rodríguez Couto, 2008). En fonction des végétaux, les quantités moindres en eau limitent leur colonisation par des flores indésirables. Dépendamment des valeurs d' a_w , ces conditions peuvent être favorables à la croissance des moisissures (Abu Yazid *et al.*, 2017; Couto et Sanromán, 2006). Parmi les levures et les moisissures,

les genres : *Candida*, *Saccharomyces*, *Penicillium*, *Rhizopus* et *Aspergillus*, sont capables de se développer en fermentation solide. De plus, certaines bactéries sont également capables de s'y développer : *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Lactobacillus* et *Streptomyces*. Les *Lactobacillus* sont notamment retrouvés au cours du compostage.

L'hétérogénéité des substrats utilisés rend l'ajustement et le maintien des paramètres de culture difficile. Ainsi, lors du changement d'échelle, les paramètres doivent être ajustés et optimisés si besoin. La taille des particules en suspension influe directement le développement des microorganismes (Couto et Sanromán, 2006). Plus elles seront petites, plus la surface disponible pour la croissance sera élevée. Les espaces disponibles entre les particules de grandes tailles favorisent le stockage de gaz tels que le dioxygène. La quantité de dioxygène disponible dans le milieu est un critère déterminant pour la croissance des différentes flores microbiennes. Les paramètres de pH, de température et la taille des inocula doivent également être considérés (Singhania *et al.*, 2010).

A titre d'exemple, Singhania *et al.* (2010) ont référencé plusieurs études dont l'objectif était de produire des cellulases à partir de différents substrats (blé, banane, maïs, soja...) en fermentation solide ou submergée. La majorité des souches productrices étaient des moisissures (ex : *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*). Bien que les deux types de fermentation permettent la production de cellulases, la fermentation en milieu solide semble comparable aux conditions de croissance des moisissures dans l'environnement.

L'utilisation de déchets végétaux est une alternative à l'utilisation de substrats purs permettant de réduire les coûts de production (Martins *et al.*, 2011; Singhania *et al.*, 2010). La fermentation en milieu solide est d'autant plus sollicitée que l'ajout d'eau n'est pas nécessaire à la réalisation du processus. De plus, d'un point de vue pratique, les volumes à traiter pour l'extraction des composés d'intérêt et la quantité de solvant utilisée sont moindres. En revanche, le pilotage et le maintien des paramètres de fermentation sont facilités par l'utilisation d'équipements adaptés au suivi des variations du milieu.

2.1.2.2. La fermentation liquide

Les fermentations liquides sont réalisées dans des cuves où les paramètres de croissance des microorganismes peuvent être contrôlés. Contrairement aux fermentations solide et submergée, le milieu est homogène et son évolution peut être suivie par des capteurs (ex : pH, température...) (Subramaniyam et Vimala, 2012). Ceci permet un meilleur contrôle de la fermentation. Les impuretés sont peu nombreuses, ce qui facilite l'extraction des composés d'intérêt. A l'inverse des fermentations solide et submergée, les volumes à extraire sont plus importants. Les microorganismes couramment

utilisés sont des levures et des bactéries, l' a_w nettement plus élevée étant plus favorable à leur développement. Les substrats organiques solides sont peu adaptés à ce type de fermentation et doivent subir des étapes de prétraitements physiques, chimiques ou biologiques (Talebnia *et al.*, 2010).

La production d'acide lactique est possible via des procédés de fermentation continue (Narayanan *et al.*, 2004). Elle est réalisée par plusieurs espèces de *Lactobacillus* dont *Lb. delbrueckii* et *Lb. casei*.

Le critère discriminant les différentes fermentations repose sur la teneur en eau du milieu, et plus particulièrement l'activité de l'eau (a_w). Les deux types de fermentation : solide et submergée, sont utilisées dans le but de produire des composés d'intérêt (dont l'acide lactique), à partir de substrats organiques solides. Le recours aux sous-produits végétaux de l'agroalimentaire est envisagé afin de réduire les coûts de production et d'améliorer la valeur ajoutée de ces matrices.

2.2. Les écosystèmes végétaux

En écologie, l'écosystème est défini comme l'association du biotope et de la biocénose (Figure 5). Le biotope étant le milieu abiotique qui fournit les éléments nécessaires à la croissance des organismes. Ces derniers constituant la biocénose. Ces deux composantes évoluent et interagissent entre elles par des échanges de matières et d'énergie (Ramade, 2008; Veyret, 2007). Les écosystèmes terrestres, et notamment les sols, possèdent la diversité microbienne la plus élevée. Le taux de microorganismes des sols cultivés est de l'ordre de $2 \cdot 10^9$ cellules/g. Les trois domaines du vivant sont représentés avec une richesse en archées et en microorganismes fongiques égale ou supérieure à la richesse bactérienne.

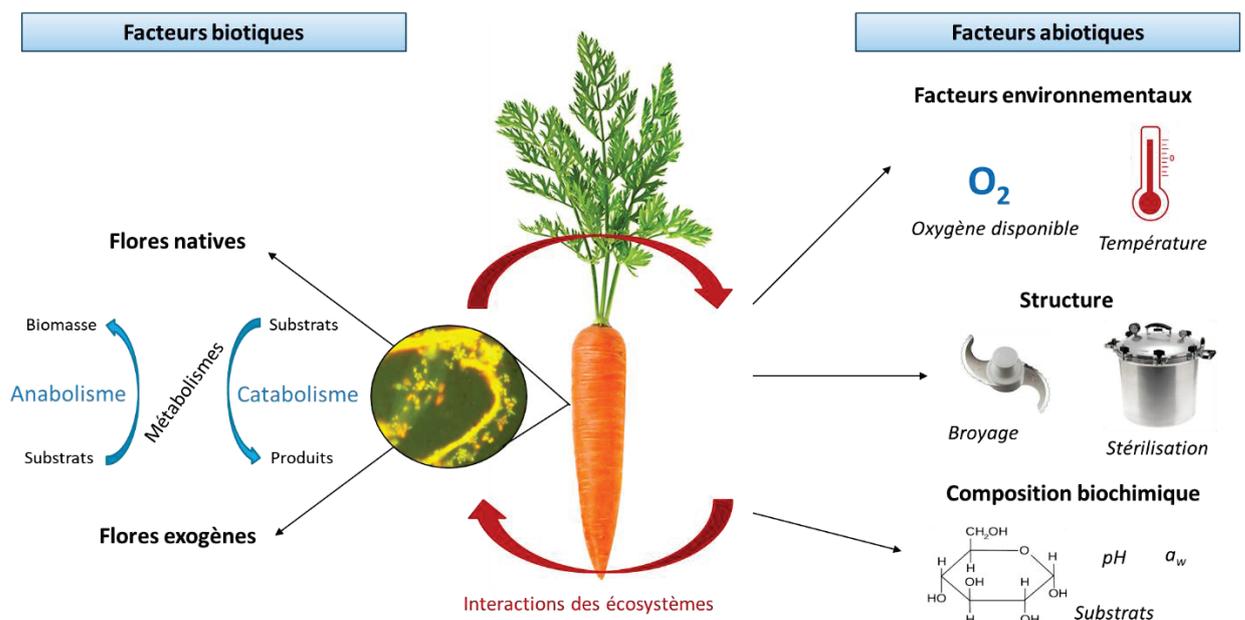


Figure 5 : Facteurs biotiques et abiotiques caractérisant les écosystèmes végétaux

2.2.1. Facteurs abiotiques

2.2.1.1. Définition d'un biotope

Le biotope est défini comme un espace délimité contenant les ressources nécessaires au développement des organismes vivants qui le composent. Il peut être composé d'éléments organiques et inorganiques (Ramade, 2008; Veyret, 2007). Dans le cas des déchets végétaux, ce sont des produits fermentescibles, sous différents états physiques : solide, liquide ou suspension (Balet, 2016). Cet état dépend de la nature des végétaux (fruits ou légumes) et des parties qui ont été ôtées : feuilles, peau, pépins, ou encore pulpe. Les sous-produits obtenus vont être caractérisés selon leur masse volumique, leur taux d'humidité et leur granulométrie.

Les traitements mécaniques, utilisés au cours des processus de transformation, modifient les propriétés des sous-produits (Moletta et Guillou, 2013). Les premières étapes de tri éliminent tout ou partie des végétaux et génèrent des mélanges bruts et hétérogènes. Les produits ayant un mauvais calibre ou des parties abimées seront éliminées. L'usage de pressages mécaniques permet d'obtenir une pulpe organique pouvant être traitée par méthanisation. La granulométrie des végétaux peut évoluer lors du déchiquetage ou du broyage. De plus, les traitements thermiques, tels que le séchage, peuvent avoir une influence sur le taux d'humidité par exemple.

2.2.1.2. Caractéristiques intrinsèques des sous-produits végétaux étudiés

Les caractéristiques intrinsèques jouant sur le développement des flores microbiennes sont : la composition en nutriments, le pH, le potentiel d'oxydo-réduction, l' a_w et le taux d'humidité (Guiraud, 2012; Jay *et al.*, 2005). D'un point de vue global, les fruits et légumes sont majoritairement constitués : d'eau (85-88%), de glucides (8,6-13%), de protéines (0,9-1,9%) et de graisses (0,3-0,5%). Les acides nucléiques, les vitamines, les minéraux et les composés aromatiques représentent des quantités inférieures à 1%.

La carotte et la salade sont deux matrices particulièrement riches en eau. Les déchets de carottes sont composés à 10% de matière sèche. Elles contiennent différentes protéines : de l'albumine, de la globuline et de la prolamine. Elles sont également une source en macro et microéléments (Wadhwa et Bakshi, 2013). La salade, notamment la laitue, est principalement composée d'eau (94,8%). Les taux de glucides, protéines et lipides sont respectivement de : 2,9%, 1,2% et 0,2% (Jay *et al.*, 2005).

Le son de blé et le levain sont deux matrices issues de matières premières céréalères. Le son de blé est un produit contenant : 91,6% de matière sèche, 5,7% de matière grasse et 15,5% de protéines (Prückler *et al.*, 2015a). Il est riche en glucides avec un pourcentage en amidon de l'ordre de 16,3% et des quantités en sucres de 33,6 mg de glucose/g et 24,5 mg de fructose/g. Le son de blé contient

également d'autres sucres : du saccharose, du fructane, de l'arabinose et du xylose. Après ajout d'eau, le pH est de 6,3. Le son contient également des composés phénoliques, tels que : l'acide gallique, l'acide vanillique et l'acide férulique. Le levain de germe de blé est quant à lui un produit transformé, obtenu après la déshydratation d'un levain chauffé à 200°C, pendant 30 secondes maximum et classé comme un levain de type III (Vera et al., 2012). Le levain est une pâte fermentée à base de farine et d'eau. Ajouté aux produits panaires, il permet le développement de caractéristiques organoleptiques spécifiques. Chaque levain possède également des propriétés d'acidification particulières. La fermentation par les bactéries lactiques et les levures donne un produit acide dont le pH est de l'ordre de 3,4 à 3,7.

Les pommes sont des fruits composés à 84,1% d'eau, 14,9% de glucides, 0,3% de protéines et de lipides (Jay *et al.*, 2005). La peau de deux variétés de pommes : « Jonagold » et « Granny Smith », contient quatre sucres : du glucose, du saccharose, du fructose et du sorbitol (Cebulj *et al.*, 2017). Ce fruit contient des composés phénoliques, tels que les flavanols et flavonols, les acides hydroxycinnamiques et les dihydrochalcones. Pour les variétés « Red Delicious » et « Golden », les sucres majoritaires sont : le glucose, l'arabinose et le galactose, et de l'acide galacturonique est présent en quantité importante (Arnous et Meyer, 2008). Du xylose et du rhamnose sont également présents dans la peau des pommes.

2.2.1.3. Paramètres physico-chimiques de fermentation

Les paramètres physico-chimiques que sont la température, le potentiel d'oxydo-réduction, le pH et la présence de composés antimicrobiens influencent la survie et le développement microbien (Guiraud, 2012). Ils régulent à la fois les processus de fermentation spontanée et de fermentation dirigée. Les plans d'expérience sont des outils qui peuvent être utilisés dans le but d'optimiser les processus de production ; et également afin de définir les interactions mises en jeu entre les variables de culture (John *et al.*, 2007b, 2006; Nalini et Parthasarathi, 2018).

2.2.1.3.1. La température

La température influence la structure cellulaire et les activités enzymatiques microbiennes (Capozzi *et al.*, 2011). Ainsi, chaque microorganisme est caractérisé par ses températures cardinales de croissance (températures minimale, optimale et maximale). En réponse aux stress thermiques, les cellules induisent la production de protéines de réponse, les « cold-shock proteins (CSPs) » et les « heat-shock proteins (HSPs) ». Le développement des techniques de conservation par le froid des aliments a favorisé l'étude des mécanismes microbiens mis en place dans ces conditions. Chez les LAB, les températures inférieures aux températures optimales de croissance affectent la fluidité et les

activités membranaires (ex : transport de métabolites, synthèse protéique), la transcription des ARNm (ARN messagers), le repliement protéique et l'activité ribosomale (Capozzi *et al.*, 2011). Aux températures minimales, les membranes microbiennes se solidifient et la croissance est interrompue (D'Amico *et al.*, 2006). Les lipides synthétisés sont des acides gras insaturés, à courte chaîne de fonctions acyle, avec des doubles liaisons insaturées et des acides gras ramifiés d'une fonction méthyle (Beney et Gervais, 2001; Capozzi *et al.*, 2011). Au sein même des bactéries lactiques, la diversité des mécanismes mis en jeu pour répondre aux stress thermiques est importante et dépend des genres considérés (De Angelis et Gobbetti, 2011). Par exemple, différentes espèces de *Lactobacillus*, placées à des températures supérieures à 50°C, ont une capacité de survie variable, avec des taux compris entre 0,0001 et 0,48% (De Angelis et Gobbetti, 2011). L'adaptation au stress subi se traduit par la synthèse de « HSPs » spécifiques à chaque souche.

Lors de la fermentation, les températures optimales de croissance et de production de métabolites peuvent être différentes. Elles sont dépendantes des populations microbiennes étudiées et peuvent être influencées par les conditions physico-chimiques du milieu telles que le pH ou le potentiel d'oxydo-réduction (Jawad *et al.*, 2013). A partir d'un milieu riche en glucose, des essais de fermentation ont mis en évidence pour les espèces *Lb. casei* et *Lb. plantarum*, une production plus importante d'acide lactique à 37°C, après 24 h d'incubation, par rapport aux expériences menées à 30/41 et 45°C (Hujanen et Linko, 1996).

2.2.1.3.2. Le potentiel d'oxydo-réduction

Le potentiel d'oxydo-réduction est influencé par la nature des substrats oxydés et réduits, la quantité d'oxygène, dont l'oxygène dissous, et les caractéristiques physiques du milieu. Au sein d'environnements complexes et hétérogènes, tels que ceux associés aux fermentations de végétaux, l'agglomération plus ou moins importante, ou encore la taille des particules impactent les échanges gazeux (Abu Yazid *et al.*, 2017). La capacité des microorganismes à utiliser l'oxygène dissous définit leur caractère aérobie, anaérobie et aérobie-anaérobie facultatif, et leur distribution spatiale dans l'écosystème (Drider et Prévost, 2009; Jay *et al.*, 2005). La croissance des microorganismes aérobies est favorisée pour des valeurs de potentiel d'oxydo-réduction positives, au contraire des microorganismes anaérobies qui se développent à des potentiels d'oxydo-réduction négatifs. Le pyruvate, au centre de nombreuses voies métaboliques, est également utilisé comme accepteur final d'électrons. Le potentiel d'oxydo-réduction est également influencé par l'évolution du pH et de la température. Les végétaux sont des matrices naturellement réductrices du fait notamment de la présence de sucres réducteurs ou d'acide ascorbique. Dans des milieux non oxygénés, la consommation de l'oxygène par les microorganismes aérobies provoque l'augmentation des

molécules réduites et crée un environnement plus favorable à la croissance des microorganismes anaérobies. La succession de ces communautés microbiennes est décrite lors de la fermentation de végétaux.

D'un point de vue global, le métabolisme des bactéries lactiques conduit à un milieu réducteur (Drider et Prévost, 2009). Les genres *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Weissella*, produisent du peroxyde d'hydrogène à l'origine de formes réactives de l'oxygène et d'un stress oxydant inhibiteurs de flores d'altération ou pathogènes (ex : *Staphylococcus*, *Listeria*) (Zagorec et Christieans, 2013).

Des essais, menés lors de la production de choucroute ont montré une diminution du potentiel d'oxydo-réduction au cours de la fermentation (van Dijk *et al.*, 2000). En parallèle, les sucres réducteurs sont consommés (glucose et fructose) et les acides lactique et acétique sont produits. La fermentation de concombre par *Lb. plantarum* indique des dynamiques de production et de consommation de substrats identiques à la fermentation du chou (Olsen et Pérez-Díaz, 2009). Lors de la phase stationnaire, les résultats montrent une augmentation du potentiel d'oxydo-réduction.

2.2.1.3.3. Le pH

Lors de la fermentation de végétaux, l'évolution du pH est liée au pH de la matrice mais également aux composés produits par le métabolisme microbien (Jawad *et al.*, 2013). De plus, la croissance des microorganismes est dépendante de ce critère. La capacité d'une souche bactérienne à acidifier le milieu est un critère pris en compte lors de la sélection de souches fermentaires. En effet, une diminution du pH limite la croissance des flores indésirables d'altération et pathogènes. Elle prévient également la dégradation des aliments. Les flores natives à l'origine de cette conservation sont notamment les bactéries lactiques (Zagorec et Christieans, 2013).

Plusieurs études se sont intéressées à l'effet du pH sur la production d'acide lactique en utilisant des végétaux comme substrat. Après 1 jour de fermentation de carottes par des souches autochtones, des essais ont montré une réduction du pH de 5,9 à un pH inférieur à 4,5 (Di Cagno *et al.*, 2008). Celle-ci était concomitante à la production d'acide lactique, d'acide acétique et d'éthanol. D'autres essais, menés à partir de mangues, ont permis de produire une quantité maximale d'acide lactique de 17,5 g/L, à un pH initial ajusté de 10 et une température de 35°C (Jawad *et al.*, 2013). Enfin, la fermentation de canne à sucre par *Lb. delbrueckii*, permet d'obtenir la plus importante quantité d'acide lactique à un pH de 6,5 (John *et al.*, 2006).

D'un point de vue dynamique, le pH tend à diminuer au cours des premiers jours de fermentation des végétaux. Par exemple, des essais de fermentation spontanée de chou, de tomate, de concombre

et de carotte ont montré une diminution du pH de 6,5 environ à 3,6 en moyenne après 35 jours, et une chute du pH au cours des trois premiers jours (Wouters *et al.*, 2013a). Celle-ci s'accompagnait d'une production d'acide lactique, avec une quantité maximale d'environ 5 g/L après plus de 25 jours d'incubation.

2.2.1.4. Variation des paramètres par des plans d'expérience

Les plans d'expérience peuvent être utilisés pour l'optimisation des fermentations, afin de tester plusieurs combinaisons de variables de croissance. Cette démarche permet de déterminer les variables qui influencent une réponse donnée, et quelles sont les interactions entre elles (John *et al.*, 2006; Nalini et Parthasarathi, 2018). A partir des résultats obtenus, des modèles peuvent être développés et les processus de production optimisés. *In fine*, l'utilisation de plans d'expérience tend à diminuer les coûts de production.

Les plans à surface de réponse (Response Surface Methodology) sont utilisés dans le but de déterminer les conditions optimales pour la production de composés d'intérêt. A titre d'exemple, des essais, faisant varier la concentration en substrat, le pH, la température et la quantité de microorganismes ajoutés ont permis d'augmenter la production de biosurfactant (Nalini et Parthasarathi, 2018). Les biosurfactants étaient produits par *Serratia*, en fermentation solide. Un autre exemple a permis de maximiser la production d'acide lactique. Les variables considérées étaient : la concentration en substrat, en enzymes, en extrait de levure, en NH₄Cl et la quantité de microorganismes ajoutés (*Lb. casei* et *Lb. delbrueckii*) (John *et al.*, 2007b).

Enfin, John *et al.* (2006) ont amélioré la production d'acide lactique en passant par un plan composite principal. Le substrat était composé de déchets de manioc fermentés en conditions solides. Les conditions d'incubation variaient selon : le taux d'humidité et la quantité de sucres réduits. En parallèle, la taille de l'inoculum, le pH initial et la concentration en carbonate de calcium ont été ajustés.

2.2.2. Facteurs biotiques

2.2.2.1. Définition biocénose

La biocénose définit l'ensemble des organismes vivants qui composent un écosystème (Ramade, 2008; Veyret, 2007). Elle tient compte de l'identité taxonomique des individus, du nombre d'espèces présentes et des taux associés. Pour un biotope considéré, la notion d'interaction induit une dépendance réciproque entre les êtres vivants et impacte la croissance des individus. Selon Veyret (2007), le développement de la biocénose est permanent. Cette notion de temporalité implique

d'observer l'organisation des organismes à un instant donné et de prendre en compte toute perturbation extérieure qui pourrait faire évoluer le système. L'étude des communautés donne une image des caractères fonctionnels et taxonomiques représentés au sein de l'écosystème.

Les microorganismes présents à la surface des végétaux (fruits et légumes) peuvent provenir : du sol, des voies aériennes, des animaux, de l'Homme ou des végétaux eux-mêmes (Bertrand, 2012; Beuchat, 2002). Dans le contexte agronomique, de nombreux travaux ont étudié le rôle des microorganismes telluriques et leur distribution au niveau racinaire (Berg et Smalla, 2009; Bhattacharyya et Jha, 2012; Critzer et Doyle, 2010; Knief *et al.*, 2012; Mendes *et al.*, 2013). La carotte est un légume directement issu de cet environnement. Les voies aériennes impliquent la dissémination des microorganismes par le vent et les eaux d'irrigation. Les animaux peuvent également être vecteurs de microorganismes. L'utilisation de fumier peut engendrer un apport en microorganismes pathogènes pour l'Homme tels que les *Enterobacteriaceae*, et plus particulièrement d'*Escherichia coli* issus du tractus digestif des animaux à sang chaud. Lors de la rotation des cultures, les microorganismes ou leurs spores peuvent persister dans les sols et coloniser des cultures différentes d'une année sur l'autre. Des phénomènes de chimiotactisme sont notamment impliqués dans les interactions entre les plantes et les microorganismes.

En plus des pratiques de culture au champ, la composition des sous-produits végétaux est influencée par les premières phases de transformation en IAA, et notamment le tri des parties végétales non conformes à la consommation. En fonction des processus de transformation, les sous-produits ont subi ou non des étapes de décontamination telles que des lavages. En fonction des traitements appliqués (ex : concentration en agent décontaminant ou temps d'application), l'effet sur les flores sera différent. Dans le cadre de la valorisation par des processus de fermentations, les organismes vivants étudiés sont les microorganismes appartenant aux domaines des *Eukarya* (levures et moisissures) et des *Bacteria*.

2.2.2.2. Les microbiotes végétaux

Les microbiotes végétaux sont principalement étudiés afin de comprendre les mécanismes de contamination alimentaire ou dans le but d'identifier les flores protectrices (Jay *et al.*, 2005; Zagorec et Christieans, 2013). Les familles généralement identifiées et/ou recherchées sont les bactéries lactiques, les bactéries à Gram négatif (Ex : *Enterobacteriaceae* -(notamment du genre *Erwinia* et *Pseudomonas*), et les levures et les moisissures (Guiraud, 2012). Bien que les végétaux soient en contact étroit avec les sols, les *Actinomycetes*, largement présents dans cet environnement, ne sont pas retrouvés à la surface des végétaux (Jay *et al.*, 2005). Au contraire, les bactéries lactiques, peu présentes dans les sols sont quasi systématiquement identifiées à la surface des végétaux. Lors de la

transformation des aliments en industries agroalimentaires, une dynamique commune de colonisation est observée. Une diminution de la flore mésophile aérobie totale est observée après l'application de traitements thermiques (ex : le blanchiment²). Une ré-augmentation de ce taux est observée en fin de process avant conditionnement et après transformation (ex : découpe).

Pour des végétaux frais, la flore mésophile aérobie totale (FMAT) est de l'ordre de 6 à 7 log(UFC)/g et de 5 à 6 log(UFC)/g pour les coliformes (Jay *et al.*, 2005). Par exemple pour la laitue, la FMAT est dénombrée à un taux de 8,6 log(UFC)/g. Pour la laitue, les coliformes ont été retrouvés à un taux de 5,6 log(UFC)/g. Les sous-produits peuvent être exclus des process de transformation à la suite du tri des végétaux abimés. Le pourrissement de ces denrées est souvent associé aux genres bactériens : *Pseudomonas*, *Pectobacterium*, *Erwinia* et *Xanthomonas*. La dégradation de la salade peut être associée à deux groupes de *Pseudomonas* : *P. cichirii* et *P. marginalis*. *Pectobacterium* peut être à l'origine du pourrissement des carottes et leur donner une consistance pâteuse particulière.

Les levures et les moisissures interviennent également dans l'altération des végétaux (Guiraud, 2012; Jay *et al.*, 2005). Les blessures au niveau des structures extérieures (ex : peau) sont les principales voies d'entrée de ces microorganismes. Par exemple, le mildiou de la salade est généré par le genre : *Bremia*. *Geotrichum* peut être responsable de la dégradation des carottes et des salades. Les fruits sont des biotopes favorables à la croissance des microorganismes eucaryotes du fait de leur teneur élevée en sucres et de leur pH souvent plus acide que les légumes.

Lors de la fermentation spontanée d'olives, trois familles microbiennes ont été identifiées : les *Enterobacteriaceae*, les bactéries lactiques, ainsi que les levures et les moisissures (Bautista-Gallego *et al.*, 2011). Selon la variété d'olive, les levures étaient présentes, à des taux compris entre $2,75 \cdot 10^3$ et $2,57 \cdot 10^4$ UFC/ml, en début de fermentation. Après 10 à 21 jours de fermentation, elles étaient dénombrées à hauteur de $5 \cdot 10^5$ UFC/ml environ. Les espèces identifiées étaient : *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces* et *Wickerhamomyces*.

Lors de la fermentation d'un mélange de végétaux (tomates, carottes et choux-fleurs), les bactéries lactiques étaient présentes à des taux supérieurs à 7 log(UFC)/ml, et les *Enterobacteriaceae* étaient dénombrées entre 1 et 2 log(UFC)/ml, après deux jours de fermentation (Wouters *et al.*, 2013a). Par rapport aux taux initiaux, les bactéries lactiques se sont multipliées et les *Enterobacteriaceae* ont diminué. Les bactéries lactiques étaient représentées par plusieurs espèces : *Weissella kimchii*, *Weissella paramesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* et *Leuconostoc*

² Blanchiment des arachides : traitement thermique pour éliminer la pellicule de la graine et en faciliter l'utilisation

pseudomesenteroides. L'identification par DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) a également mis en évidence la présence des *Pseudomonas* spp..

2.2.2.3. La compétition microbienne

La compétition entre les différentes communautés microbiennes permet la colonisation de l'environnement. Les études menées sur cette thématique s'inscrivent principalement dans le contexte des contaminations alimentaires. La compétition peut se traduire par une consommation du substrat par les flores les plus compétitrices, rendant son accès limité pour les flores minoritaires (Rodgers, 2001). Deux effets définissent ce *phénomène*. L'effet Jameson caractérise « l'arrêt de la croissance microbienne lorsque la population dominante atteint la phase stationnaire de croissance » (Gnanoubesse *et al.*, 2006). Le second est l'effet géométrique qui définit la colonisation d'un milieu solide dépendamment de la diffusion des cellules, des nutriments et des métabolites.

L'installation des flores microbiennes est fonction de la quantité de cellules présentes initialement. Dans le contexte des contaminations alimentaires, plus la flore native sera dominante, plus la flore pathogène sera inhibée (Gnanoubesse *et al.*, 2006). Des essais menés à partir de saumon fumé ont montré une diminution de *Listeria monocytogenes* par la flore mésophile aérobie du produit.

Enfin, les effets de compétition sont dus en partie aux composés antimicrobiens produits par les flores naturelles des végétaux. Ils participent à l'équilibre des écosystèmes et leur activité est majoritairement attribuée aux bactéries lactiques (Zagorec et Christieans, 2013). Ces composés peuvent être des acides organiques, du dioxyde de carbone, de l'éthanol, du peroxyde d'hydrogène, du diacétyl, des bactériocines ou encore des antibiotiques. Leur production et leur mode d'action sont développés dans la partie 2.3.3.5 de ce manuscrit. Le potentiel inhibiteur de ces populations résulte de l'interaction entre l'ensemble de ces facteurs (Alvarez-Sieiro *et al.*, 2016). A titre d'exemple, la croissance des bactéries pathogènes *L. monocytogenes*, *Salmonella thyphimurium* et *Staphylococcus aureus* peut être limitée par la présence de flores dites « protectrices » telles que *Lb. casei*, *Lb. plantarum* et *Pediococcus* spp (Rodgers, 2001).

Les écosystèmes végétaux sont également des environnements où les bactériophages sont présents et peuvent exercer une pression sélective. Ils impactent le développement des flores bactériennes en provoquant la lyse des cellules (Zagorec et Christieans, 2013).

Les sous-produits étant directement issus des végétaux destinés à l'alimentation, les mêmes observations que celles réalisées pour le suivi et la caractérisation des contaminations alimentaires pourraient être retrouvées.

2.2.2.4. Les biofilms des végétaux

Les biofilms sont des écosystèmes particuliers constitués de microorganismes, organisés dans un espace abiotique (Caponigro *et al.*, 2010; Chmielewski et Frank, 2003; Fernández Ramírez *et al.*, 2015). Les microorganismes présents peuvent être morts ou vivants, et de communautés constituées d'une ou plusieurs espèces. La spécificité du biotope est la production d'une matrice extracellulaire : composée de polysaccharides (notamment d'EPS (ExoPolySaccharides) produits par les microorganismes présents), de protéines, de phospholipides, et d'acides téichoïques et nucléiques. Elle participe au développement des cellules et à leur protection face aux stress extérieurs. Les microorganismes sont ancrés à des surfaces inertes, plus ou moins favorables à l'installation des biofilms. Au sein des biofilms, des interactions ont lieu entre les microorganismes eux-mêmes et avec le biotope. Le phénomène de « quorum-sensing » est engagé dans la communication entre les cellules microbiennes et le recrutement de nouvelles cellules du biofilm. La disponibilité en nutriments constitue souvent un paramètre limitant le développement des biofilms (ex : disponibilité des sucres). Il existe également des gradients de potentiels redox, liés notamment à la limitation de la diffusion de l'oxygène vers le cœur des biofilms. L'implication de biofilms constitués de bactéries lactiques a été rapportée lors de la décomposition des fruits et légumes (Kubota *et al.*, 2008). La capacité de souches de *Lb. plantarum* isolées à partir de produits alimentaires endommagés à former des biofilms, a été observée dans des milieux reconstitués contenant des nutriments carnés et végétaux. Le gène *lam* code un peptide impliqué dans les mécanismes d'adhérence aux surfaces. La présence de biofilms a directement été observée à la surface d'olives lors de leur fermentation spontanée (Arroyo-López *et al.*, 2012). Les images obtenues par microscopie électronique indiquent la présence de microorganismes (bactéries et levures) au sein d'une matrice constituée d'exopolysaccharides. Après 10 jours et 14 jours de fermentation, les taux de bactéries lactiques et de levures étaient respectivement de 8 et 6,5 log UFC/olive. A titre d'exemple, les biofilms représenteraient 10 à 40% des bactéries présentes à la surface des feuilles d'endive ou de persil (Beuchat, 2002).

2.2.4. Capacité fermentescible des végétaux

La Figure 6 et le Tableau 1 reprennent les caractéristiques principales des trois types de végétaux : les fruits, les légumes et les céréales auxquels appartiennent les sous-produits de l'étude. Ils mettent en avant des différences dans la composition biochimique des matières brutes, avec notamment des quantités de sucres plus élevées pour les fruits et les céréales. Cette source de carbone peut être limitante pour les métabolismes microbiens lors de la fermentation. En comparaison aux fruits, les légumes semblent être de meilleures sources de protéines. A priori, les conditions de pH plus neutres pour les céréales et les légumes, et la quantité en eau plus élevée, seraient favorables au développement des microorganismes en fermentation spontanée. A l'échelle des familles microbiennes identifiées à la surface, peu importe la nature des végétaux, les levures et les moisissures composent les microbiotes. Lors de la fermentation spontanée, les bactéries lactiques deviennent majoritaires et dominantes, bien qu'elles puissent être peu présentes au départ. Les exemples d'aliments fermentés, à base de végétaux, rappellent que les composés produits au cours de la fermentation sont divers. Parmi eux, les acides organiques, les enzymes, ou encore les composés aromatiques, peuvent être valorisés d'un point de vue économique. C'est ici l'objectif du projet ValPro dans le cadre duquel j'ai réalisé ces travaux de thèse.

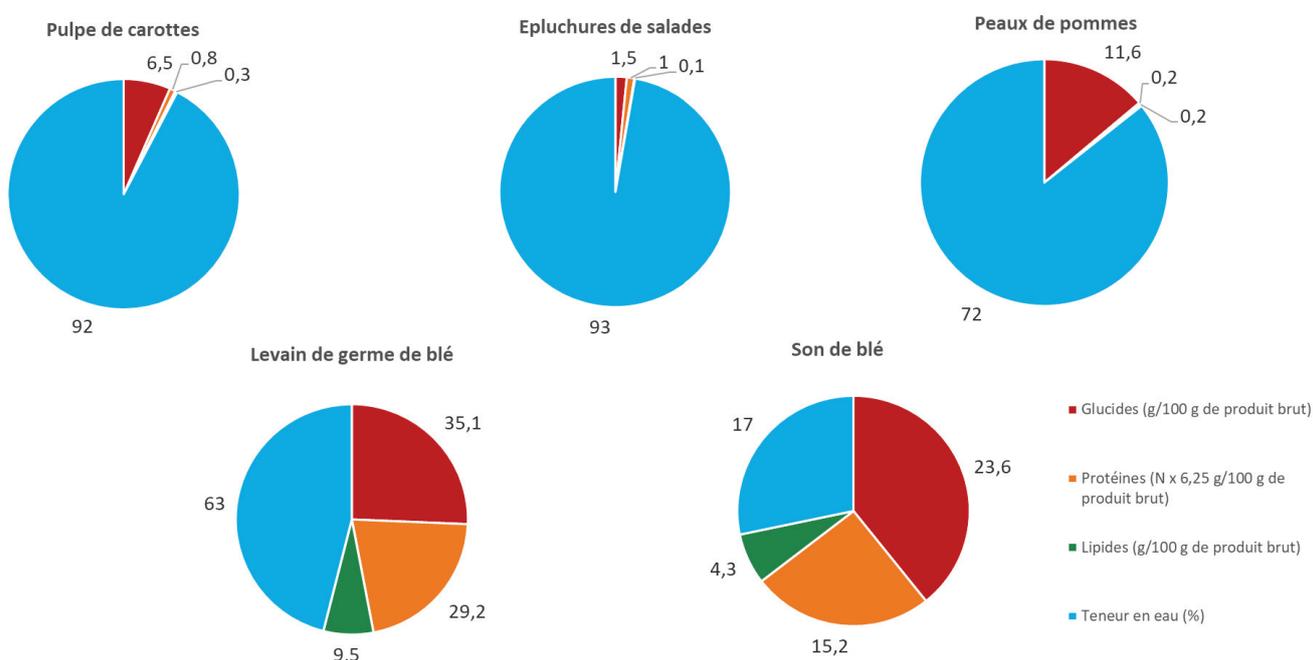


Figure 6 : Composition biochimique des produits végétaux bruts à l'origine des sous-produits végétaux (Tables Ciqual, Anses, 2017)

Chapitre 2 : Contexte bibliographique

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques des végétaux selon leur nature

	Sous-produits végétaux			Bibliographie
	Fruits	Légumes	Céréales	
Caractères physicochimiques	pH de 2 à 6,7	pH plus neutres, de 3 à 6,5	pH de 3,5 à 4,5	Charalampopoulos <i>et al.</i> , 2002; Jay <i>et al.</i> , 2005; Swain <i>et al.</i> , 2014
Flores microbiennes fermentaires	Levures et moisissures majoritaires sur les produits bruts 0,1 % de bactéries lactiques, devenant majoritaires au cours de la fermentation			Di Cagno <i>et al.</i> , 2013; Montet <i>et al.</i> , 2014
Exemples de végétaux fermentés	Marc de pomme (Acide citrique par <i>Aspergillus</i> , composés aromatiques par <i>Rhizopus</i>) Raisin (Vin par <i>Saccharomyces</i> , enzymes par <i>Aspergillus</i>)	Kimchi, choucroute, cornichons, olives, concombres (bactéries lactiques)	Son de blé (enzymes par <i>Streptomyces</i> et <i>Bacillus</i> , acide lactique par <i>Lactobacillus</i>)	Di Cagno <i>et al.</i> , 2013; Gänzle, 2015a; Montet <i>et al.</i> , 2014; Rodríguez Couto, 2008

Depuis des siècles, les fermentations sont utilisées pour la conservation, et l'amélioration des qualités organoleptiques et nutritives de denrées alimentaires (ex : les fromages, la bière) dont les végétaux (ex : la choucroute, les olives) (Bourdichon *et al.*, 2012; Swain *et al.*, 2014). Les bactéries lactiques se développant lors de ces processus constituent également une source de microorganismes probiotiques (Jay *et al.*, 2005). Globalement, la composition des biotopes semble favorable à la croissance microbienne avec en autres des pH compris entre 2 et 6,7, et des taux d'humidité entre 85 et 88%. Des plus, les fruits et les légumes contiennent les éléments nutritifs indispensables au développement : des glucides, des protéines, des lipides, des acides nucléiques, des vitamines et des minéraux. Du point de vue des flores microbiennes présentes, les levures et les moisissures dominent les écosystèmes végétaux bruts et peuvent être à l'origine de fermentations spontanées. Bien que les bactéries lactiques soient initialement dénombrées à des taux inférieurs, elles sont responsables de la majorité des fermentations lactiques spontanées. L'acidification du milieu par la production d'acides organiques, dont l'acide lactique, provoque l'inhibition des bactéries à Gram négatif dans les premiers jours de fermentation.

2.3. Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (LAB) sont ubiquitaires de nombreux systèmes alimentaires : produits carnés, végétaux ou laitiers. Comme le montrent les parties développées précédemment, les bactéries lactiques participent à la protection des matrices végétales, notamment via la production de molécules inhibitrices de flores indésirables. Des études, cherchant à valoriser les végétaux via la fermentation, ont également travaillé sur le pilotage des paramètres de croissance dans le but de produire des métabolites d'intérêt. D'un point de vue biotechnologique, certaines souches peuvent aussi exercer un rôle important chez l'Homme comme probiotiques.

2.3.1. Taxonomie et caractéristiques

Les bactéries lactiques appartiennent au phylum des firmicutes et sont classées selon 12 genres principaux : *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella* (Björkroth et Koort, 2016; Giraffa *et al.*, 2010; Makarova *et al.*, 2006).

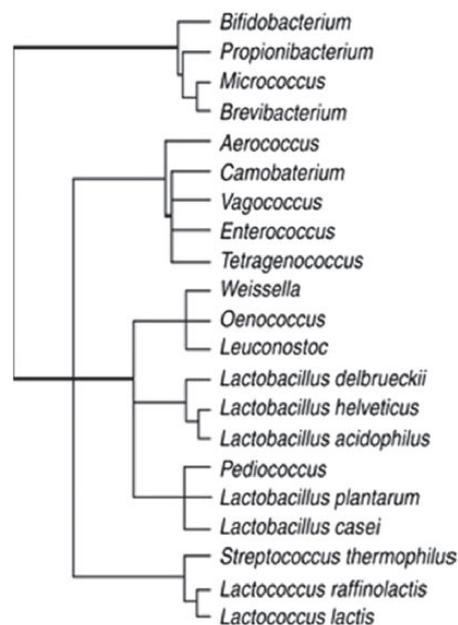


Figure 7 : Relations phylogénétiques des bactéries à Gram positif et à faible pourcentage GC (GC%), basées sur la comparaison des séquences d'ARNr 16S (Björkroth et Koort, 2016)

L'arbre phylogénétique de plusieurs genres de bactéries à Gram positif, dont les genres de LAB, est présenté sur la Figure 7. Les LAB sont des bactéries à Gram positif, microaérophiles, catalase négatives, non sporulantes, encapsulées, généralement anaérobies aéro-tolérantes et capables de produire de l'acide lactique par fermentation des sucres (Giraffa *et al.*, 2010; Salvetti *et al.*, 2012).

Les lactobacilli sont associés à l'Homme. Ils peuvent être retrouvés dans le tractus digestif et à la surface des muqueuses. Ils sont également présents au sein de niches écologiques diverses, telles que la surface des végétaux ou les produits carnés. Les LAB représentent 0,01 à 1% de la flore naturelle totale des végétaux (Dridier et Prévost, 2009). Parmi les LAB, les genres *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus* et *Streptococcus*, possèdent au moins une espèce portant le statut QPS-Qualified Presumption Safety (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) *et al.*, 2017). Ces microorganismes peuvent être utilisés comme levains pour la production de produits fermentés comme le fromage ou le vin. De plus, toutes les souches possèdent à des degrés divers des propriétés antimicrobiennes intéressantes pour la conservation des aliments : production d'acides faibles, de formes réactives de l'oxygène, de bactériocines ou encore la capacité à entrer en compétition avec les autres microorganismes de l'écosystème (Makarova *et al.*, 2006). Par exemple, la nisine est une bactériocine produite par certaines souches de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, qui exerce un pouvoir inhibiteur sur les bactéries à Gram positif (Zagorec et Christieans, 2013). Ces phénomènes de compétition doivent être considérés lors du pilotage de fermentation, notamment lorsqu'un microorganisme est ajouté comme levain ou starter. Son installation sera alors dépendante des flores présentes initialement.

Makarova *et al.* (2006), ont comparé les génomes complets des genres *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Oenococcus* et *Leuconostoc* et ont identifié entre 1 700 et 2 800 gènes codant pour des protéines. La taille des chromosomes est de l'ordre de 1,8 à 3,3 Mb (Dridier et Prévost, 2009). Le transfert de plasmides et de prophages permet une évolution dynamique des génomes. Jusqu'à 4,8% des gènes peuvent être portés par des plasmides (Makarova *et al.*, 2006). Ils codent notamment des protéines impliquées dans la protéolyse extracellulaire, le métabolisme du citrate ou encore la synthèse d'exopolysaccharides. Ils apportent des spécificités métaboliques et de colonisation du milieu diverses aux différentes espèces de LAB. Par exemple, la production d'acide lactique nécessite l'intervention de 11 enzymes différentes (Figure 8). La modification génétique de souche peut être utilisée dans le but de favoriser certaines voies métaboliques et la production de molécules d'intérêt. Par exemple, chez *L. lactis*, la production de diacétyle augmente lorsque le gène *aldB* codant l' α -acétolactate décarboxylase est muté et incapable de convertir l' α -acétolactate en acétoïne (Swindell *et al.*, 1996). Il est alors accumulé dans la cellule et transformé en diacétyle. Le diacétyle est une molécule aromatique donnant une typicité aux aliments fermentés comme les produits panaires, pour lequel le levain de germe de blé est utilisé comme matière première.

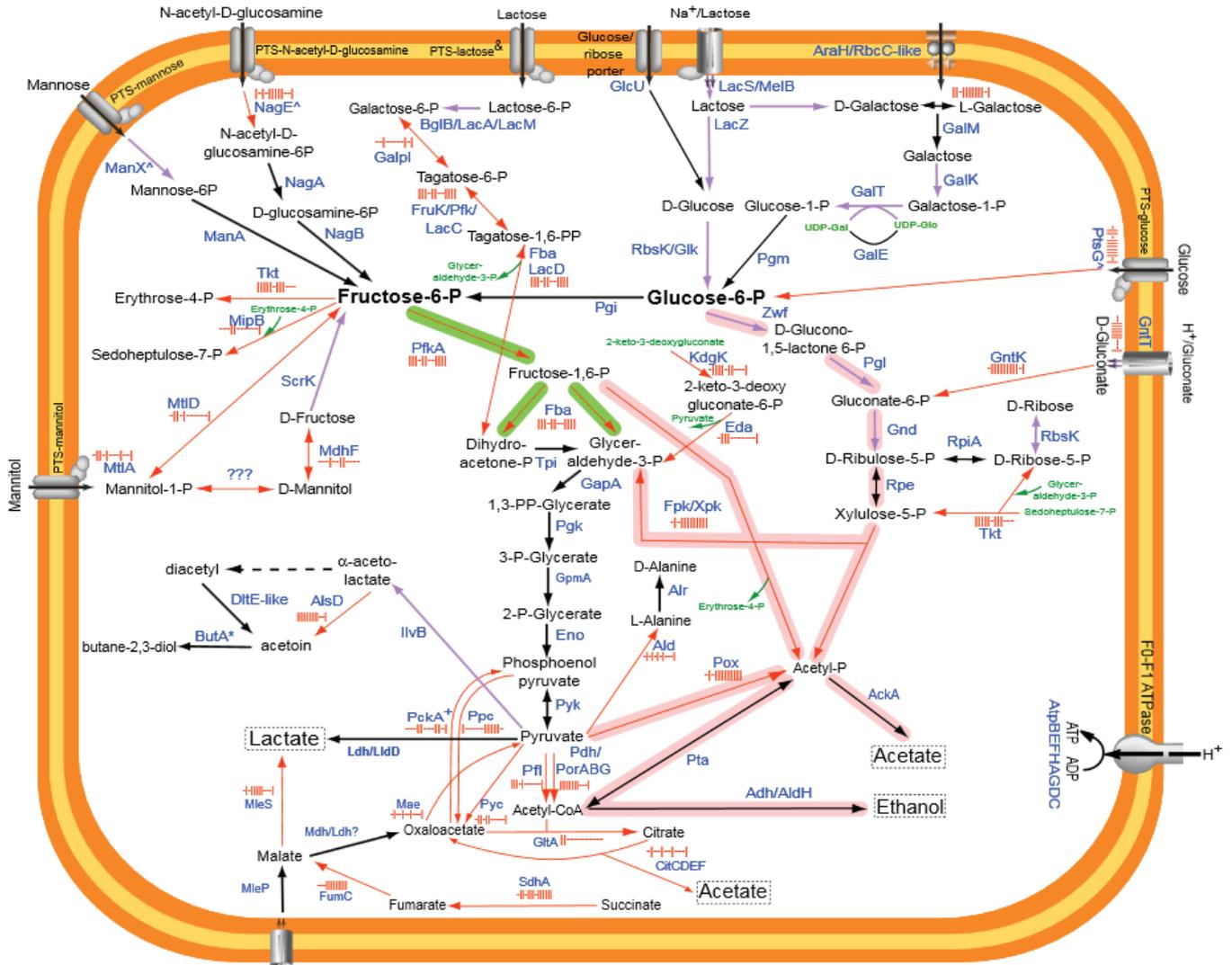


Figure 8 : Schéma de synthèse des différentes voies métaboliques présentes chez les bactéries lactiques (Makarova et al., 2006)

2.3.2. La fermentation lactique

Chez les bactéries lactiques, les sucres extracellulaires peuvent être internalisés en empruntant deux systèmes de transport actifs : le système phosphotransférase phosphoenolpyruvate dépendant (PTS) et le système perméase (Dridier et Prévost, 2009). D'un point de vue métabolique, le système perméase nécessite l'hydrolyse d'une molécule d'ATP au niveau membranaire. Le système PTS permet une phosphorylation des sucres concomitante à leur transport transmembranaire.

Les LAB homofermentaires n'utilisent les sucres (comme le glucose) que pour produire de l'acide lactique et de l'ATP (Dridier et Prévost, 2009; Gänzle, 2015a). Parmi elles, les genres : *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* et *Streptococcus*, ont été identifiés. Dans le cas du glucose, une glucokinase permet de produire du glucose-6-P par phosphorylation (Figure 9). Deux molécules de pyruvate et des composés intermédiaires, tels que le fructose-1,6-bis-P et le glycéraldéhyde-3-P, sont produits en

suivant la voie d'Embden-Meyerhof (ou glycolyse). Enfin, la lactate déshydrogénase catalyse l'hydrogénation du pyruvate pour former deux molécules d'acide lactique. Cette étape entraîne la réoxydation du cofacteur NADH en NAD⁺. Au cours de ce processus catabolique, deux ATP sont produits pour une molécule de glucose consommée. Le glucose est un sucre retrouvé dans la plupart des végétaux et qui peut être consommé lors de la fermentation lactique spontanée.

Les bactéries ne possédant pas : le système PTS, la fructose-1,6-bisphosphate aldolase et la triose phosphate isomérase, privilégient la voie des pentose-phosphates (Dridier et Prévost, 2009; Gänzle, 2015a). Une molécule d'acide acétique ou d'éthanol, de CO₂ et d'ATP sont produites pour une molécule de glucose consommée (Figure 9). Les genres de LAB décrits comme hétérofermentaires sont *Leuconostoc* et *Lactobacillus*. Ces deux genres sont fréquemment identifiés lors de la fermentation spontanée de produits végétaux (Demarigny, 2012). Dans un premier temps, comme pour les microorganismes homofermentaires, le glucose est transformé en glucose-6-P puis en xylulose-5-P avec libération d'une molécule de CO₂. A partir de cette étape, les LAB hétérofermentaires facultatives sont capables de suivre la voie de la glycolyse en produisant du glycéraldéhyde-3-P et de l'acide lactique. Les hétérofermentaires obligatoires utilisent la xylulose-5-P phosphocétolase pour former de l'acétyl-P. Cette molécule peut être convertie en acide acétique, via une acétate kinase et la production d'une molécule d'ATP. Elles peuvent également catalyser la production d'éthanol et la régénération du NADH.

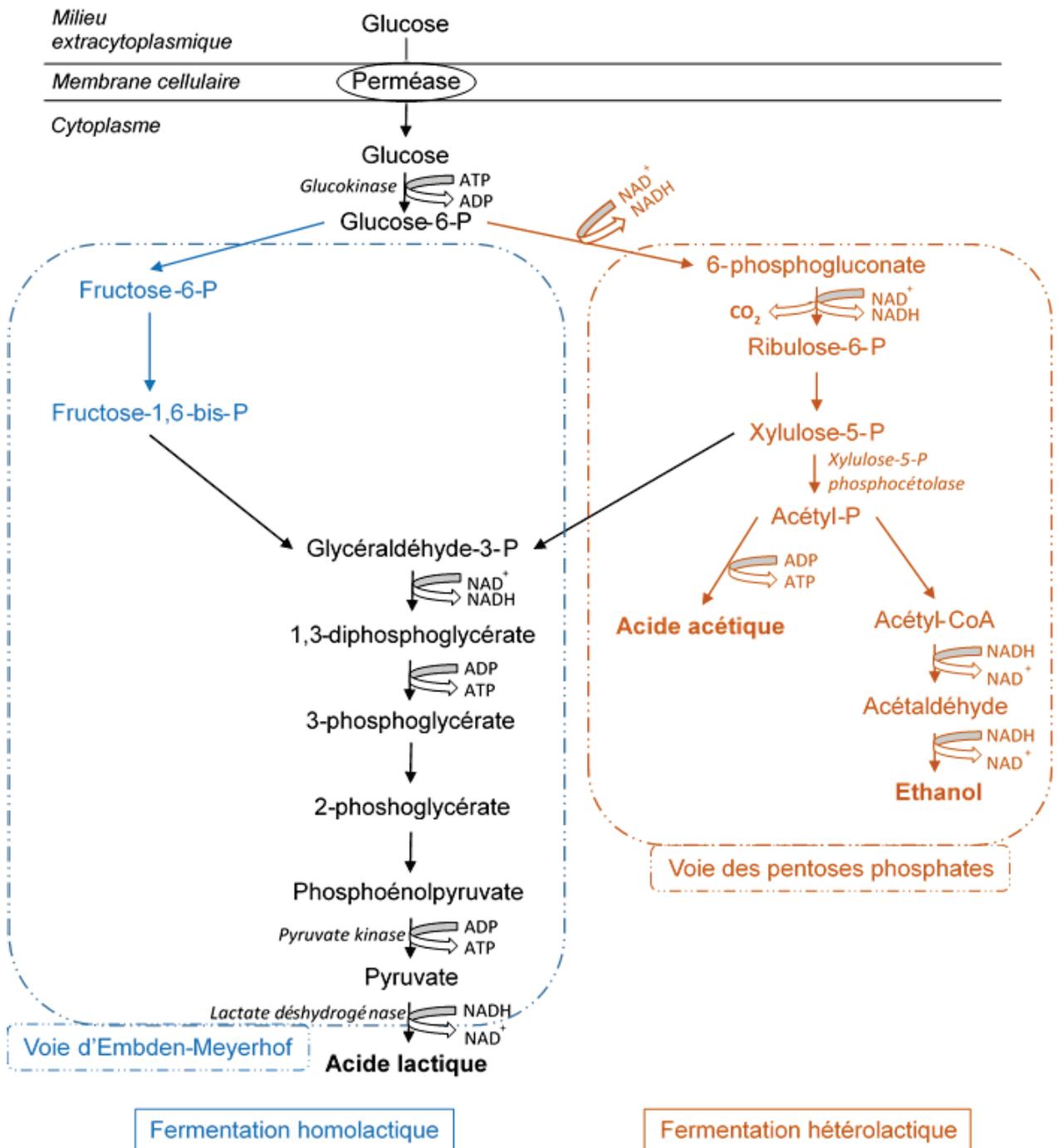


Figure 9 : Métabolisme carboné des bactéries lactiques (d'après Drider et Prévost, 2009; Gänzle, 2015a)

La production de métabolites d'intérêt via le pilotage de la fermentation lactique peut impliquer d'ajouter au système un microorganisme en excès dans l'environnement. Pour certaines applications, la production de produits du métabolisme tels que l'acide lactique ou l'acide acétique sera recherchée. Le caractère homo ou hétérofermentaire du microorganisme sélectionné doit alors être déterminé. Pour la production d'acide lactique, l'ensemencement d'un microorganisme homofermentaire n'est pas gage d'une production plus importante en comparaison à une bactérie

hétérofermentaire (Prückler *et al.*, 2015a). Le microorganisme doit être capable de trouver dans le milieu des conditions biotiques et abiotiques permettant son installation et son développement.

2.3.3. Voies métaboliques complémentaires

2.3.3.1. Voie du citrate

La voie du citrate conduit à la production de succinate, d'acide lactique, d'acide acétique, d'acétoïne, de 2,3-butanediol et d'éthanol, à partir d'acide citrique (Gänzle, 2015a). Les espèces *Lactobacillus* spp., *L. lactis*, *Leuconostoc* spp. et *Oenococcus oeni* sont décrites dans la littérature pour leur capacité à produire de l'acétoïne et de l'acide lactique, à travers cette voie métabolique. De plus, elle mène à la production de molécules aromatiques, telles que le diacétyle.

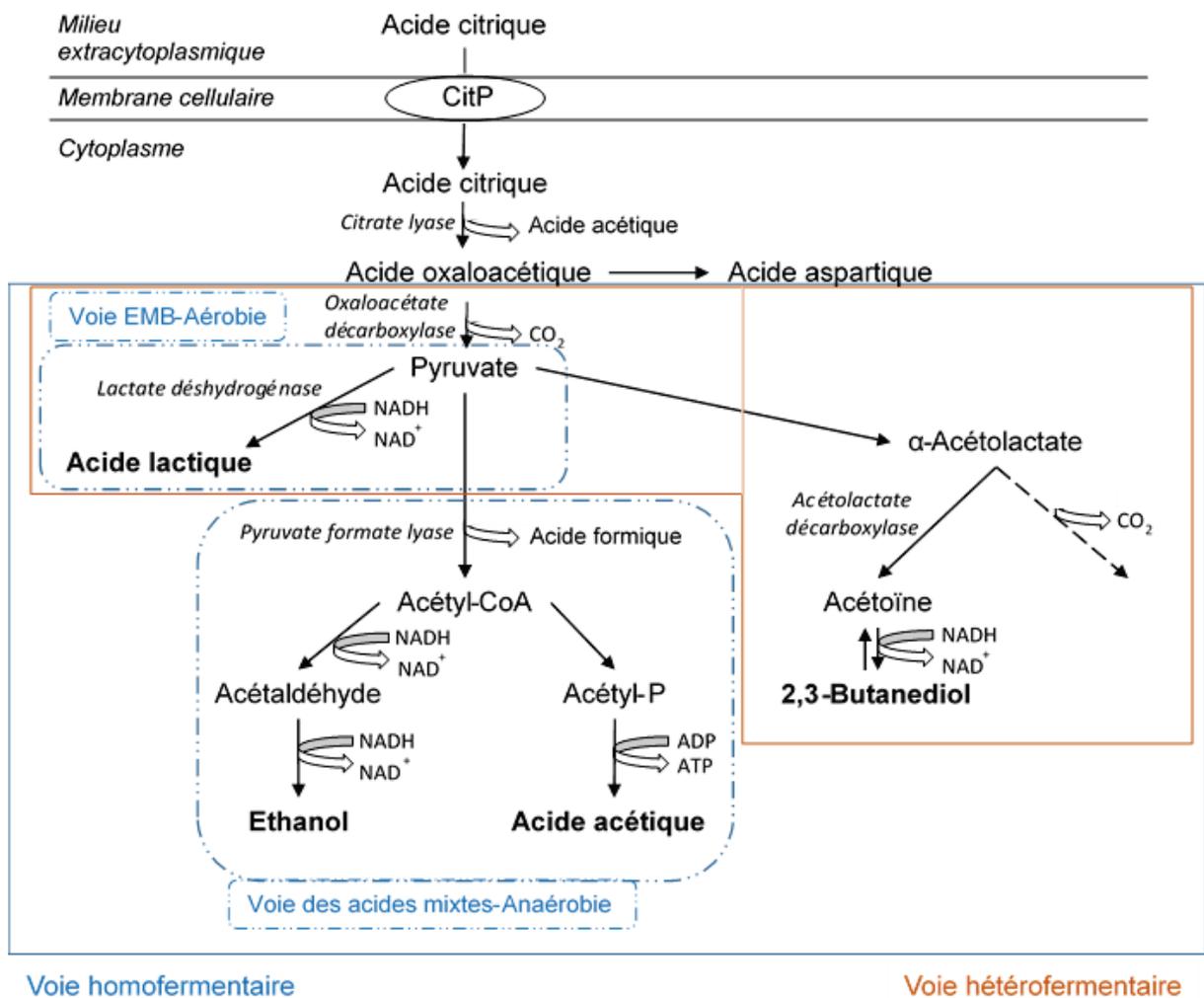


Figure 10 : Voie de dégradation de l'acide citrique chez les bactéries lactiques (d'après Drider et Prévost, 2009; Gänzle, 2015a; Gemelas *et al.*, 2014)

L'acide citrique est une source d'énergie pour les bactéries lactiques (Drider et Prévost, 2009; Gemelas *et al.*, 2014). Il est métabolisé au cours de processus anaérobies. La première étape passe par l'internalisation du citrate via un transporteur actif secondaire : la citrate perméase (CitP) (Figure 10). Les conditions d'entrée du citrate dans les cellules dépendent des genres microbiens étudiés. En effet, les gènes codant les enzymes réactionnelles impliquées sont plasmidiques, et leur régulation est dépendante des conditions physiologiques. Par exemple, chez *Lactococcus*, la citrate perméase fonctionne comme un antiport capable d'échanger l'acide lactique cytoplasmique en excès contre de l'acide citrique extracellulaire. L'acide lactique est issu du métabolisme du glucose. Le transport est favorisé en conditions acides. Dans le cytoplasme, l'acide citrique est clivé en acide oxaloacétique et en acide acétique par une citrate lyase. L'oxaloacétate subit alors une décarboxylation par l'oxaloacétate décarboxylase et forme du pyruvate. Au cours de cette réaction, une molécule de CO₂ est libérée. Ces deux enzymes sont codées par des gènes situés sur le chromosome bactérien.

Chez les microorganismes homofermentaires, tels que *L. lactis* subsp. *lactis*, le pyruvate peut ensuite être réduit en acide lactique. Cette réaction a lieu en conditions aérobies. En anaérobiose et à de faibles concentrations en sucres, la pyruvate formate lyase synthétise une molécule de formate et d'acétyl-CoA, à partir du pyruvate. La voie des acides mixtes permet alors de former de l'éthanol et de l'acide acétique. L'éthanol est obtenu grâce à l'action des enzymes : aldéhydes et alcools déshydrogénases. Elle permet la régénération de deux NAD⁺. La production d'acide acétique aboutit à la libération d'une molécule d'ATP, par action d'une acétate kinase.

Chez les bactéries hétérofermentaires, telles que *Leuconostoc* spp., le CO₂, l'acide lactique, l'acide acétique et l'éthanol sont produits via la voie des pentoses phosphates (Drider et Prévost, 2009; Gemelas *et al.*, 2014).

Les hétérofermentaires et les homofermentaires sont capables de produire des composés aromatiques en utilisant la voie de l'acide citrique (Bartowsky et Henschke, 2004). Ces réactions sont largement décrites lors de la fermentation des produits laitiers et sont également présentes au cours de la fermentation des végétaux. Le diacétyle peut être formé lors de l'ensilage, de la production de bière ou de vin. En œnologie, la production de diacétyle sera recherchée pour donner une typicité au vin. *O. oeni* peut synthétiser cette molécule, à des pH acides, lors de la fermentation malolactique. L'arôme associé au diacétyle est celui de beurre.

2.3.3.2. Métabolisme azoté

La croissance des LAB nécessite une ou plusieurs sources azotées. En effet, elles présentent un grand nombre d'auxotrophies (Drider et Prévost, 2009; Liu *et al.*, 2010; Savijoki *et al.*, 2006). Pour ces microorganismes, des sous-produits végétaux pauvres en nutriments ou ne fournissant pas les éléments nécessaires à la croissance seront un paramètre limitant à leur utilisation comme substrat. Par exemple, *L. lactis* est auxotrophe pour 7 à 12 acides aminés. La nutrition azotée comprend trois étapes : le catabolisme protéique extracellulaire, le transport des acides aminés et des peptides à l'intérieur de la cellule et le métabolisme intracellulaire.

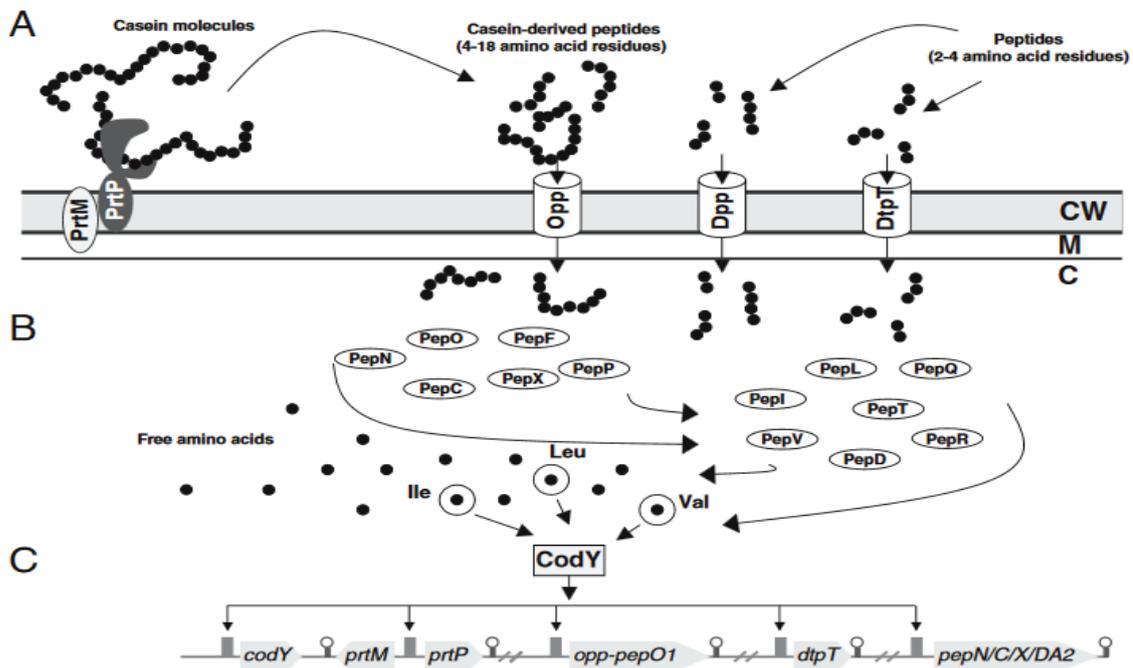


Figure 11 : Représentation des systèmes de transport (A), des peptidases intracellulaires (B) et de la régulation (C) du système protéolytique chez les bactéries lactiques (Savijoki *et al.*, 2006)

Dans un premier temps, la protéase de paroi (Prt) permet la dégradation de grandes molécules en oligopeptides (4 à 18 acides aminés) ou petits résidus aminés (2 à 4 acides aminés) (Drider et Prévost, 2009) (Figure 11). Elle est nommée PrtP chez *Lactococcus* par exemple. Les peptides obtenus peuvent entrer dans la cellule via des transporteurs de trois natures : des perméases à force protomotrice (DtpT), des ABC-transporteurs (Opp, Dpp) et des systèmes antiports. Le transporteur DtpT permet le passage de di ou tri-peptides hydrophiles. Les transporteurs Opp et Dpp internalisent respectivement des oligopeptides, et des di/tri/térapeptides hydrophobes. L'énergie nécessaire pour le fonctionnement des ABC-transporteurs provient de l'hydrolyse de l'ATP. L'ensemble de ces transporteurs est retrouvé chez de nombreuses espèces de *Lactobacillus* (*Lb. acidophilus*, *Lb. brevis*,

Lb. casei, *Lb. rhamnosus*). Les peptides internalisés sont pris en charge par des peptidases intracellulaires et sont dégradés en petits peptides et acides aminés libres. Parmi elles, les exopeptidases (PepC, PepN, PepM) sont capables de libérer les acides aminés situés aux extrémités, et préférentiellement l'extrémité N-terminale. Certaines sont dépendantes de la taille du peptide. Par exemple, PepV hydrolyse des dipeptides et génère deux acides aminés libres. D'autres sont acides aminés-spécifiques. PepA est une aminopeptidase libérant des acides aminés acides, tels que l'acide aspartique et l'acide glutamique. PepX et PepQ interviennent au niveau des liaisons peptidiques contenant une proline. La régulation des gènes intervenant dans la nutrition azotée (opéron *opp*) est assurée par le régulateur transcriptionnel négatif CodY. Des concentrations importantes en acides aminés hydrophobes favorisent la liaison du régulateur CodY à l'opéron *opp* (Savijoki *et al.*, 2006).

Les acides aminés libérés peuvent être utilisés pour produire de l'énergie, mais également pour la production de molécules aromatiques (Drider et Prévost, 2009). Elles sont de différentes natures : aldéhydes, acides, alcools ou hydroxyacides. Des réactions de transamination, par des aminotransférases, vont être à l'origine de la formation de céto-acides. Par exemple, les lactobacilles sont capables de produire de l'alpha-cétoglutarate, à partir de glutamate. Des estérases catalysent la production d'esters. Enfin, les chaînes latérales des acides aminés peuvent être éliminées. Certaines lyases transforment la méthionine en trois composés hautement aromatiques : l'alpha-cétobutyrate, l'ammoniac et le méthanethiol.

Les végétaux riches en protéines et composés accessibles pour les LAB du milieu seront favorables à la croissance de microorganismes auxotrophes et à l'expression du métabolisme azoté.

2.3.3.3. Métabolisme des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires issus des végétaux (Filannino *et al.*, 2018; Martins *et al.*, 2011). Ce sont des molécules composées de noyaux aromatiques et de groupements hydroxyles. Ils se répartissent dans les familles suivantes : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les xanthones, les stilbénoloïdes, les lipides phénoliques et les tannins. Certains composés phénoliques sont accessibles aux LAB. Les *Lactobacillus* sont résistants aux composés phénoliques. Les espèces capables de métaboliser ces molécules sont : *Lb. brevis*, *Lb. fermentum* et *Lb. plantarum*, par des réactions de décarboxylations ou de réductions. Ces composés phénoliques peuvent présenter des propriétés bénéfiques pour la santé humaine. Des essais de fermentation de jus de cerise, en présence de *Lb. plantarum*, ont mis en évidence la transformation de l'acide protocatéchique, de l'acide caféique et de l'acide paracoumarique ; en catéchol, en acide dihydrocaféique et en acide phlorétique (Filannino *et al.*, 2015).

2.3.3.4. Production d'exopolysaccharides

La production d'exopolysaccharides (EPS) chez les LAB permet la reconnaissance des cellules entre elles et l'échange de matériel génétique (Badel *et al.*, 2011; Zannini *et al.*, 2016). Ils jouent un rôle dans le « quorum-sensing » et permettent aux bactéries de lutter contre les stress environnementaux. Ces stress peuvent être liés au changement des paramètres physico-chimiques ou à la résistance face à des composés antimicrobiens. Les exopolysaccharides peuvent être de deux natures : homopolysaccharides ou hétéropolysaccharides. Les homopolysaccharides sont formés à partir d'un sucre (fructose ou glucose). Les enzymes intervenant dans le processus de synthèse sont des glycosyl hydrolases. Les EPS comprennent notamment les dextranes, les β -glucanes, les fructanes et les lévanes. Les hétéropolysaccharides ont des structures composées de monosaccharides (ex : glucose), de dérivés monosaccharidiques (ex : N-acétylglucosamine), et de sous-unités monosaccharidiques (ex : groupement acétyl). Trente espèces de LAB ont été identifiées pour leur production d'EPS dont : *Lb. casei*, *Lb. acidophilus*, *Lb. brevis*, *Lb. curvatus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. helveticus*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum* et *Lb. johnsonii*. Les exopolysaccharides ont donc un rôle environnemental en intervenant dans la communication cellulaire et le développement microbien. Ils peuvent aussi avoir des applications biotechnologiques intéressantes et être utilisés, par exemple, comme agents texturants, afin de modifier la viscosité et l'élasticité de produits alimentaires (Badel *et al.*, 2011).

2.3.3.5. Production de bactériocines

Les bactériocines sont produites par différents genres de bactéries lactiques : *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Streptococcus* (Alvarez-Sieiro *et al.*, 2016; Mokoena, 2017). Ce sont des peptides antimicrobiens synthétisés par voie ribosomique et inhibiteurs des bactéries à Gram positif. Les bactériocines sont à l'origine d'une perméabilisation des membranes cellulaires, par formation de pores. De plus, certaines empêchent la synthèse des parois en se liant au transporteur des sous-unités du peptidoglycane. Il existe trois classes de bactériocines. La première regroupe les peptides RiPPs (small Ribosomally Produced and Posttranslationally modified peptides), dont les lanthipeptides, et plus particulièrement la nisine. Avant d'être libérées dans le milieu extracellulaire, des modifications post-traductionnelles de ces bactériocines sont réalisées. La classe II est composée de petits peptides non modifiés, dont la sous-classe des pédiocines. Elles sont notamment décrites pour leur effet anti-*Listeria*. La classe III contient des bactériocines thermolabiles, de poids moléculaire supérieur à 10 kDa.

Au même titre que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, ou encore les composés antimicrobiens, les bactériocines régulent le développement microbien au sein d'un écosystème (O'Sullivan *et al.*, 2002). Des études se sont alors intéressées à expliquer les mécanismes mis en jeu

lors de l'inhibition microbienne, mais également à identifier des souches productrices de bactériocines, notamment contre des pathogènes alimentaires tels que *L. monocytogenes* (Cotter *et al.*, 2005; Gaggia *et al.*, 2011; Snyder et Worobo, 2014). De nombreuses souches bactériocinogènes ont été isolées de végétaux fermentés (Settanni et Corsetti, 2008).

2.3.4. Le genre *Lactobacillus*

2.3.4.1. Caractéristiques

Le genre *Lactobacillus* est classé dans le phylum des *Firmicutes*, la classe des *Bacilli*, l'ordre des *Lactobacillales* et la famille des *Lactobacillaceae*. Les *Lactobacillus* possèdent le statut de QPS (Qualified Presumption of Safety) et sont couramment utilisés lors de la transformation de produits alimentaires (Gänzle, 2015a). Les *Lactobacillus* sont des acteurs majeurs de la fermentation spontanée et sont identifiés dans la plupart de fermentations végétales.

La classification des *Lactobacillus* a évolué au cours des années, selon le critère de classification utilisé : caractéristiques phénotypiques (ex : isomères d'acide lactique produit ou profil métabolique) ou génomiques (ex : séquençage de l'ARNr 16S). Les profils fermentaires, définis pour les différentes espèces, classent les *Lactobacillus* selon trois groupes (Hammes et Hertel, 2006) :

- Groupe I : homofermentaires
- Groupe II : hétérofermentaires facultatifs
- Groupe III : hétérofermentaires obligatoires

Salveti *et al.* (2012), ont proposé une mise à jour de la classification des *Lactobacillus* sur la base du séquençage de l'ARNr 16S. Les 152 espèces identifiées sont réparties dans 15 groupes, incluant eux-mêmes trois espèces ou plus (Figure 12). Sept espèces de *Lactobacillus* comportent des sous-espèces. En considérant les caractéristiques phénotypiques, les auteurs ont mis en évidence une hétérogénéité au sein des groupes. En effet, les pourcentages de GC (GC%), les isomères d'acide lactique produits, le type de peptidoglycane et les profils métaboliques sont variables entre les espèces. Cette histoire évolutive complexe a pour origine des échanges génomiques, via des mécanismes de recombinaisons ou de transferts horizontaux.

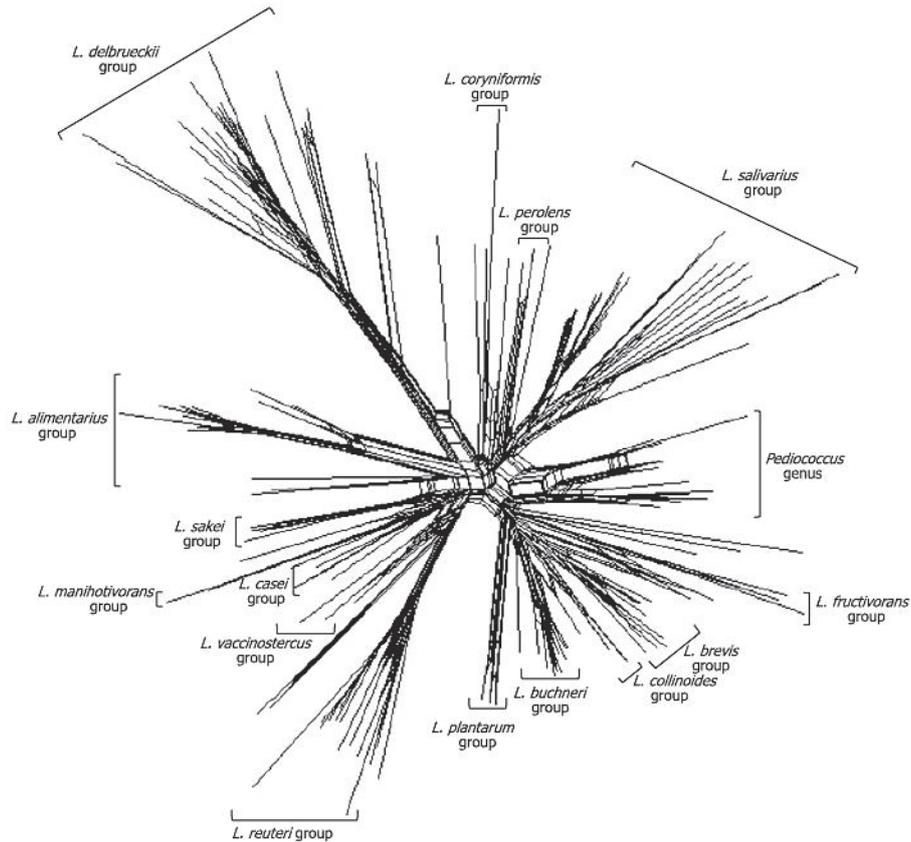


Figure 12 : Arbre phylogénétique des groupes de *Lactobacillus* et *Pediococcus* réalisé à partir des séquences d'ARNr 16S (Salveti et al., 2012)

2.3.4.2. Ubiquité du genre

Les *Lactobacillus* sont retrouvés au sein de niches écologiques diverses : les végétaux (ex : ensilage), les produits fermentés (ex : fruits, légumes, céréales, viandes ou produits laitiers) et les flores commensales des animaux (ex : estomac, intestins) (Gänzle, 2015a; Hammes et Hertel, 2006; Salveti et al., 2012). Ils peuvent également être associés à la dégradation des aliments.

Dans le cas des produits végétaux fermentés, les *Lactobacillus* de la flore naturelle participent à augmenter la conservation, les qualités nutritionnelles et les qualités organoleptiques des produits (Hammes et Hertel, 2006; Zagorec et Christieans, 2013). Par l'intermédiaire de la production de composés antimicrobiens (tels que les bactériocines), cette flore est capable d'entrer en compétition avec les flores pathogènes et de participer ainsi à préserver l'innocuité de produits alimentaires. Dans le cas de la choucroute, en fermentation spontanée, les microorganismes hétérofermentaires sont présents au cours de la première semaine de fermentation. Les paramètres physico-chimiques, agissant sur la croissance de ces bactéries sont notamment la température et la concentration en NaCl. Les espèces *Lb. sakei*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum* et *Lb. brevis* sont couramment identifiées. Dans un

second temps, les *Lactobacillus* homofermentaires, plus résistants aux conditions acides vont se développer. Des souches naturellement productrices de bactériocines, telles que *Lb. plantarum* L4, peuvent être ajoutées comme starter pour favoriser l'inhibition de pathogènes, tels que *Staphylococcus aureus* ou *Bacillus cereus*.

Certains *Lactobacillus* peuvent aussi présenter des propriétés probiotiques. Ils participent notamment à l'équilibre de la flore intestinale et à la bonne digestion des aliments. Les yaourts sont un exemple de produit fermenté contenant des probiotiques (Giraffa *et al.*, 2010). Les produits à base de fruits ou de légumes sont également favorables à la croissance des probiotiques, dans les jus de fruits par exemple (Rivera-Espinoza et Gallardo-Navarro, 2010). Les espèces *Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum*, *Lb. casei* et *Lb. delbrueckii*, sont capables de se développer dans du jus de tomates et de se maintenir dans des quantités supérieures à 10^6 UFC/ml après 4 jours, à 4°C (Yoon *et al.*, 2004).

Des souches de *Lactobacillus* directement isolées des végétaux peuvent modifier les propriétés organoleptiques (Di Cagno *et al.*, 2011). L'ajout de *Lb. plantarum* et de deux genres lactiques, *Pediococcus pentasaceus* et *Weissella cibaria*, a permis d'améliorer les critères de goût sucré, texture et qualité globale de smoothies fermentés.

Suivant l'environnement physico-chimique de fermentation, la diversité des espèces de *Lactobacillus* et leur fréquence peut être variable (Wouters *et al.*, 2013). Par exemple, lors de la fermentation spontanée de poireaux, les espèces *Lb. plantarum*, *Lb. parabrevis*, *Lb. brevis* et *Lb. sakei* ont majoritairement été identifiées. Les végétaux ont été récoltés en automne ou en hiver, et les milieux de fermentation ont été supplémentés à des concentrations variables en NaCl (1,5% ou 2,5%). En revanche, des différences ont pu être observées en fonction de la partie du végétal considérée (verte ou blanche). *Lb. sakei* était plus fréquent dans la partie blanche du poireau, après 7 jours de fermentation.

2.3.4.3. *Lactobacillus plantarum*

Lb. plantarum est une espèce fréquemment identifiée lors de la fermentation spontanée de végétaux (Di Cagno *et al.*, 2013; Gänzle, 2015a; Olstorp *et al.*, 2010; Wouters *et al.*, 2013). Par exemple, l'aptitude de *Lb. plantarum* à coloniser un écosystème a été observé lors de la fermentation spontanée d'olives (Zagorec et Christieans, 2013). Celle-ci est liée à la production de bactériocines. L'effet s'est avéré plus important lors de l'ajout de la bactérie à un taux de 10^7 UFC/ml et avec une quantité de NaCl de 4%. Lors de la fermentation spontanée d'un mélange de végétaux (tomates, carottes et choux-fleurs), *Lb. plantarum* était systématiquement identifié après 8 jours de fermentation, et pouvait être présent dès le début, lors de la fermentation de choux-fleurs (Wouters

et al., 2013a, 2013b). De plus, l'utilisation de la souche *Lb. plantarum* IMDO 788 comme starter a permis une diminution significative du pH après un jour de fermentation, passant de 6,54 à 3,87. Ceci est à l'origine d'une inhibition des flores d'altération et des flores pathogènes.

D'après la classification proposée par Salvetti *et al.* (2012), le groupe des *Lb. plantarum* comprend cinq espèces : *Lb. plantarum*, *Lb. paraplantarum*, *Lb. pentosus*, *Lb. fabifermentans* et *Lb. xiangfangensis*. *Lb. plantarum* possède un métabolisme carboné hétérofermentaire facultatif, et produit les isomères D et L de l'acide lactique. Le GC% varie entre 44 et 46% (Roissart, 1994; Salvetti *et al.*, 2012). La température optimale de croissance se situe entre 30 et 37°C. *Lb. plantarum* est retrouvé dans divers environnements : les produits alimentaires bruts, les produits fermentés, et les microbiotes humains (Bringel *et al.*, 2001; Hammes et Hertel, 2006).

La taille du génome de *Lb. plantarum* est de 3,3 Mb (Kleerebezem *et al.*, 2003; Siezen *et al.*, 2010). L'analyse par microarray de 20 souches a mis en évidence une hétérogénéité du génome au sein de l'espèce. Les échantillons issus du même produit fermenté sont rassemblés en clusters. D'un point de vue phénotypique, le cluster des souches ayant une origine végétale possède des caractéristiques communes, telles que l'utilisation du glucose ou du saccharose. Elles possèdent également la capacité de se développer dans des milieux dont la concentration en NaCl est de 6%. Des différences entre les souches peuvent être observées pour d'autres paramètres, comme l'utilisation du D-mannose ou la production de bactériocine (nisine). Enfin d'un point de vue génomique, le « core-génome » représente 70% des gènes. Les protéines nécessaires au métabolisme du tartrate sont présentes uniquement chez *Lb. plantarum*, parmi les LAB. Les régions variables identifiées au sein de l'espèce interviennent dans la synthèse des exopolysaccharides ou encore dans la production de bactériocine (plantaricine).

2.3.4.4. Spécificités de *Lactobacillus paracasei*

Lb. paracasei est une bactérie lactique anaérobie facultative ou microaérophile, acido-tolérante et homofermentaire pouvant se développer dans des environnements divers tels que le microbiote intestinal, ou les produits alimentaires (produits laitiers et végétaux) (Huang *et al.*, 2018; Sisto et Lavermicocca, 2012; Smokvina *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2016). Elle appartient au groupe des *Lactobacillus casei*, qui contient également les espèces *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus rhamnosus*, longtemps définies comme des sous-espèces (Figure 13, Huang *et al.*, 2018). La taille de son génome est compris entre 2,9 et 3,0 Mb (Smokvina *et al.*, 2013). L'analyse de séquences des « pan-génome » et « core-génome » montre un regroupement des souches selon leur origine de prélèvement (laitier, végétal ou autre). Cependant, ce regroupement n'est pas corrélé à la présence spécifique d'un gène ou d'un groupe de gènes. La présence des systèmes phosphotransférase et des transporteurs ABC,

pour le métabolisme des différents sucres, est variable en fonction des souches étudiées et ne semble pas dépendante de l'origine des souches. Les séquences mettent également en évidence quatre régions impliquées dans la synthèse d'exopolysaccharides principalement constitués de rhamnoses par *Lb. paracasei*.

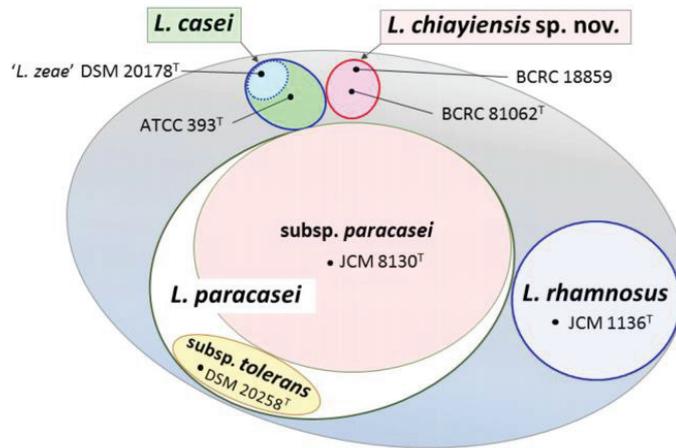


Figure 13 : Classification des espèces du groupe *Lactobacillus casei* (Huang et al., 2018)

L'espèce *Lb. paracasei* peut être utilisée pour la fermentation de chou et sa capacité à inhiber la croissance des microorganismes pathogènes via la production d'acides organiques (Zhao et al., 2016). Des essais comparant la fermentation spontanée de choux à la fermentation par une souche de *Lb. paracasei* ajoutée en excès, indiquent une production plus importante d'acide lactique au cours du temps. Les quantités obtenues étaient respectivement de l'ordre de 5 g/L et 7 g/L d'acide lactique produit, après 21 jours de fermentation. Zhao et al. (2016) ont également observé une quantité plus importante des acides aminés : thréonine, sérine, acide glutamique, tyrosine, phénylalanine, histidine et lysine, pour les essais ensemencés par *Lb. paracasei*.

Les bactéries lactiques sont des microorganismes ubiquitaires des végétaux. Les premières études ont notamment été initiées dans le but de comprendre et de caractériser leur rôle pour la conservation de denrées alimentaires. L'étude des fermentations spontanées a permis d'identifier la présence majoritaire de trois genres : *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Weissella*. Le genre *Lactobacillus* est aujourd'hui largement utilisé comme auxiliaire technologique pour ses propriétés de conservation (ex : production d'acides organiques ou de bactériocines), et d'amélioration des qualités organoleptiques (ex : production d'arômes ou d'agents texturants). Leurs capacités à produire des molécules d'intérêt à partir de végétaux permet d'envisager leur utilisation pour la fermentation de déchets végétaux.

Chapitre 3

Démarche expérimentale

Ce chapitre a pour objectif de présenter la démarche expérimentale mise en place pour répondre aux questions de recherche posées (Cf. chapitre 1). Il justifiera également les méthodes utilisées pour la réalisation des essais expérimentaux. Les matériels utilisés seront présentés en introduction des chapitres de résultats, dans lesquels ils sont utilisés, afin de faciliter la lecture du manuscrit.

3. Démarche expérimentale

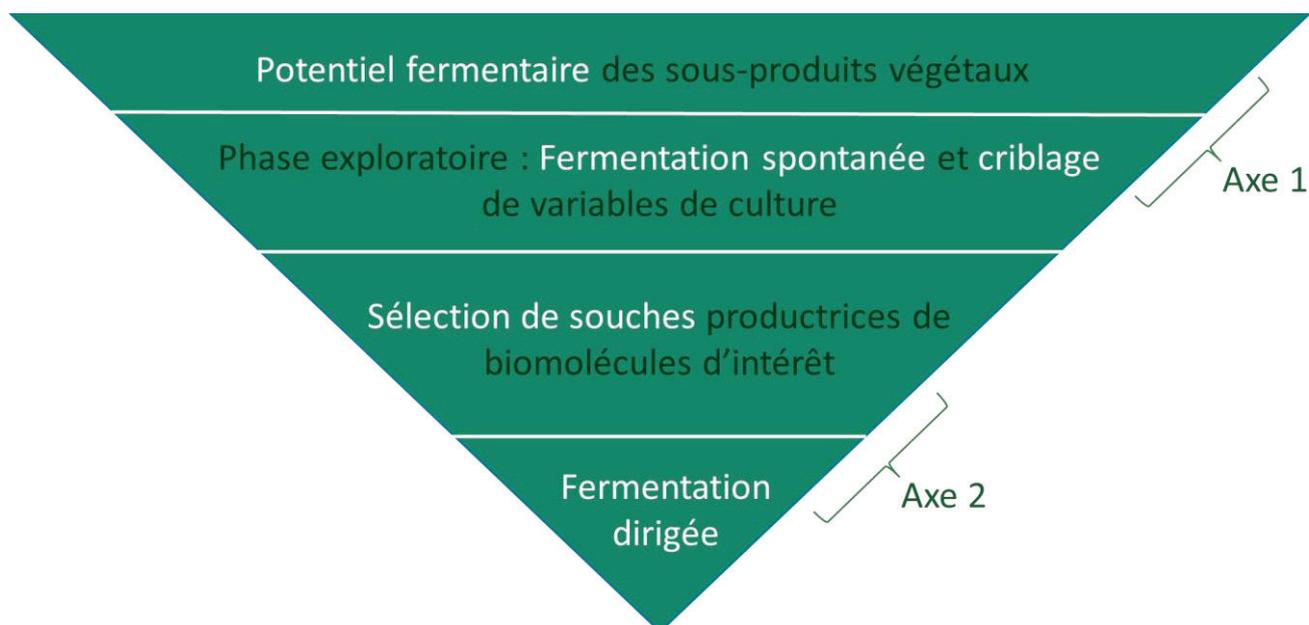


Figure 14 : Démarche expérimentale menée pour la valorisation du sous-produit de pulpe de carottes

La démarche générale des expérimentations réalisées est décrite sur la Figure 14. Une première phase exploratoire a permis d'évaluer le potentiel fermentaire de cinq sous-produits végétaux (pulpe de carottes, son de blé, levain de germe de blé, peau de pommes et épluchures de salades) dans le but de sélectionner une matrice modèle. Dans un second temps, des fermentations spontanées ont été réalisées à partir de pulpe de carottes, selon un plan expérimental factoriel. Il s'agissait d'évaluer l'influence de différents paramètres physico-chimiques (température, pH...) sur l'évolution biochimique et microbiologique de la pulpe de carottes. Les paramètres semblant influencer l'évolution des fermentations ont été testés sur les cinq matrices de l'étude. Enfin, un plan D-optimal a été construit afin de maximiser la production d'acide lactique.

3.1. Axe 1 : évaluation du potentiel fermentaire des sous-produits

Le potentiel fermentaire des cinq matrices crues était évalué. Les paramètres physico-chimiques : extrait sec, a_w , pH et acidité titrable, ont été mesurés. La teneur en différentes fractions azotées (azote total (NT), azote soluble dans l'eau (NS) et azote soluble dans l'acide phosphotungstique (NPT)). Enfin, les flores microbiennes suivantes étaient dénombrées : les *Lactobacillus*, les *Enterococcus*, la Flore Mésophile Aérobie Revivifiable (FMAR), la flore lactique mésophile (FLM), les bactéries acétiques, les levures et les moisissures, la flore totale et les *Enterobacteriaceae*. A l'exception des levures et des

moisissures, la sélectivité des milieux de culture utilisés étant faible, il est admis que les flores bactériennes retrouvées seront présumées. Dans un second temps, des fermentations spontanées ont été réalisées à température ambiante et pendant huit jours consécutifs. Le pH, l'acidité titrable totale (ATT) et les mêmes flores microbiennes ont été suivis.

3.2. Axe 1 : fermentation spontanée des sous-produits

Les conditions de culture relatives à la fermentation de la matrice modèle, la pulpe de carottes, sont présentées au chapitre 5 de ce document et font l'objet du premier article publié dans le cadre de ce travail. Les essais de fermentation ont été réalisés selon un plan d'expérience factoriel complet à deux niveaux. Les variables : broyage, température d'incubation, pourcentage en eau ajouté (p/p) et le nombre de rafraîchis, ont été testées. Ce type de plan d'expérience permet de tester plusieurs variables de culture, à différents niveaux, et d'observer des effets significativement positifs ou négatifs sur les réponses mesurées. Il permet également de mettre en avant des interactions entre les variables. Il est utilisé ici dans le but de cribler des facteurs (ou variables) pouvant augmenter la production de molécules d'intérêt.

Les méthodes détaillées dans ce paragraphe font référence aux résultats présentés dans le chapitre 5. Les résultats obtenus à partir de la fermentation de la pulpe de carottes ont été traités par Analyse en Composante Principale (ACP). Les vecteurs propres ont eux-mêmes été analysés par Classification Ascendante Hiérarchique (CAH). Pour chaque classe obtenue par CHA, les conditions de culture ont été déterminées par dénombrement des variables les plus fréquentes. Par exemple, si pour une classe de cinq individus, trois étaient incubés à 24°C, cette température a été conservée. Le Tableau 2 présente le plan d'expérience ainsi construit pour les cinq matrices. Des échantillons ont été prélevés à J0, J+1, J+2, J+3, J+7 et J+9 ; et des mesures de pH et d'ATT ont été effectuées. Les taux microbiens ont été déterminés au début de la fermentation et après 9 jours d'incubation.

Tableau 2 : Plan d'expérience développé pour l'étude de la fermentation spontanée de cinq sous-produits végétaux (n=1). Quatre variables d'incubation ont été testées : le broyage, la température, le pourcentage d'eau ajouté et le nombre de rafraîchis.

Code expérience	Sous-produit	Broyage	Température d'incubation (°C)	Pourcentage d'eau ajouté (p/p)	Nombre de rafraîchis
E1L	Levain de germe de blé	Sans	30,5	25	1
E2L	Levain de germe de blé	Avec	24	50	0
E3L	Levain de germe de blé	Sans	37	50	2
E4L	Levain de germe de blé	Avec	37	0	0
E1B	Son de blé	Sans	30,5	75	1
E2B	Son de blé	Avec	24	90	0
E3B	Son de blé	Sans	37	90	2
E4B	Son de blé	Avec	37	50	0
E1S	Epluchures de salades	Sans	30,5	25	1
E2S	Epluchures de salades	Avec	24	50	0
E3S	Epluchures de salades	Sans	37	50	2
E4S	Epluchures de salades	Avec	37	0	0
E1C	Pulpe de carottes	Sans	30,5	25	1
E2C	Pulpe de carottes	Avec	24	50	0
E3C	Pulpe de carottes	Sans	37	50	2
E4C	Pulpe de carottes	Avec	37	0	0
E1P	Peau de pommes	Sans	30,5	25	1
E2P	Peau de pommes	Avec	24	50	0
E3P	Peau de pommes	Sans	37	50	2
E4P	Peau de pommes	Avec	37	0	0

3.3. Axe 2 : optimisation de la production d'acide lactique

Afin de maximiser la production d'acide lactique, une bactérie lactique issue directement de la pulpe de carottes fermentée a été sélectionnée. Les surnageants des fermentations E1 et E3 (cf. chapitre 5, conservés dans du glycérol (15% final) à -80°C et décongelés pendant 5 min, ont été ensemencés sur milieu MRS, à 30°C, en condition anaérobie. Des colonies présentant différents morphotypes ont été isolées et conservées dans du glycérol (15%) à -80°C. Les isolats identifiés comme étant des *Lactobacillus* par séquençage de l'ADNr 16s ont été conservés. Leur capacité à produire de l'acide lactique a été criblée en milieu « MRS-modifié » et en milieu « carotte-like ». La composition des milieux est décrite dans le chapitre 6. A partir d'une culture d'une nuit en MRS, des suspensions bactériennes ont été ajustées à une densité optique (600 nm) de 0,5 pour le criblage en milieu « MRS-like » et une densité optique de 1 pour le milieu « carotte-like ». Dans des microplaques de 96 puits, 20 µL de suspension bactérienne ont été mélangés avec 180 µL de milieu « MRS-modifié » ou « carotte-like ». Après incubation, les souches capables d'acidifier le milieu « MRS-modifié » et le

Chapitre 3 : Démarche expérimentale

milieu « carotte-like » ont été retenues. Cette acidification s’est traduite par une variation du vert de bromocrésol du vert au jaune. Les quantités d’acides organiques (acide D/L-lactique, acétique et citrique) ont été déterminées après incubation des souches à l’étude en milieu « MRS-modifié » ou en milieu « carotte-like ». Le pH et l’ATT ont également été mesurés. Les essais ont été répétés trois fois. Les profils d’utilisation des substrats carbonés en galeries API 50 CHL ont été déterminés pour les souches capables de produire les quantités d’acide lactique les plus importantes. Les essais pour l’optimisation de la production d’acide lactique ont été menés selon un plan d’optimisation D-optimal, en 21 essais (Tableau 3). Les plans d’expérience D-optimaux sont utilisés dans le but de tester plusieurs variables de culture, à plusieurs niveaux, en réduisant le nombre d’essais réalisés, et en déterminant les conditions optimales de production.

Tableau 3 : Plan d'expérience D-optimal pour la production d'acide lactique, à partir de pulpe de carottes fermentée, par une souche de *Lactobacillus paracasei* (n=1). Quatre variables d'incubation ont été testées : la température, le volume de solution enzymatique (Protéase (0,5 U/mL) et Hémicellulase (1,5 U/mL)), le taux de *Lb. paracasei* A1L ajouté et le pH initial.

Code expérience	Température d'incubation (°C)	Volume solution enzymatique (mL)	<i>Lactobacillus paracasei</i> A1L (UFC/mL)	pH initial
N1	25	0	0	6
N2	30	0	0	4
N3	20	0,5	0	4
N4	30	0,5	0	8
N5	20	1	0	8
N6	25	1	0	4
N7	30	1	0	6
N8	20	0	1,00E+06	4
N9	20	0	1,00E+06	8
N10	30	0	1,00E+06	8
N11	30	0,5	1,00E+06	4
N12	20	1	1,00E+06	6
N13	25	1	1,00E+06	8
N14	20	0	1,00E+08	4
N15	20	0	1,00E+08	8
N16	30	0	1,00E+08	4
N17	30	0	1,00E+08	8
N18	25	0,5	1,00E+08	6
N19	20	1	1,00E+08	4
N20	20	1	1,00E+08	8
N21	30	1	1,00E+08	4
N22	30	1	1,00E+08	8
N23	25	0,5	1,00E+06	6
N24	25	0,5	1,00E+06	6
N25	25	0,5	1,00E+06	6

Quatre variables ont été testées : la température, l'ajout d'enzymes, le taux de *Lb. paracasei* ajouté et le pH initial. La solution enzymatique était constituée de 1 mg/mL de protéase 500 U/g (Protease from *Aspergillus oryzae*, Sigma) et 1 mg/mL d'hémicellulase 150 U/g (Hemicellulase from *Aspergillus niger*, Sigma). Le plan comprenait trois répétitions au centre du domaine, comme pour les plans précédents. Les essais ont été réalisés en erlenmeyer de 500 mL contenant 250 g de pulpe de carottes et 50 g d'eau physiologique.

3.4. Analyses statistiques

Excepté pour les analyses des résultats spécifiques aux articles scientifiques publiés, les analyses statistiques des données ont été réalisées à l'aide du logiciel Xlstat (version 2019.3.2) et du logiciel R (Version 1.2.5001).

Chapitre 4

Potentiel fermentaire des sous-produits végétaux

L'objectif de cette première partie de résultats était d'évaluer le potentiel fermentescible des cinq sous-produits végétaux, dans le but de les utiliser comme substrat pour la production de métabolites d'intérêt via des processus de fermentation. Les biotopes ont été caractérisés selon des critères biochimiques et physico-chimiques. En parallèle, les communautés microbiennes, à l'origine des métabolismes étudiés, ont été recherchées.

4. Potentiel fermentaire des sous-produits végétaux

Au début de l'étude, cinq sous-produits de nature différente étaient à disposition : des épiluchures de pommes (essentiellement constituées de peau), de la pulpe de carottes, du levain de germe de blé, des épiluchures de salades et du son de blé. L'objectif initial était de valoriser ces matières via des processus de fermentation et de produire des métabolites d'intérêt. D'après les éléments apportés par la bibliographie, la fermentation spontanée lactique est fréquente et elle est réalisée par les bactéries lactiques, majoritaires dans les premiers jours d'incubation. Les cinq sous-produits considérés étaient donc différents et ont été obtenus selon des processus de transformation différents pouvant entraîner des modifications de leurs caractéristiques biochimiques et microbiologiques. Les premières questions soulevées étaient donc :

- Quelles différences et quels points communs pouvaient être identifiés entre les cinq sous-produits bruts ?
- Quels paramètres de culture étaient limitants pour la fermentation ?
- Quel était le potentiel fermentaire des matrices végétales ?

Pour répondre à ces problématiques, une étape préliminaire de caractérisation des cinq matrices végétales a été entreprise. Les paramètres physico-chimiques pH, extrait sec et activité de l'eau (a_w) ont été déterminés. Les communautés microbiennes viables cultivables généralement retrouvées à la surface des végétaux ont également été recherchées sur les sous-produits bruts. Afin d'identifier les paramètres limitant la fermentation spontanée des produits végétaux étudiés, des fermentations ont été suivies à température ambiante, pendant 8 jours consécutifs. Le pH et l'acidité titrable totale ont été mesurés, ainsi que les populations cultivables de différentes communautés microbiennes.

4.1. Matériels et méthodes analytiques

4.1.1. Matières premières

Les sous-produits de carottes (nommés : « pulpe de carottes ») ont été fournis par l'entreprise Pierre Martinet à partir de la production de carottes râpées. Ils étaient composés de la peau, des extrémités ôtées et pouvaient contenir des fanes. Le produit final de pulpe de carottes, était composé d'une phase fibreuse solide et d'une phase liquide. Les produits ont été transportés en camion réfrigéré du site de production situé dans le département du Loiret vers le site de production de Lyon. Les échantillons ont été stockés au froid pendant 48 h maximum avant d'être utilisés ou congelés à -20°C.

Les sous-produits de la fabrication de compote de pomme (nommés « peau de pommes ») provenaient de l'entreprise Charles et Alice. Ils étaient constitués de la peau, des pépins et des queues. Plusieurs variétés de pommes sont utilisées par l'entreprise lors des processus de transformation. Les sous-produits ont été transportés en camion réfrigéré, stockés à 4°C pendant 48 h au maximum.

Les sous-produits de levain (nommés « levain de germe de blé ») ont été obtenus après déshydratation sur rouleau d'un levain industriel de germe de blé, par chauffage à 200°C, pendant 30 secondes maximum. Ils provenaient de l'entreprise Philibert Savours. Les produits ont été stockés à 4°C pendant 48 h au maximum.

Les sous-produits de blé (nommés « son de blé ») provenaient de l'entreprise Panzani. Ils se composent des enveloppes des grains de blé séparées lors du remoulage. Les enveloppes sont séparées de l'amande qui donne le produit principal, la semoule de blé ou son de blé. Les sous-produits ont été envoyés par la poste et stockés à 4°C.

L'entreprise Florette génère des sous-produits (nommés « épluchures de salades ») lors du parage des salades et de leur conditionnement. Les sous-produits sont surtout constitués des feuilles externes abimées. Plusieurs cultivars sont utilisés. Les sous-produits végétaux ont été envoyés par voie postale, dans des contenants en polystyrène, contenant eux-mêmes des blocs froids. A réception au laboratoire ils ont été stockés à 4°C.

4.1.2. Paramètres physico-chimiques

4.1.2.1. pH et acidité titrable

Les valeurs de pH ont été déterminées à l'aide d'un pH mètre (HI 2211, pH/ORP Meter, Hanna Instruments). L'acidité titrable est mesurée par le volume de soude versé (0,1 N), nécessaire pour atteindre un pH de 8,5. Ces deux paramètres ont été mesurés à partir de 10 mL de surnageant (Rizzello *et al.*, 2018).

4.1.2.2. A_w et extrait sec

Le pourcentage d'extrait sec a été mesuré à partir de 5 g de sous-produit à l'aide d'un dessiccateur (Mettler Toledo, HR73 Halogen Moisture Analyzer) à une température de 103°C. L' a_w a été déterminée par un a_w -mètre (a_w Sprint, TH-500, Novasina). Les mesures étaient répétées trois fois.

4.1.2.3. Analyse des fractions azotées

Les phases liquide et solide de la pulpe de carottes ont été séparées par centrifugation à 7 800 xg pendant 5 min. La phase solide correspondait au culot et la phase liquide au surnageant. Pour les autres matrices, la phase liquide a été obtenue à partir de 5 g de produit (qsp 40 g d'eau

déminéralisée stérile). L'ensemble a été mélangé 1 min (Vortex), puis centrifugé à 7 800 xg pendant 5 min. Le culot était repris dans de l'eau UHQ stérile (qsp 40 g). Le mélange a été broyé à l'aide d'un broyeur à turbine de type Ultraturrax, pendant 3 min, à 140 xg. Les surnageants (NS) obtenus ont été stockés à -20°C jusqu'à analyse.

Un volume de 10 mL de chaque phase a été mélangé à 7 mL d' H_2SO_4 (3,95 M) et 3 mL d'acide phosphotungstique (33%). Après une nuit à 4°C, le mélange a été centrifugé à 5 460 xg pendant 5 min. Le surnageant correspondait à la fraction d'azote soluble dans l'acide phosphotungstique. Il a été conservé à -20°C (NPT).

Les fractions d'azote total (NT), d'azote soluble dans l'eau (NS) et d'azote soluble dans l'acide phosphotungstique (NPT) ont été déterminées à partir de 0,2 g de sous-produit, 5 mL et 2 mL de fraction. Le dosage de l'azote a été réalisé par la méthode de Kjeldahl.

4.1.3. Identification et dénombrement des micro-organismes

La flore des *Lactobacillus* présumés a été dénombrée sur milieu gélosé de Man-Rogosa-Sharpe (MRS), supplémenté en pimaricine (0,1 g/L, Sacco System). Les géloses ont été incubées en condition anaérobie. La Flore Lactique Mésophile (FLM) recherchée sur milieu M17, supplémenté en pimaricine (0,1 g/L) et en acide nalidixique (0,04 g/L, Merck KGaA). Ces deux milieux (MRS et M17) étaient incubés à 30°C, pendant 48 à 72 h. Le milieu utilisé pour le dénombrement des bactéries acétiques était composé pour un litre de : peptone bactériologique (10 g, Oxoid), extrait de levure (3 g), acide lactique (6,3 g, Prolabo), éthanol (5 g), acide acétique (3 g, AppliChem GmbH), glucose (1 g), sorbitol (1 g), mannitol (1 g), hydrogénophosphate de potassium (1 g), déoxycholate de sodium (0,1 g), sulfate de magnésium, 7 H₂O (20 mg), pourpre de bromocrésol (30 mg), pimaricine (0,1 g) et d'agar (18 g) (Sigma) (Papalexandratou *et al.*, 2013). Le pH du milieu a été ajusté à 4,5 et les géloses incubées pendant 10 jours à 30°C. Les *Enterobacteriaceae* ont été dénombrées sur milieu Violet-Red-Bile-Glucose (VRBG) après 24 h d'incubation à 37°C. Les surnageants étaient dilués et ensemencés en masse (1 mL).

Les *Pseudomonas* ont été dénombrées sur le milieu Cephalosporin-Fucidin-Cetrimide (CFC), incubé à 22°C pendant 72 h. Le milieu gélosé Bile-Esculine-Azide a permis de dénombrer les *Enterococcus*, après une incubation à 37°C pendant 24 à 48 h. Les levures et les moisissures ont été recherchées sur milieu Chloramphenicol-Glucose-Agar (CGA), après 5 jours d'incubation à 25°C. Pour ces milieux, un volume de 0,1 mL a été ensemencé en surface.

A l'exception de la flore acétique, les milieux utilisés provenaient de la société Biokar Diagnostics.

A partir des géloses contenant entre 50 et 500 colonies, les colonies en surface ont été prélevées dans 2 mL d'eau physiologique et stockées à -20°C.

4.2. Résultats

4.2.1. Caractérisation des sous-produits végétaux

4.2.1.1. Caractérisation physico-chimique des matrices végétales

Les paramètres a_w et extrait sec mesurés pour l'ensemble des sous-produits sont répertoriés dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Caractéristiques physicochimiques et biochimiques des sous-produits végétaux bruts. Les valeurs de pH et d'acidité titrable correspondent à des mesures uniques. La teneur en azote (NT) correspond à la moyenne de deux mesures (0,2 g de sous-produit) à partir d'un même lot de sous-produits. Les valeurs d' a_w et de teneur en matière sèche représentent la moyenne +/- l'écart-type (n-1) de trois mesures réalisées sur un même batch de sous-produits.

Matrices	a_w (25°C)	Teneur en matière sèche (g/100g)	pH	Acidité titrable (g équivalent acide lactique/L de surnageant)	NT (Teneur en matières azotées totales N x 6,25 g/100 g de sous-produit)
Pulpe de carottes	0,987 +/- 0,003	7,95 +/- 0,11	5,62	0,7	1,40
Peau de pommes	0,957 +/- 0,001	28,09 +/- 1,45	4,04	3,0	4,20
Levain de germe de blé	0,953 +/- 0,001	36,91 +/- 0,72	3,41	14,5	11,38
Son de blé	0,809 +/- 0,002	82,87 +/- 0,04	6,69	2,0	17,59
Epluchures de salades	0,994 +/- 0,001	6,56 +/- 0,64	6,87	0,8	2,10

Les résultats indiquaient des valeurs d' a_w supérieures à 0,95, à 25°C, pour les matrices à base de pulpe de carottes, d'épluchures de pommes, de levain de farine de germe de blé et les sous-produits de parage de salade verte. Le son de blé présentait des valeurs d' a_w de l'ordre de 0,8. La carotte et la salade étaient les sous-produits aux pourcentages d'extrait sec les plus faibles : 6,6 et 7,9 g/100 g. Les matrices à base de sous-produits de compote de pomme et de levain de germe de blé avaient des taux d'extrait sec intermédiaires, respectivement égaux à 28 et 37%. A titre de comparaison, des essais menés par Marti *et al.* (2014) ont obtenu des teneurs en matière sèche pour un levain de germe de blé fermenté de 66,9 g/100 g, et pour un levain stabilisé thermiquement à 190°C pendant 60s de 94,8 g/100 g. Pour ces deux produits les valeurs d' a_w étaient respectivement de 0,970 et 0,405. Les

sous-produits étudiés ici contiennent des quantités d'eau plus faibles. Le traitement thermique appliqué est proche de celui de l'étude citée et est de 200°C pendant 30s. Enfin, le son de blé présentait un pourcentage d'extrait sec élevé, de 83 %. Les valeurs d' a_w étaient en accord avec les valeurs d'extrait sec pour l'ensemble des sous-produits. Dépendamment des métabolites dont on souhaite optimiser la production, sans ajout d'eau au milieu, l' a_w et la valeur d'extrait sec du son de blé brut ne semblent pas favorables à un développement microbien optimal et favoriser les voies métaboliques telles que la fermentation lactique.

Parmi les cinq matrices, le pH de la pulpe de carottes, des sous-produits de la compote de pomme et du levain de germe de blé étaient acides - entre 3,4 et 5,6. Le son de blé et les épluchures de salades présentaient des pH proches de la neutralité, respectivement de 6,7 et 6,9. L'acidité titrable totale était maximale pour le levain de germe de blé, le sous-produit le plus acide, avec une quantité équivalente d'acide lactique de 14,5 g/L. Les autres valeurs, dépendantes de la matrice, variaient entre 0,7 et 3,0 g d'acide lactique/L de surnageant. Les valeurs de pH les plus acides correspondent aux quantités d'acide lactique les plus importantes et résultent d'une fermentation en amont de la réception des sous-produits.

Tableau 5 : Dosage des fractions azotées solubles dans l'eau (NS) et dans l'acide phosphotungstique (NPT) des sous-produits végétaux bruts. Les teneurs en azote NS et NPT correspondent à la moyenne de deux mesures (5 g d'extrait) à partir d'un même lot de sous-produits. Les valeurs ND sont des valeurs non déterminées.

		NS (Teneur en matières azotées solubles dans l'eau N x 6,25 g/100 mL de phase)	NPT (Teneur en matières azotées solubles dans l'acide phosphotungstique N x 6,25 g/100 mL de phase)	Rapport NPT/NS (%)
Phase liquide	Pulpe de carottes	0,16	0,04	26%
	Peau de pommes	0,02	0,03	ND
	Levain de germe de blé	0,89	0,09	10%
	Son de blé	0,55	0,05	10%
	Epluchures de salades	0,05	0,14	ND
Phase solide	Pulpe de carottes	0,04	0,04	100%
	Peau de pommes	0,05	0,02	43%
	Levain de germe de blé	0,28	0,04	15%
	Son de blé	0,33	0,04	11%
	Epluchures de salades	0,04	0,05	ND

D'après les dosages d'azote total, l'ensemble des sous-produits végétaux constituent une source protéique pour la croissance microbienne, dans des quantités variables comprises entre 1,4 et 17,6 g de matières azotées (N x 6,25)/100 g de sous-produit. Les valeurs mesurées sont du même ordre de grandeur que celles obtenues lors d'une étude de Tokoro *et al.* (1987), pour laquelle les quantités d'azote total de végétaux destinés à la production d'aliments fermentés allaient de 0,64 à 2,55 g d'azote (N x 6,25)/100 g de végétaux (valeurs respectives du radis et des épinards). Pour la plupart des végétaux étudiés la fraction majoritaire était l'azote dit non protéique, soluble dans l'acide trichloroacétique ; et la fraction minoritaire était constituée des acides aminés libres. Dans les cas des sous-produits végétaux, les quantités d'azote total (NT) des sous-produits issus de céréales (le son blé et le levain de germe de blé) étaient plus importantes avec des taux de protéines brutes (N x 6,25) de 17,6 et 11,4 g/100 g de sous-produit (Tableau 5). D'après les taux de protéines brutes (N x 6,25, en gramme pour 100 g de produit) référencés dans les tables Ciquel de l'ANSES, les taux mesurés pour les sous-produits sont plus faibles que les taux référencés pour les végétaux bruts et non transformés (Anses, 2017). Les quantités protéiques pour le « son de blé » et le « germe de blé » étant respectivement de 15,2 et 29,2 g/100 g de produit. Dans le cas du levain de germe de blé, la quantité de protéines (N x 6,25) cinq fois plus faible que pour le produit brut, pourrait s'expliquer par la fermentation préalable du germe de blé et la consommation des ressources azotées par les microorganismes fermentaires lors de la production de levain. Bien que les quantités d'azote total soient plus faibles pour les sous-produits de pomme, carotte et salade, elles sont du même ordre de grandeur que les quantités mesurées pour les produits bruts. Leur utilisation pour la production d'aliments fermentés, de façon spontanée, sans l'ajout de microorganismes, laisse supposer que les ressources en azote sont disponibles pour la réalisation de la fermentation et la croissance des microorganismes. Les valeurs de référence de l'Anses indiquent une quantité de protéines pour la pomme crue (considérant la pulpe et la peau) comprise entre 0,25 g/100 g et 0,4 g/100 g en fonction de la variété (pommes Golden et Canada), soit une quantité jusqu'à dix fois moins importante que celle obtenue pour le sous-produit de peau de pommes de 4,2 (N x 6,25) g/100 g (Anses, 2017). Enfin, les données pour la pulpe de carottes (N x 6,25 = 1,4 g/100 g) et les épluchures de salades (N x 6,25 = 2,1 g/100 g) sont en moyenne deux fois plus élevées avec des valeurs de référence pour la carotte crue de 0,77 (N x 6,25) g/100 g, et pour la salade verte, crue, sans assaisonnement de 1,01 (N x 6,25) g/100 g (Anses, 2017). Elles sont également en accord avec les valeurs mesurées par Tokoro *et al.* (1987). Le dosage des différentes fractions azotées telles que la fraction protéique, non protéique ou encore des acides aminés libres permet d'estimer la quantité d'azote directement mobilisable par les microorganismes fermentaires.

Au cours de l'étude, les quantités d'azote soluble dans l'eau et dans l'acide phosphotungstique ont été estimées. Elles sont respectivement constituées de polypeptides solubles dans l'eau dont le poids moléculaire est inférieur à 10 000 Da et d'acides aminés libres et de petits peptides, et sont donc présentes dans la phase aqueuse, qui correspond au surnageant de dilution des matrices. L'azote soluble dans l'acide phosphotungstique correspond à des composés de poids moléculaire inférieur à 600 Da (acides aminés libres et oligopeptides de moins de 5 à 6 acides aminés). L'augmentation au cours d'une fermentation de l'azote soluble est ainsi couramment reliée à la protéolyse primaire, c'est-à-dire l'hydrolyse des protéines insolubles dans l'eau en gros fragments solubles dans l'eau. L'augmentation de la quantité d'azote soluble dans l'acide phosphotungstique est quant à elle reliée à la protéolyse secondaire, c'est-à-dire la dégradation de gros fragments peptidiques en plus petits fragments voire même en acides aminés libres. La quantité d'azote soluble dans l'acide phosphotungstique (NPT) est aussi une information précieuse pour avoir une estimation de la teneur en facteurs de croissance azotés pour des micro-organismes, dont les bactéries lactiques, relativement exigeants vis à vis de ces facteurs de croissance. Ainsi, d'après les résultats obtenus, la fraction azotée soluble dans l'eau (NS), assimilée aux polypeptides, était plus élevée pour les deux sous-produits de blé avec des valeurs supérieures à 0,3 (N x 6,25) g/100 mL, dans la phase solide et dans la phase liquide (Tableau 5). Bien que la pulpe de carottes présente la plus faible quantité d'azote total dans la phase liquide, supposée directement accessible aux microorganismes, la matière azotée soluble dans l'eau est intermédiaire comparativement aux autres sous-produits, et égale à 0,16 (N x 6,25) g/100 mL. Les sous-produits issus de peau de pommes et d'épluchures de salades contiennent les plus faibles quantités de protéines solubles dans l'eau.

La fraction de matière azotée soluble dans l'acide phosphotungstique indique les quantités d'azote mobilisables sous forme de petits peptides et acides aminés libres. Elle renseigne sur la capacité des différents substrats à répondre aux auxotrophies éventuelles des microorganismes. Contrairement à ce qui a été observé pour la fraction de matière azotée soluble dans l'eau, les sous-produits d'épluchures de salades semblent être les plus riches en azote soluble dans l'acide phosphotungstique avec 0,14 (N x 6,25) g/100 mL. Considérant les rapports NPT/NS et la fraction liquide, 10 % de l'azote se trouve sous forme de petits peptides et acides aminés libres pour le sous-produit le plus riche en azote soluble dans l'eau, le levain de germe de blé. Pour des méthodes de dosage similaires, l'étude de Tokoro *et al.* (1987), montre une incertitude de mesure de l'ordre de 12%. Les expériences ont été seulement dupliquées. Dans le Tableau 5, les valeurs qui n'ont pas pu être déterminées (ND) s'expliquent par ce niveau d'incertitude. En effet, en réalité la fraction d'azote soluble dans l'eau ne peut pas être inférieure à la fraction d'azote soluble dans l'acide phosphotungstique, la matière sous forme d'acides aminés étant obligatoirement extraite lors de la

recupération des polypeptides. Ceci a été observé pour les épluchures de salades et la fraction liquide des sous-produits de peau de pommes. A titre de comparaison, des données recueillies dans cette même étude, sur des végétaux (ex : chou, carotte, concombre, laitue, oignon, épinard) traditionnellement fermentés dans la cuisine japonaise, rapportent des quantités d'azote sous forme d'acides aminés comprises entre 0,17 et 0,88 (N x 6,25) g/100 g de produit (Tokoro *et al.*, 1987). Les quantités mesurées lors de mes travaux sont dix fois plus faibles que celles obtenues pour cette étude. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'azote sous cette forme est préférentiellement mobilisé par les microorganismes du milieu.

Pour conclure, les quantités d'azote total sont en accord avec les valeurs mesurées pour des végétaux pouvant être utilisés pour la production de produits fermentés. Ils représentent donc une source d'azote favorable à la croissance des microorganismes. Les produits céréaliers semblent être d'autant plus riches en matière azotée sous forme de polypeptides. Les épluchures de salades quant à elles présentent la quantité la plus élevée de matière azotée sous forme de petits peptides et acides aminés libres.

4.2.1.2. Microflores natives des sous-produits végétaux

Le dénombrement sur milieux gélosés a été utilisé comme approche exploratoire afin de caractériser les types de micro-organismes susceptibles de fermenter les différents sous-produits végétaux. Les flores microbiennes fréquemment retrouvées lors de la fermentation spontanée de tels produits (*Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, flore lactique mésophile (FLM), flore mésophile aérobie revivifiable (FMAR), bactéries acétiques, levures et moisissures) ont donc été recherchées. Les colonies observées sur les milieux gélosés n'ont pas été identifiées. Pour la suite du manuscrit, sauf spécification, il est donc admis que les flores évoquées sont juste présumées. Pour rappel du matériels et méthodes, les flores lactiques (FLM, *Lactobacillus* et *Enterococcus*) se différencient à partir du dénombrement des colonies sur différents milieux de culture gélosés : M17 (30°C), MRS (30°C) et BEA (37°C). De plus, lorsque les dilutions ensemencées n'étaient pas dénombrables (plus de 300 colonies par boîte de Pétri par exemple), les communautés microbiennes correspondantes ont été estimées.

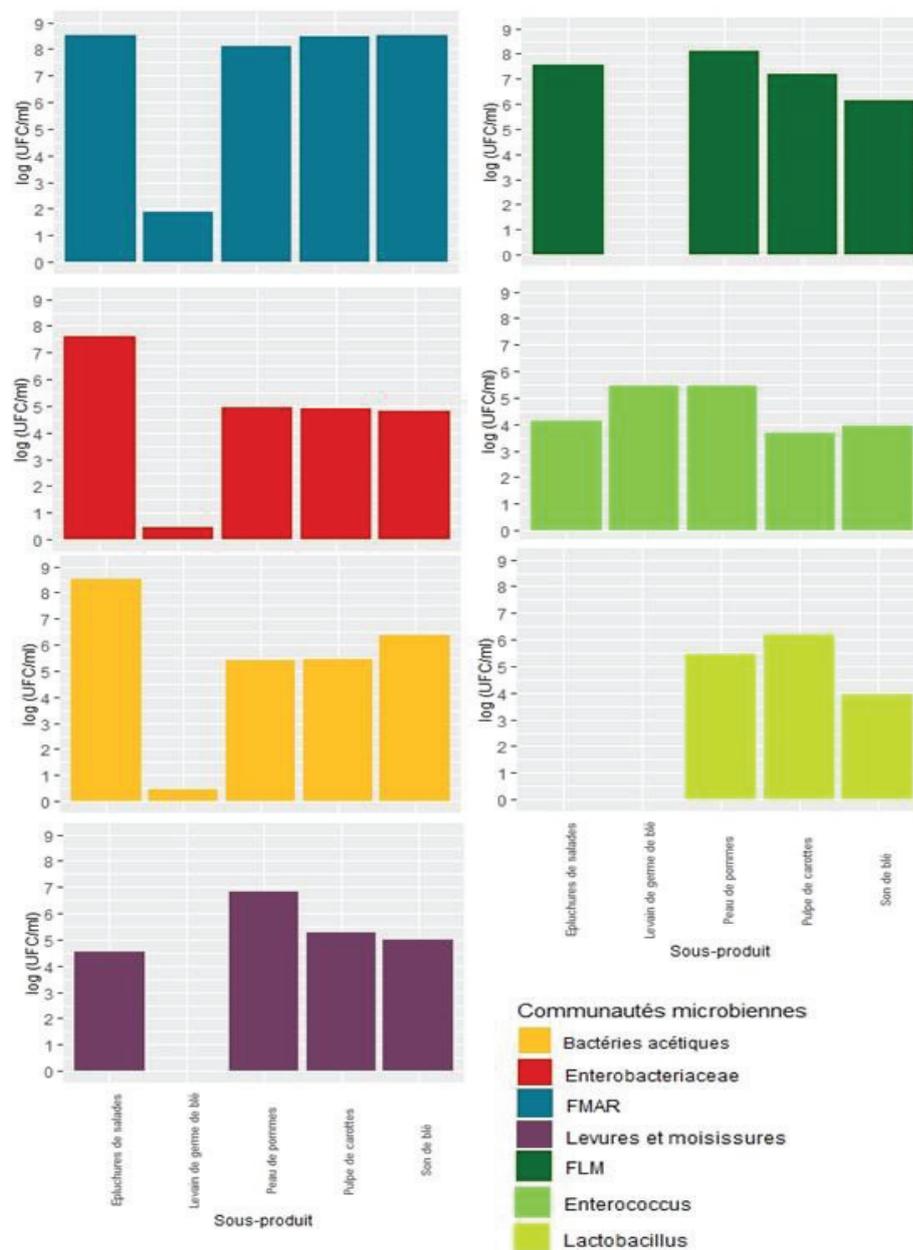


Figure 15 : Communautés microbiennes dénombrées sur milieux gélosés (log (UFC/ml)), à partir des sous-produits végétaux bruts (n=1)

Les sous-produits de pulpe de carottes, de peau de pommes et de son de blé étaient différents des sous-produits de levain de germe de blé et d'épluchures de salades, pour lesquels certaines flores microbiennes n'étaient pas viables et cultivables, dans les conditions de récupération et de stockage des matrices. Globalement, les sous-produits de pulpe de carottes, de peau de pommes et de son de blé présentaient des profils de diversité de flores microbiennes semblables (Figure 15). Malgré des taux variables selon le produit, l'ensemble des flores microbiennes suivies étaient présentes. Les sous-produits d'épluchures de salades se distinguent par l'absence de *Lactobacillus* à leur surface. Les autres flores étaient retrouvées à des taux comparables aux trois sous-produits précédents. Quant au levain

de germe de blé, il était peu chargé en microorganismes. Le taux de la Flore Mésophile Aérobie Revivifiable (FMAR) pour ce sous-produit était de l'ordre de 2 log UFC/mL (en bleu, Figure 15), contre 8 log UFC/mL pour les quatre autres matrices brutes. Pour des végétaux bruts, la flore totale aérobie est, dépendamment des produits, de l'ordre de 6 à 8 log UFC/g (Jay *et al.*, 2005; Lund, 1992; Nascimento *et al.*, 2003). Excepté pour le levain de germe de blé, les taux observés ici sont donc cohérents avec la littérature. Le dénombrement de flores généralement identifiées à la surface des végétaux a été entrepris dans le but d'avoir une image de la diversité des microorganismes viables et cultivables des différents sous-produits.

Les bactéries lactiques particulièrement, dont la flore mésophile lactique aérobie, les *Lactobacillus*, les *Enterococcus*, et les bactéries acétiques, sont des microorganismes largement impliqués dans les processus de fermentation des produits végétaux. Dans le cas des sous-produits végétaux bruts étudiés ici, l'ensemble de ces flores ont été identifiées pour la peau de pommes, la pulpe de carottes et le son de blé. Les *Lactobacillus* n'ont pas été détectés à la surface des épluchures de salades. Enfin, la FLM et les *Lactobacillus*, n'ont pas été dénombrés pour le levain de germe de blé brut stocké en chambre froide, pourtant préalablement fermenté. Les *Enterococcus* et les bactéries acétiques ont été évaluées respectivement à un taux inférieur à 0,7 et de 5,47 log UFC/mL. A l'état initial, ces deux sous-produits ne semblaient pas les plus favorables à la fermentation lactique. D'après les données de la littérature, les levains, dont celui obtenu à partir de blé, sont des environnements dominés par les bactéries lactiques et les levures (Ercolini *et al.*, 2013; Gänzle et Ripari, 2016). Une étude de Ercolini *et al.* (2013), rapporte une croissance stationnaire après 5 jours de fermentation de deux variétés de levain de blé, de l'ordre de 9 log UFC/g pour les LAB. Il est important de noter que ces références considèrent du germe de blé fermenté, non déshydraté. Une autre étude, menée par Marti *et al.* (2014), indique des quantités de flore mésophile (FMAR) et de LAB d'environ 1.10^9 UFC/g de levain hydraté et fermenté, et 1.10^5 UFC/g de levain déshydraté (109°C, 60 s). Pour les sous-produits, seule la FMAR a été dénombrée à un taux d'environ 2 log UFC/mL et les *Enterococcus* à 5,5 log UFC/mL. Comme évoqué précédemment, le traitement thermique appliqué lors de la production du levain de germe de blé pourrait être à l'origine d'un stress thermique induisant l'absence de LAB viables et cultivables. Cependant, il est important de remarquer que le taux d'humidité du sous-produit est de 64%. Les mesures effectuées au cours de l'étude Marti *et al.* (2014), indiquaient des taux d'humidité de 33% pour le levain hydraté et fermenté, et 9,2% pour le levain déshydraté. A priori, les conditions hydriques sont réunies pour permettre un développement des microorganismes. Il est donc important de vérifier dans un second temps si une incubation dans des conditions de culture favorables permet un développement des flores microbiennes et la fermentation du levain de germe de blé. Les écosystèmes microbiens sont, pour cette matrice, différents de ceux observés dans la littérature. Les

flores lactiques et acétiques étaient présentes à la surface des sous-produits de peaux de pommes, de pulpe de carottes et de son de blé, à des taux compris entre 3,67 log UFC/mL et 8,13 log UFC/mL. Parmi les microflore présentes, la FLM excédait 6,15 log UFC/mL excepté pour le levain de germe de blé. Les *Lactobacillus* et les bactéries acétiques avaient des taux supérieurs à 6,18 log UFC/mL. La matrice son de blé était caractérisée par un taux plus faible de *Lactobacillus*, d'environ 4 log UFC/mL.

Comme l'évoque le précédent paragraphe, les levures et les moisissures sont des microorganismes identifiés à la surface des végétaux et sont utilisés comme auxiliaires technologiques pour la production de molécules d'intérêt en fermentation solide. Dans le cas des sous-produits considérés, elles ont été retrouvées pour toutes les matrices, excepté le levain de germe de blé (en violet, Figure 15). Dans les études de Marti *et al.* (2014) et Ercolini *et al.* (2013), les levures étaient dénombrées à 10^2 UFC/g, pour un levain déshydraté, et la quantité de levures après 5 jours de fermentation pouvait atteindre 8 log UFC/g. Comme pour les flores lactiques et acétiques, l'absence de levures et de moisissures au départ de la fermentation diffère de ce qui peut être observé dans la littérature. Pour les autres matrices, les levures et les moisissures ont été dénombrées à des taux intermédiaires entre 4,5 et 6,8 log UFC/mL, respectivement pour les épluchures de salades et les peaux de pommes. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur, voire plus élevées, que ce qui peut être observé par exemple à la surface de végétaux tels que la carotte, les haricots verts ou la laitue, avec des taux respectivement de 2,5 log UFC/mL, 2,7 log UFC/mL et 5,6 log UFC/g (Di Cagno *et al.*, 2008; Nascimento *et al.*, 2003).

Enfin, les *Enterobacteriaceae* ont été identifiées au cours des premiers jours de fermentation. Leur développement a ensuite été inhibé par les flores dites protectrices, dont les LAB. Elles sont également un témoin de la qualité sanitaire d'un aliment. Les épluchures de salades étaient les sous-produits les plus chargés en entérobactéries, avec un taux d'environ 7,5 log UFC/mL. En pratique, ce produit est issu directement du parage des végétaux et n'a pas été lavé en bain chloré. Pour les peaux de pommes, la pulpe de carottes et le son de blé, la quantité d'entérobactéries était de l'ordre de 5 log UFC/ml. L'étude de Di Cagno *et al.* (2008), sur la fermentation de carottes, haricots verts et courgettes, rapportait des quantités plus faibles d'environ 1,4 log UFC/mL. Cependant, il faut noter que ces dénombrements ont été effectués à partir de végétaux lavés à l'eau et dont la peau a été enlevée. Cette flore n'a pas été retrouvée pour le levain de germe de blé. L'étude d'Ercolini *et al.* (2013), reflète cette augmentation des entérobactéries au cours des deux premiers jours de fermentation, pouvant atteindre 6 log UFC/g de levain, puis une diminution jusqu'à ce qu'ils ne soient plus détectés après 11 jours.

Ces résultats de dénombrement sont à mettre en perspective avec les traitements subis par les sous-produits qui varient en fonction des végétaux. Seules les peaux de pommes ont été lavées à l'eau à leur arrivée en entreprise et les carottes ôtées de la terre présente en surface. Les épluchures de salades, à ce stade, n'ont pas été lavées. Dans tous les cas, les sous-produits étaient stockés à l'abri de l'extérieur ou directement prélevés sur la chaîne de transformation industrielle. Pour le son de blé, les déchets tels que la paille, le verre, les insectes ont été éliminés. Les grains de blé ont ensuite été humidifiés pour atteindre le taux d'extrait sec souhaité. Bien que des précautions aient été prises au cours du stockage des sous-produits en entreprise, leur acheminement au laboratoire et leur stockage en chambre froide, les taux plus élevés de certaines flores, en comparaison avec les données de la littérature, pourraient s'expliquer par le développement des flores natives et un début de fermentation. En opposition, les sous-produits de levain de germe de blé sont directement issus d'une matrice fermentée depuis plusieurs jours et pour laquelle une quantité inférieure de microorganismes a été dénombrée. Comme évoqué, la suite de l'étude devra identifier si les microorganismes sont présents mais dans un état de stress, ou si la matrice n'est pas fermentescible en l'état.

Les données sur les sous-produits bruts ont permis de réaliser une caractérisation préalable des matrices végétales. Les caractéristiques physico-chimiques (Activité de l'eau (a_w), pH, acidité titrable et extrait sec (ES)), les teneurs en azote, et la présence certaines flores microbiennes natives, ont été mesurés afin de caractériser le potentiel fermentaire des végétaux. Ces données permettent de caractériser les ressources disponibles aux microorganismes pour la production de biomasse. Elles sont également des indicateurs technologiques utilisés pour le suivi des écosystèmes fermentaires et la sélection de consortia microbiens capables de produire des molécules d'intérêt. Le pH et l'acidité totale variaient d'une matrice à l'autre selon la nature biochimique des végétaux. Ceci était particulièrement observé pour le levain de germe de blé, fermenté au préalable, dont le pH était le plus acide. D'après ces premières données, la fermentation spontanée de l'ensemble des substrats semble possible. Les données de l'ANSES (2017) et des études menées sur les végétaux bruts, indiquent que la salade est la matrice la plus pauvre en glucides. Non fermentés, les produits céréaliers sont les plus riches en sucres. Les résultats de dénombrement des flores microbiennes mettent en avant la présence des flores lactiques, et des levures et moisissures, retrouvées dans les produits fermentés, pour l'ensemble des sous-produits excepté le levain de germe de blé. Les sous-produits issus de cette matrice sont les seuls à avoir subi une fermentation préalable. Pour ce sous-produit, la consommation des substrats lors de la fermentation préalable du levain, le pH acide, et le traitement thermique appliqué, pourraient limiter la croissance des microorganismes dans les conditions données. La validation de cette hypothèse fait l'objet de la partie suivante pour laquelle des fermentations spontanées ont été réalisées et à température ambiante.

4.2.2. Evolution des sous-produits en fermentation spontanée

En première approche, des essais de fermentation spontanée ont été réalisés avec chacune des cinq matrices dans le but d'étudier l'évolution des écosystèmes végétaux à travers le suivi des paramètres physico-chimiques et microbiologiques. Les essais de fermentation spontanée ont été menés en erlenmeyer, dans des conditions identiques pour l'ensemble des sous-produits. Ils utilisaient les sous-produits bruts, n'ayant pas subi de traitement mécanique ou chimique, et étaient placés à température ambiante, sans ajout d'eau.

4.2.2.1. Le son de blé

Les faibles variations des paramètres mesurés au cours de la fermentation du son de blé ont révélé un écosystème stable au cours du temps.

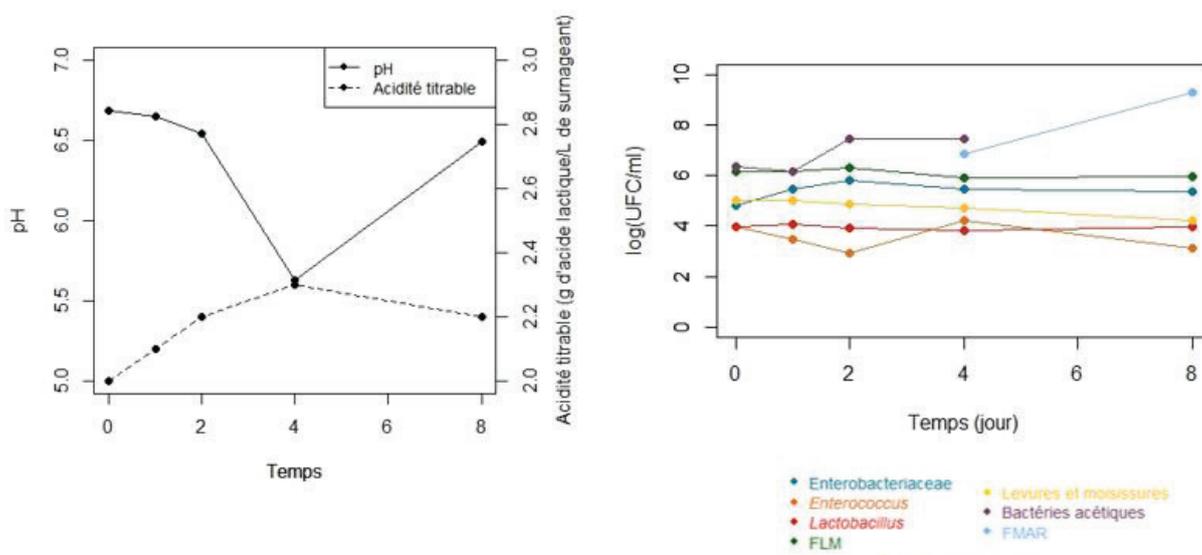


Figure 16 : Evolution de l'acidité et des communautés microbiennes au cours de la fermentation spontanée du son de blé (n=1)

L' a_w de ce sous-produit, de l'ordre de 0,8, explique ce résultat. A l'exception de la FMAR et des bactéries acétiques, les flores microbiennes présentaient des taux constants, entre 3,5 et 6 log d'UFC/mL suivant la population considérée (Figure 16). Cependant, une augmentation des bactéries acétiques était observée après deux jours de fermentation, passant de 6 log d'UFC/mL environ, à plus de 7,47 log d'UFC/mL. L'utilisation du milieu gélosé à base de mannitol pour le dénombrement des bactéries acétiques n'a pas permis la sélection exclusive de ces microorganismes. Après 8 jours de fermentation, les colonies présentes aux dilutions ensemencées avaient des morphotypes de levures et leur nombre était supérieur à 300 colonies. Les données n'ont pas pu être exploitées pour ce point. Il est donc indispensable de rappeler que les flores suivies sont présumées.

Pour la Flore Mésophile Aérobie et Revivifiable, les dilutionsensemencées étaient également non dénombrables. De plus, la croissance d'un tapis microbien, à partir du sous-produit brut, a inhibé le développement des autres microorganismes potentiellement présents. Les différences observées ne pouvant pas être liées à une croissance des microorganismes, du fait de la faible a_w , les résultats indiquent une répartition homogène à la surface de sous-produits de son de blé. L'évolution du pH est logiquement corrélée négativement à l'évolution de l'Acidité Totale Titrable. Après 4 jours d'incubation, le pH diminuait pour atteindre 5,63 et l'ATT 2,3 g d'acide lactique/L de surnageant. L'évolution de ces deux paramètres n'était pas corrélée de façon significative.

4.2.2.2. La pulpe de carottes

L'écosystème pulpe de carottes a évolué principalement au cours des deux premiers jours de fermentation (Figure 17).

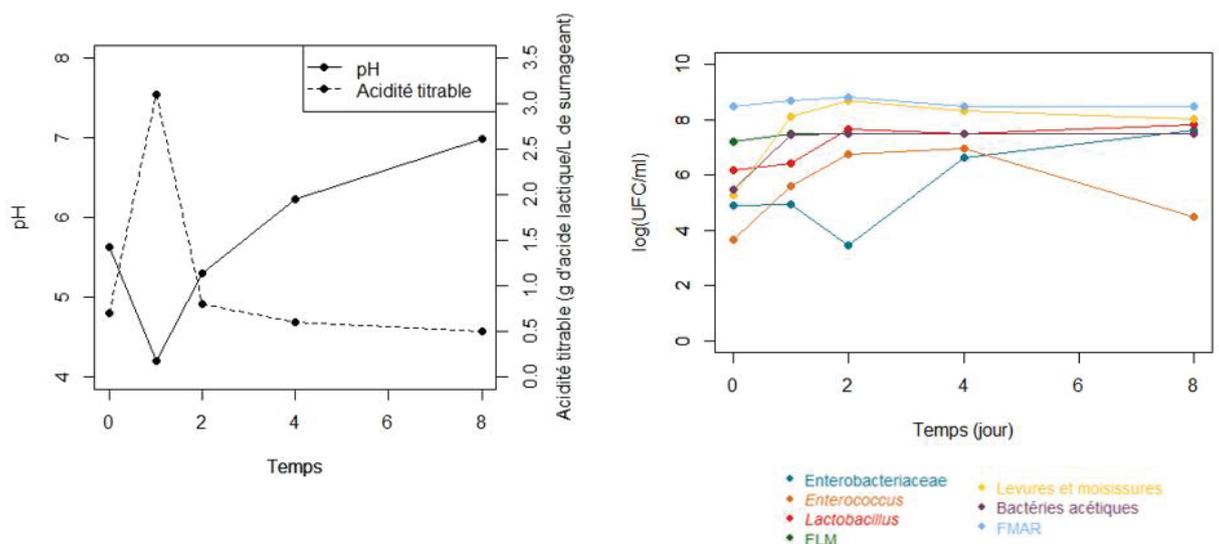


Figure 17 : Evolution de l'acidité et des communautés microbiennes au cours de la fermentation spontanée de pulpe de carottes (n=1)

Ainsi, les *Enterococcus*, les levures et les moisissures, les *Lactobacillus*, la flore lactique mésophile, les *Enterobacteriaceae* et les bactéries acétiques augmentaient au cours des deux premiers jours d'incubation. Comme pour le son de blé, les colonies dénombrées pour les bactéries acétiques présumées et la FMAR, correspondent à des minima. Les dilutionsensemencées présentaient un nombre de colonies supérieur à 300. La croissance microbienne se traduisait par une diminution du pH de 5,62 à 4,19 après un jour de fermentation, et une augmentation de l'ATT de 0,7 à 3,1 eq g d'acide lactique/L de surnageant. Le coefficient de corrélation entre le pH et l'ATT était égal à -0,851. Cette valeur était proche du seuil de significativité de 0,878. Le suivi des flores microbiennes, en parallèle des paramètres physicochimiques, indiquait une corrélation positive quoique non significative entre le

pH et les *Enterobacteriaceae* ($r = 0,741 < r_{th} = 0,878$), et dans une moindre mesure les *Lactobacillus* ($r = 0,637 < r_{th} = 0,878$). Lorsque le pH augmentait, les taux d'*Enterobacteriaceae* et de *Lactobacillus* augmentaient également. Dans les premiers jours de fermentation, l'inhibition de la croissance des entérobactéries peut s'expliquer par une acidification du milieu et la croissance des microorganismes tels que les bactéries lactiques, dont les *Lactobacillus*, capables de se développer à des pH acides. Contrairement à ce qui peut être observé dans la littérature, les entérobactéries se sont multipliées pour atteindre des niveaux proches de ceux des bactéries lactiques (Di Cagno *et al.*, 2008). Les colonies retenues et observées sur les géloses VRBG étaient caractéristiques des *Enterobacteriaceae* sur ce milieu (violette).

4.2.2.3. Le levain de germe de blé

La partie 4.2.1. a mis en avant que le levain de germe de blé brut, seule matrice préalablement fermentée, était caractérisée par des taux microbiens inférieurs à ceux habituellement rapportés dans la littérature.

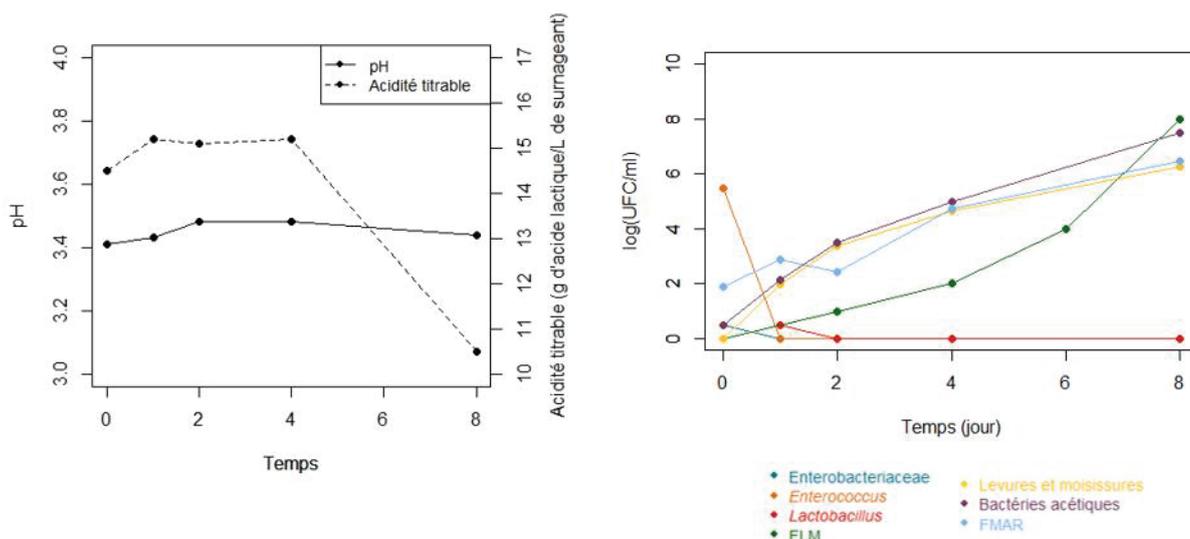


Figure 18 : Evolution de l'acidité et des communautés microbiennes au cours de la fermentation spontanée du levain de germe de blé (n=1)

Le pH acide de l'ordre de 3,4 est témoin de cette fermentation initiale. L'ensemble des microflores, exceptés les *Enterococcus*, étaient présentes à des taux inférieurs à 2 log d'UFC/mL (Figure 18). Lorsque les dénombrements étaient inférieurs au seuil de significativité minimal ($< 0,7 \log \text{ UFC/mL}$), les valeurs ont été considérées égales à zéro. Les *Enterococcus*, majoritaires initialement, n'étaient plus détectés après un jour d'incubation. Les levures et les moisissures, les bactéries acétiques, la flore lactique mésophile et la FMAR augmentaient pour atteindre des taux supérieurs à 6,24 log d'UFC/mL. Les *Lactobacillus* et les *Enterobacteriaceae* n'étaient plus détectés

après deux jours de fermentation. En revanche, le pH restait constant au cours de la fermentation et une diminution de l'acidité était relevée en fin de fermentation. Les coefficients de corrélation ont mis en évidence une corrélation négative entre l'Acidité Totale Titrable et les flores ayant augmentées au cours de la fermentation. Cette corrélation était forte pour la FMAR, la flore lactique mésophile et les bactéries acétiques (r respectivement égaux à $-0,759$, $-0,750$ et $-0,702$). Lorsque l'ATT diminuait, ces microflores semblaient augmenter. Après huit jours de fermentation, l'absence de variation du pH et la diminution de l'Acidité Titrable Totale pourrait indiquer l'arrêt de la fermentation lactique. Sans renouvellement des substrats, dont les sucres, la production d'acides organiques serait alors limitée. Des espèces de la Flore Mésophile Lactique et les bactéries acétiques sont capables de se développer à des pH acides. Elles sont responsables de la fermentation des végétaux (Gänzle, 2015a). Il faut également noter que les bactéries acétiques et la flore lactique mésophile font partie de la FMAR.

4.2.2.4. La peau de pommes

Comme pour la matrice carotte, une acidification a été constatée (Figure 19).

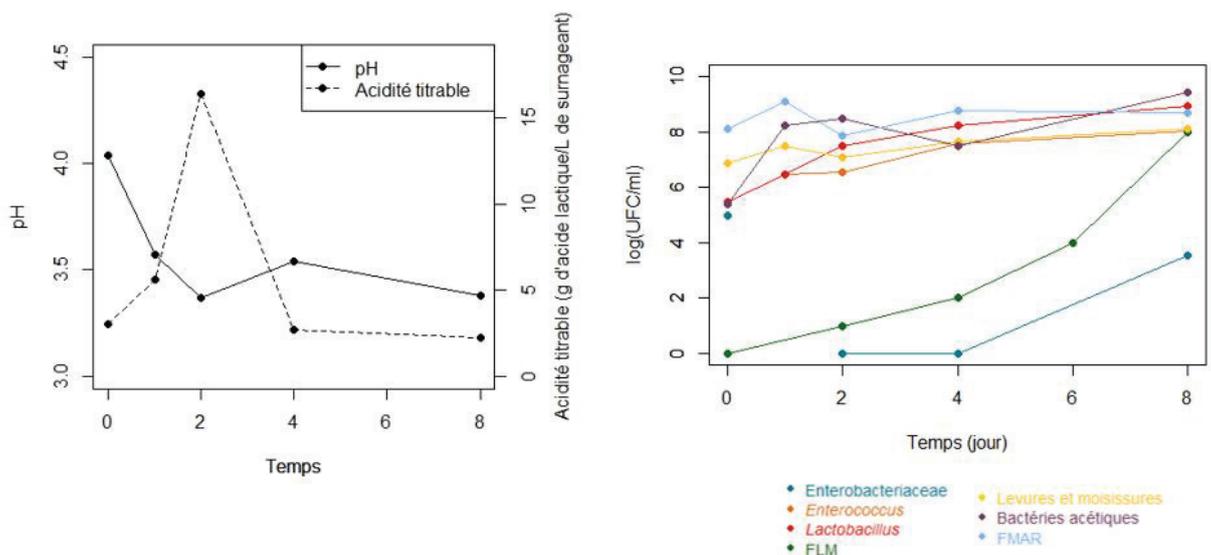


Figure 19 : Evolution de l'acidité et des communautés microbiennes au cours de la fermentation spontanée de peaux de pommes (n=1)

Une augmentation des bactéries acétiques, des *Enterococcus*, des levures et des moisissures, de la flore lactique mésophile a été observée, ces flores passant d'environ 5,4 log UFC/mL à 8,0 log UFC/mL après huit jours. Après deux jours d'incubation, les *Enterobacteriaceae* n'étaient plus détectés. Le pH diminuait jusqu'à J+2 pour atteindre 3,37. Cette acidification était concomitante d'une augmentation de l'ATT - de 3 g eq d'acide lactique/L de surnageant à 16,4 g eq d'acide lactique/L de

surnageant. Le pH était significativement corrélé à la flore des bactéries acétiques ($r = -0.947$) et fortement aux *Lactobacillus* ($r = -0.824$) qui sont deux flores acidifiantes.

4.2.2.5. Les épluchures de salades

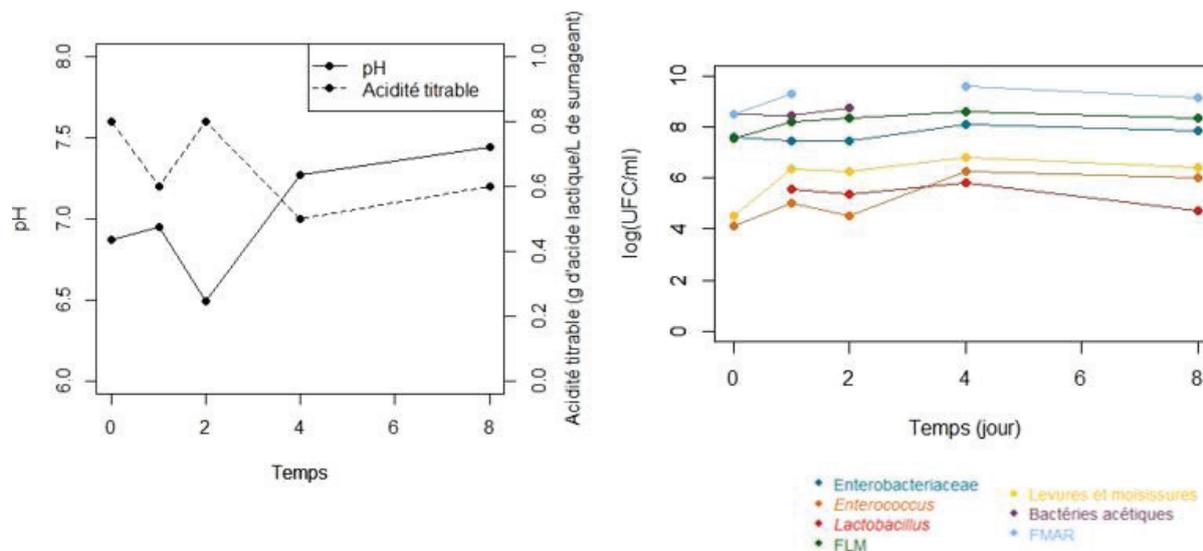


Figure 20 : Evolution de l'acidité et des communautés microbiennes au cours de la fermentation spontanée d'épluchures de salades (n=1)

Après un jour de fermentation des épluchures de salades, les levures et les moisissures, la flore lactique mésophile et les *Enterobacteriaceae* atteignaient des taux respectivement égaux à 6,38, 8,21 et plus de 7,47 log d'UFC/mL (Figure 20). Les bactéries acétiques augmentaient et étaient dénombrées à plus de 9,44 log d'UFC/mL après huit jours. Au départ, le pH était de 6,87 et diminuait pour atteindre une valeur de 6,49 après deux jours de fermentation. En lien avec l'acidification, une augmentation de l'acidité titrable a été constatée. Une alcalinisation a ensuite été observée, jusqu'à atteindre un pH de 7,44. Une corrélation négative non significative entre le pH et l'acidité titrable était relevée ($r = -0,413$). De plus, le pH était corrélé négativement à la croissance des bactéries acétiques ($r = -0,947$) et fortement aux *Lactobacillus* ($r = -0.824$). Cette observation peut s'expliquer par la capacité de ces deux flores microbiennes à acidifier le milieu, notamment par la production d'acides organiques. Dans le cas des sous-produits d'épluchures de salades, le pH n'était pas aussi acide par rapport à ce qui a pu être observé pour la pulpe de carottes ou encore les peaux de pommes.

4.3. Discussion

Dans le cadre des problématiques de traitement et/ou de valorisation des sous-produits végétaux de l'industrie agroalimentaire, le projet ValPro proposait d'utiliser les processus de fermentation comme moyen de valorisation. Pour répondre à cet objectif, une étude préliminaire des cinq sous-produits végétaux devait déterminer leur potentiel fermentaire. Celui-ci a été estimé en déterminant des paramètres physico-chimiques, biochimiques et microbiologiques. Les paramètres physico-chimiques et biochimiques permettent de définir le biotope à disposition de la biocénose, et plus spécifiquement ici des communautés microbiennes présentes à la surface des végétaux. L'intérêt était également de suivre la dynamique de développement de ces organismes au cours du temps.

Dans les conditions testées, les matrices de son de blé et de levain de germe de blé étaient stables en termes de variation de pH. En l'absence d'ajout d'eau pour le son de blé, la stabilité des communautés peut s'expliquer par une valeur d'extrait sec importante de l'ordre de 83% et une a_w faible de 0,8. L'augmentation observée pour les bactéries acétiques peut s'expliquer par la difficulté à dénombrer les colonies pour cette matrice, sur le milieu gélosé utilisé à base de mannitol. Les valeurs correspondent ici à des valeurs estimées. Pour l'ensemble des matrices, et particulièrement celle-ci, l'ajout de pénicilline n'a pas empêché la croissance de microorganismes dont le phénotype était similaire aux levures (ex : colonie crémeuse, roses). Ceci met en avant la limite de sélectivité des milieux de culture gélosés et l'utilisation des méthodes viables cultivables. Toutefois, cette méthode était la plus adaptée pour répondre à l'objectif de cette partie et la caractérisation préliminaire des sous-produits végétaux. La stabilité des autres flores reste cohérente par rapport aux conditions d'humidité du milieu. Concernant les sous-produits de carotte, pomme et salade, une diminution du pH après un à deux jours de fermentation spontanée a été mesurée. Corrélée à une augmentation de l'acidité titrable, les résultats laissent supposer la production d'acides organiques. Dans le même temps, la croissance des flores lactiques (dont les *Lactobacillus*) et acétiques était fortement corrélée à l'acidification observée pour les sous-produits de pomme et de salade. Pour la pulpe de carottes, les taux de bactéries lactiques mésophiles et acétiques représentent des valeurs estimées par le dénombrement sur gélose et étaient supérieurs à 7,5 log d'UFC/mL en début de fermentation. Hormis pour les matrices son de blé et levain de germe de blé, les flores lactiques étaient retrouvées à des taux minimum de l'ordre de 6 log d'UFC/mL, à l'état initial. Les bactéries lactiques sont largement retrouvées à la surface des végétaux et peuvent atteindre des taux de l'ordre de $10^{8.5}$ UFC/g, dépendamment des parties de la plante considérées (ex : fruits, graines, feuilles...) (Yu *et al.*, 2019). Ces observations sont cohérentes avec les résultats de la littérature, obtenus lors de la fermentation de végétaux de différente nature. Après deux jours, la fermentation spontanée de végétaux (chou-fleur, carotte et tomate), ou après inoculation avec *Lb. plantarum*, menée à température ambiante, a

mis en évidence une diminution du pH passant en moyenne de 6,4 à 3,7 (Wouters *et al.*, 2013b). Pour l'ensemble des conditions testées, l'acide lactique était majoritairement produit. Des essais menés à partir de jus de carotte, de haricots verts et de courgettes ont également conduit à la production d'acide lactique. Les quantités les plus importantes ont été obtenues pour les échantillons ensemencés en bactéries lactiques (Di Cagno *et al.*, 2008).

Pour des quantités équivalentes de sous-produits végétaux, le levain de germe de blé et le son de blé sont les deux matrices les plus riches en azote total. Elles disposent également des fractions solubles dans l'eau et dans l'acide phosphotungstique les plus importantes. Ces fractions représentent respectivement les polypeptides et acides aminés d'une taille inférieure à 10 000 Da, et les petits peptides et acides aminés libres inférieurs à 600 Da (Bouton et Grappin, 1995). Ces peptides constituent la principale source d'azote du milieu. La libération de polypeptides lors de la protéolyse primaire, et d'acides aminés libres après la protéolyse secondaire, permet le développement des microorganismes auxotrophes. Pour ce type de sous-produit, le gluten est la principale réserve d'azote. Pour l'ensemble des matrices, les observations indiquent que les fractions d'azote soluble dans l'eau et dans l'acide phosphotungstique (NS et NPT) sont plus importantes pour la phase liquide, potentiellement directement accessible pour le métabolisme. Ces résultats sont une image du potentiel fermentaire des matrices au départ de la fermentation et indiquent que des composés azotés restent disponibles au sein de la phase solide. La dégradation des molécules azotées est influencée par les conditions physico-chimiques et biochimiques du milieu, telles que l'activité enzymatique, elle-même dépendante du pH.

En complément des résultats obtenus, la littérature apporte des informations sur les nutriments fournis par les sous-produits pour la croissance microbienne. De par leur nature (fruit, légume ou céréale), leur composition biochimique est différente. Le son de blé et le levain de germe de blé sont les plus riches en glucides, protéines et lipides. D'après les tables de composition nutritionnelle des aliments Ciqual (Anses, 2017), la quantité de glucides pour les matrices brutes est comprise entre 23 et 35 g/100 g de produit. Les sucres sont retrouvés à hauteur de 2,5 à 10 g/100 g de produit et sont majoritairement composés de glucose, de saccharose et de maltose. De plus, l'amidon représente 10 à 20% de la matière (Prückler *et al.*, 2015a; Roissart, 1994). La carotte et la pomme contiennent des quantités intermédiaires de glucides de l'ordre de 6,4 à 11,6 g/100 g de produit, et des teneurs en sucres de 5,4 à 9,3 g/100 g. Contrairement aux deux matrices précédentes, le taux d'humidité est plus élevé avec des valeurs comprises entre 72 et 92% (Wadhwa et Bakshi, 2013). Cebulj *et al.* (2017), ont détecté par HPLC du saccharose, du glucose, du fructose, et du sorbitol en plus faible quantité, dans la peau des pommes des variétés Jonagold et Granny Smith. Les trois premiers sucres cités sont également retrouvés dans la carotte, ainsi que le xylose (Sharma *et al.*, 2012). Enfin, la salade est le

sous-produit le plus pauvre en nutriments, avec 1,5 g/100 g de glucides et 0,83 g/100 g de sucres dont le saccharose, le fructose et le glucose (Falovo *et al.*, 2009).

Cette phase préliminaire a mis en avant une hétérogénéité des sous-produits du point de vue de leur composition physico-chimique et biologique et une capacité fermentescible dépendante des conditions de culture, en particulier des conditions d'humidité. Pour la poursuite des essais, il semblait nécessaire de sélectionner un sous-produit modèle dans le but de construire une démarche d'analyse pour la production de métabolites d'intérêt, à partir d'un substrat complexe. De plus, pour des raisons expérimentales, l'étude des cinq sous-produits de façon approfondie impliquait la multiplication conséquente des essais, vis-à-vis de la méthode analytique qui a été retenue : le plan d'expérience factoriel.

Du point de vue des conditions d'humidité, les résultats ont montré que le sous-produit de son de blé était peu favorable à la croissance microbienne (teneur en eau = 17% et $a_w = 0,8$). Les autres sous-produits possédaient des valeurs d' a_w et d'extrait sec appropriées à la fermentation (Guiraud, 2012; Troller et Stinson, 1981). Bien que les conditions d'humidité soient favorables à la croissance des microorganismes, la salade est le produit le plus pauvre en ressources nutritives, avec notamment un taux de glucides inférieur à 1,5 g/100 g de salades brutes. D'après les tables Ciqual, publiées par l'Anses (2017), le son de blé et le levain de blé, sont les produits les plus riches en glucides, protéines et lipides. Cependant, le sous-produit de levain de germes de blé est un produit fermenté au préalable, dont une partie des substrats a été consommée. Les essais de fermentation spontanée ont également montré une stabilité du pH et des flores acidifiantes (bactéries acétiques, flores lactiques dont *Enterococcus*). Les sous-produits de levain de germe de blé sont obtenus après le séchage d'un levain de germe de blé. Le traitement thermique appliqué, à 200°C pendant 30 s, pourrait expliquer en partie une phase de latence de la croissance microbienne. Enfin, d'après les valeurs de pH initiales, le sous-produit de peaux de pommes avait un pH plus acide, potentiellement moins favorable à la croissance des microorganismes, par rapport au pH initial de la pulpe de carottes. Sur la base de ces critères, la pulpe de carottes a été retenue comme matrice modèle pour la suite des essais. D'après la littérature, la pulpe de carottes possède un potentiel fermentaire pour la production d'acides organiques (ex : acide lactique et acide acétique), d'éthanol, d'exopolysaccharides ou encore d'enzymes (Aimaretti *et al.*, 2013, 2012; Di Cagno *et al.*, 2008; Juvonen *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2018).

Dans le but de produire des métabolites d'intérêt, il semblait nécessaire de faire varier les paramètres de culture afin de perturber les métabolismes mis en place au cours de la fermentation spontanée. Les enjeux étant de valoriser des déchets et de repartir des sous-produits bruts, les paramètres de fermentation à moduler devaient être simples à mettre en œuvre et limiter la

génération de nouveaux déchets (ex : utilisation de solvants). Le souhait était également de tester plusieurs variables de fermentation, fixées à plusieurs niveaux. Un plan d'expérience factoriel complet, à deux niveaux, a donc été construit. Les quatre variables choisies étaient : le broyage préalable des sous-produits, la température d'incubation, le pourcentage d'eau ajouté et le nombre de rafraîchis métaboliques (Jawad *et al.*, 2013; Laufenberg *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2014). Le nombre de paramètres testé aboutissant à un protocole expérimental de 19 essais et une matrice modèle a été choisie.

Chapitre 5

Fermentation des cinq sous-produits végétaux

A partir des caractérisations préliminaires des sous-produits décrites dans le chapitre 4, et suite au choix de la pulpe de carottes comme matrice modèle, l'objectif ici est de réaliser des essais de fermentation selon un plan d'expérience en faisant varier quatre paramètres de culture : la température, le broyage initial du sous-produit, et les conditions d'humidité (par ajout d'eau ou rafraîchissement du milieu). Les quantités des composés phénoliques, acides organiques (acides lactique, acétique et citrique), et les profils des composés volatils ont été suivis au cours de la fermentation. L'utilisation des sous-produits comme substrats pour la production de ces composés a été la voie de valorisation retenue dans le cadre du projet. Les résultats obtenus à partir de la pulpe de carottes ont permis de mener des essais sur l'ensemble des sous-produits.

5. Fermentations spontanées des cinq sous-produits végétaux

5.1. Méthodes analytiques

Le dénombrement des flores microbiennes, les mesures de pH et d'acidité titrable, et le dosage des acides organiques, ont été effectués selon les matériels analytiques décrits dans le chapitre 4.

5.1.1. Dosage des acides aminés

Des kits enzymatiques Enzytec (R-biopharm) ont été utilisés pour le dosage des acides organiques : D/L-lactique, citrique et acétique. Les mesures ont été réalisées à partir des surnageants bruts obtenus selon le protocole décrit dans le chapitre 4, stockés à -20°C, et dilués au 10^{ème}.

5.1.2. Biologie moléculaire

Pour l'ensemble des chapitres traitant des résultats, les méthodes d'extraction d'ADN et d'amplification par REP-PCR sont identiques aux protocoles décrits dans la partie 5.2.2. Les traitements des gels d'électrophorèse REP-PCR ont été réalisés à l'aide du logiciel BioNumerics (version 7.6.3). Le coefficient de similarité de Jaccard a été retenu pour les analyses, le paramètre « optimisation » du logiciel a été fixé à 0,5, et les bandes dont la taille était incertaine n'ont pas été prises en compte. Les clusters ont été construits selon la méthode UPGMA et la qualité des nœuds des clusters a été évaluée par le calcul des coefficients de corrélation cophénétique. Les Analyses en Composante Principale ont également été construites avec le logiciel BioNumerics.

5.2. Fermentation spontanée de la matrice modèle : la pulpe de carottes

5.2.1. Résumé

L'article "Evolution of carrots pulps during spontaneous fermentation", publié dans le journal "International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research", décrit la fermentation spontanée du sous-produit choisi comme matrice modèle lors de la première phase de l'étude : la pulpe de carottes. Dans cette partie de l'étude, l'objectif était d'étudier l'impact des conditions de culture sur la production de composés ayant potentiellement un intérêt industriel, tels que certaines molécules volatiles en tant qu'arômes naturels, car produits par fermentation, ou de façon plus discutable des acides organiques tels que les acides D- ou L-lactique dont l'origine naturelle peut être mise en avant pour des applications en tant que conservateur ou synthon de base pour la production de PLA (acide polylactique).

Quatre variables de culture ont été testées selon un plan d'expérience factoriel à deux niveaux : la température, le broyage de la matrice végétale, le pourcentage d'eau ajouté et le rafraîchissement du milieu de croissance au cours du temps. Le rafraîchissement consiste à ôter le surnageant de culture, après un temps donné, et le remplacer par de l'eau stérile. Les essais de fermentation ont été menés pendant neuf jours. Le développement des microorganismes viables cultivables a été suivi par le dénombrement de différentes communautés sur milieux gélosés. L'évolution de leur diversité microbienne a été appréhendée par REP-PCR. Le pH a également été mesuré au cours du processus.

Les résultats ont mis en évidence la présence majoritaire des bactéries lactiques, suivie des Enterococci, des levures et des moisissures et des bactéries acétiques. Les entérobactéries, les *Bacillus* et les *Pseudomonas* étaient retrouvés à des taux plus faibles. Les profils de REP-PCR ont permis de calculer des indices de diversité et de montrer une évolution variable au cours du temps en fonction des populations microbiennes considérées. Au cours de la fermentation de pulpe de carottes, la production d'éthanol, d'acide acétique et d'acide lactique était due à la croissance des bactéries lactiques présentes dans le milieu. Le suivi des molécules volatiles par SPME, couplé à de la spectrométrie de masse, a montré la synthèse de 2-butanol. D'après l'analyse des résultats par régression linéaire multiple, la température est la variable du plan d'expérience qui induit la diminution de la synthèse d'acide acétique, d'éthanol et d'acide D-lactique lorsqu'elle augmente. La littérature rappelle que l'effet de la température est corrélé aux conditions physico-chimiques du milieu, telles que le pH. Dépendamment des microorganismes responsables de la production d'acides organiques, et plus précisément des différentes espèces de bactéries lactiques, les températures de production seront variables et spécifiques (Hujanen et Linko, 1996; Jawad *et al.*, 2013). Par exemple, pour une gamme de températures testées comprises entre 30°C et 45°C, Hujanen et Linko (1996), observent des températures optimales de production d'acide lactique différentes pour deux souches de *Lb. casei*, à 41°C et 45°C. Dans cette étude, l'augmentation de la température semblait favoriser la production d'acide lactique. Après deux jours de fermentation, la production d'acide lactique était maximale avec des quantités respectives des isomères D et L, de 254 et 177 mg/L, ce qui est une valeur faible comparativement à ce qui peut être obtenu par fermentation lactique d'un sous-produit laitier tel que le lactosérum. A titre d'exemple, Pescuma *et al.* (2008) rapportent une valeur maximale de 4 g/L d'acide lactique dans du lactosérum fermenté par des bactéries lactiques thermophiles. Dans une revue, Panesar *et al.* (2007), indiquent que des essais menés en fermenteur ont permis de produire jusqu'à 3,97 g/L/h d'acide lactique, et 16 g/L avec un système de cellules immobilisées. Avec un autre exemple de végétaux fermentés, des épiluchures de mangues, une production maximale de 17,5 g/L d'acide lactique a été obtenue, après 6 jours de fermentation (Jawad *et al.*, 2013).

Globalement, l'évolution des fermentations spontanées de pulpe de carottes semble stable dans la limite des variables du plan d'expérience testées, la croissance des LAB et leur métabolisme dominant largement les écosystèmes. Dans le cadre du projet, l'objectif suivant était d'étudier l'impact de ces variables sur les autres matrices celles-ci ayant une nature et une composition différentes de la pulpe de carottes. Les résultats relatifs à cette question sont présentés en partie 5.2.2. D'ores et déjà, les résultats de ce chapitre indiquent la nécessité de fixer des conditions de culture perturbant d'avantage l'équilibre des écosystèmes ou favorisant la croissance et le métabolisme des flores majoritaires. Ainsi, les niveaux de température ou de pH pourraient être modifiés. De plus, l'ajout d'un starter composé de bactéries lactiques est envisagé, notamment si l'objectif est de favoriser la production de métabolites produits par ces bactéries.

5.2.2. Article

Evolution of carrot pulps during spontaneous fermentation

AUTHORS: Justine Godard^{1*}, Didier Hennequin², Arnaud Hallier³ and Yann Demarigny¹

¹ Univ Lyon, ISARA Lyon, Université Lyon 1, BioDyMIA (Bioingénierie et Dynamique Microbienne aux Interfaces Alimentaires), EA n°3733, ISARA, Agrapôle, 23 rue Jean Baldassini, F-69364, LYON, cedex 07, France

² Univ Caen, UR ABTE, EA 4651, Bd Maréchal Juin, F-14032 Caen Cedex, France

³ ISARA Lyon, Chemistry laboratory, 23 Rue Jean Baldassini, 69364 Lyon, France

Abstract

The spontaneous fermentation of carrot pulps was monitored under different conditions during nine consecutive days. Trials were carried out to obtain potentially interesting compounds: organic acids and volatile molecules. Factors were tested with a two-level full factorial design: temperature (24°C/37°C), grinding (with/without), addition of water (0%/50% w/w) and refreshment of the fermentation medium (without/after 3 or 7 days of incubation). During the course of the fermentations, different parameters were measured: microbial gross composition and diversity (REP-PCR), pH, lactic and acetic acids, ethanol, phenolic and volatiles compounds (assayed by SPME-GC-MS) concentrations. Whatever the culture conditions tested, the pulp ecosystem remained quantitatively stable from the beginning to the end of the culture step. It was dominated by Lactic Acid Bacteria (LAB), followed by Enterococci, yeasts, moulds and acetic acid bacteria (AAB); Enterobacteriaceae, Bacillus and Pseudomonas were found at low levels. However, the composition of each population changed. As a consequence, the LAB proved to be the most influencing population on the production of ethanol, acetic acid and lactic acid. 2-butanol was also detected in the fermented pulps; but no significant

relation was found with the microorganisms looked for. Among the factors tested, the rise in temperature led to a decrease in the production of acetic acid, ethanol and D-lactic acid.

Keywords: fermented vegetable, waste recycling, experimental design, community dynamics, interest compounds

1. Introduction

Throughout the world, one-third of alimentary products go unused. This translates into around 1.6 billion tonnes of waste and 936 billion USD of lost food. Vegetables, fruits and cereals represent between 15 and 25% of total waste (FAO, 2013). Currently, these wastes are mainly recycled by bioconversion, animal feed or energy production (such as incineration). Such by-products are for the most part removed during the harvesting or food making phases and domestic waste (Abu Yazid *et al.*, 2017).

In the literature, the use of vegetable wastes has mostly focused on the production of biomolecules, including organic acids - citric, lactic and gallic acids -, bioethanol, aroma compounds, biopesticides, enzymes and biosurfactants. This is partly explained by the increasing economic interest in these substances. For example, the market of organic acids was estimated at 6.55 billion USD in 2015. Wastes are transformed by the action of microbes to obtain these interesting compounds. Lactic acid, a product of the LAB (Lactic Acid Bacteria) metabolism, has been widely reviewed in the literature (Eş *et al.*, 2018). Citric acid is used in pharmaceutical, cosmetic and food industries. For example, a yield of 29 g of citric acid per kilogram of dry matter was obtained after the fermentation of carrot wastes by *Aspergillus niger*. It is low compared with the yield obtained on apple pomaces with the same mould: between 124 and 883 g/kg of product, depending on the fermentation conditions (Vandenberghé *et al.*, 2018). Biosurfactants are molecules able to modify the surface properties of other substances. For instance, they can be used to decontaminate polluted environments by hydrocarbon, or as antimicrobial agents (Youssef *et al.*, 2004).

To ferment a substrate, some parameters have to be checked carefully to maximise the production of the desired molecules: pH, temperature, nutrient composition, microbial composition, water activity, aeration, pre-treatment and particle size (Abu Yazid *et al.*, 2017; Pandey *et al.*, 2000). In this latter case for instance, whereas tiny particles increase the exchange surface, large particles tend to favour aeration but decrease the adherence surface for microorganisms. The water activity ratio needed for growth is different for bacteria - between 0.8 and 0.999 - and fungi – above 0.6. Linked to the influence of the particle size, moisture can impair oxygen diffusion inside the medium. Temperature is a key parameter as it impacts the microbial growth rate, which can differ slightly from the maximum rate of molecule production. Recently, it has been shown that lactic acid production was

influenced by the cross effect of temperature and pH. This was observed in food waste spontaneous fermentations (rice, vegetables and meat) initiated by the addition of the LAB: *Lactobacillus* and *Weissella*. The optimisation of acid production requires a temperature close to 37°C and a pH of 6. This optimum was confirmed by the construction of a quadratic mathematical model (Tang *et al.*, 2016).

During the production of grated carrots, about 25-35% of the raw material is lost in the form of carrot pulps (peels and fallen leaves including soil particles). The biochemical composition of carrot wastes is particularly effective in producing various compounds: acetic and lactic acids, ethanol and lipopeptides. Carrots contain 1-1.2% - fat, 32-64.3% - carbohydrates, 7.2-8.6% - crude protein, 4-12.3% - hemicellulose and 43.3% - phenolic compounds (Banerjee *et al.*, 2017; Wadhwa and Bakshi, 2013). Different articles have been published on the use of this substrate as a fermentative matrix.

In this work, we used carrot pulps to obtain valuable compounds after a fermentation step. Unlike Di Cagno *et al.* (2008), we only used the adventitious microflora present in the pulps themselves to stimulate fermentation; no starters were added. We tried to favour compound production by modifying the physico-chemical parameters of the environment: temperature, water addition, grinding, and refreshment.

2. Materials and methods

Fermentation experimental design

Four parameters were selected to test their influence on microbial developments: temperature, grinding of the pulps, addition of water and refreshment of the fermentation medium. In order to identify the most influent technological parameters among the four selected, a two-level full factorial design was built (2^4 , 16 experiments plus three trials in the centre of the domain). For each factor, a low and a high level were determined depending on the technological restrictions (Table 1). The central point was triplicated to estimate the variability of the experimental results.

Table 1: Experimental matrix of the two-level full factorial design (2^4), for spontaneous fermentation of carrot pulp with the four variables tested. Central point was triplicated.

Sample (S)	Grinding	Temperature (°C)	Percentage of added water (w/w)	Day of refresh (D)
S1	Without	24	0	D0
S2	With	24	0	D0
S3	Without	37	0	D0
S4	With	37	0	D0
S5	Without	24	50	D0
S6	With	24	50	D0
S7	Without	37	50	D0
S8	With	37	50	D0
S9	Without	24	0	D3 and D7
S10	With	24	0	D3 and D7
S11	Without	37	0	D3 and D7
S12	With	37	0	D3 and D7
S13	Without	24	50	D3 and D7
S14	With	24	50	D3 and D7
S15	Without	37	50	D3 and D7
S16	With	37	50	D3 and D7
S17	Without	30.5	25	D3
S18	Without	30.5	25	D3
S19	Without	30.5	25	D3

Vegetable pulp was composed of carrot peels. The products were transported from a plant producing grated carrot. Pulps were kept at 4°C from sampling to analysis. The travel and the storage did not exceed 24 h. Fermentations were conducted in nineteen 500 mL Erlenmeyer flasks (identified thereafter by the codes “S1” to “S19”). Three hundred and twenty grams of raw pulp were added to each flask, with water if required by the experimental design. The fermentation lasted for 9 days (identified thereafter by the letters “D0” to “D9”). Where specified, samples were ground using a blender for 1 min (Ultra Compact Plunge Mixer, SEB®, France). When refreshment was required, the supernatant was completely extracted and replaced with sterile water (w/w). The total solid content of the fermentation material was shown in Table 2.

Table 2: Total solid content of fermentation material in percentage of dry matter. Mean values +/- standard deviations for three repetitions of each condition of fermentation.

Percentage of dry matter		With grinding	Without grinding
	0 %	4.87 +/- 0.18	6.32 +/- 0.64
Percentage of added water (w/w)	25 %	n.d.	4.32 +/- 0.45
	50 %	2.69 +/- 0.11	3.62 +/- 0.39

n.d. : not determined

Sampling depended on the type of analysis performed: on days 0, 1, 2, 3, 7 and 9 for acetic acid, D- and L-lactic acid, ethanol, phenolic compounds, pH and total titratable acidity (TTA); on days 0 and 9 for quantitative and qualitative microbial analyses.

Sampling for microbial and chemical analyses

During the fermentation, 8 g of carrot pulp were suspended in 72 g of sterile physiological water (0.9%) and homogenised with a stomacher apparatus (Samasher®, Biomérieux, France) for 1 min, at fast speed. A part of the supernatant of the resulting slurry was frozen with glycerol (15%, v/v) at -80°C awaiting microbial analysis. The rest of the supernatant was stored at -20°C for chemical analysis.

Microbial analyses

The following microbial groups were determined: LAB on MRS agar supplemented with pimaricin (0.1 g/L, Sacco System, Italy) and nalidixic acid (0.04 g/L, Merck KGaA, Germany), and M17 agar supplemented with pimaricin (0.1 g/L), both media at 30°C for 48 h-72 h; *Pseudomonas* on

Cephalosporin-Fucidin-Cetrimide (CFC) agar incubated at 22°C for 72 h; *Enterobacteriaceae* on Violet-Red-Bile-Glucose (VRBG) agar at 37°C for 24 h; and Enterococci on Bile-Esculine-Azide agar at 37°C for 24 h-48 h. For the enumeration of AAB (Acetic Acid Bacteria), the composition of the medium used, for one litre, was as follows: bacteriological peptone (10 g, Oxoid), yeast extract (3 g), lactic acid (6.3 g, Prolabo, France), ethanol (5 g), acetic acid (3 g, AppliChem GmbH, Germany), glucose (1 g), sorbitol (1 g), mannitol (1 g), potassium hydrogen phosphate (1 g), sodium deoxycholate (0.1 g), magnesium sulphate heptahydrate (20 mg), bromocresol purple (30 mg), pimaricin (0.1 g) and agar (18 g) (Sigma), according to Papalexandratou *et al.* (2013). The pH of the medium was adjusted to pH 4.5. AAB plates were incubated at 30°C for 10 days. *Bacillus* were counted on Plate-Count-Agar (PCA) agar supplemented with 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride at 0.1 g/L (Merck KGaA). Ten milliliters of the tested solution were first heated at 80°C for 10 min before being poured on the surface of the medium (1 mL/plate). Yeasts and moulds were enumerated on Chloramphenicol-Glucose-Agar (CGA) agar, at 25°C for 48 h.

With the exception of de Man-Rogosa-Sharpe agar (MRS), all the media were incubated under aerobic conditions. Except when specifically indicated, all the media were purchased from Biokar diagnostics (France).

“Scrapings” and bacterial DNA extraction

When the number of microbial colonies counted was comprised between 50 and 500, 2 mL of physiological water were poured on the surface of the medium and the colonies were scraped off with a rake. This suspension was then centrifuged at 20,000 ×g for 3 min. Cells were washed with 1 mL of physiological water; this procedure was repeated twice.

For DNA extraction, the pre-lysis step was adapted to Nucleospin® Tissue kit (Macherey-Nagel, Germany). Twenty microliters of lysozyme (10% w/v, lysozyme from chicken egg white, Sigma, Germany) was added to the lysis buffer and incubated at 37°C for 30 min. Twenty microliters of RNase (1 g/L, Ribonuclease A, Sigma) were then added and the solution was kept at 37°C for 30 min. Finally, 30 µL of proteinase K (1 g/L) and 20 µL of SDS (Sodium Dodecyl Sulfate, 0.1 g/L) were added. The mix was first kept at 37°C for one night and then at 64°C for 30 min. For encapsulated bacteria DNA extraction, CTAB (CetylTrimethyl Ammonium Bromide, Sigma; 0.1 M Tris-HCL pH8, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA and 0.05 M) was added at the end of the lysis step (Mertens *et al.*, 2014; Moreira *et al.*, 2010; Yalçinkaya *et al.*, 2017).

REP-PCR amplification and profile analysis

Bacterial DNA was amplified as described by Dalmasso *et al.* (2008). REP-PCR was performed using Rep1 (5'-IIICGNCGNCATCNGGC-3') and Rep2 (5'-NCGNCTTATCNGGCCTAC-3') primers. DNA fragments were separated on agarose gel electrophoresis (1% in EDTA-buffer), after 4 h of migration at 80 mV. The 123 bp DNA Ladder (Merck KGaA) was used to determine band size. The band patterns were normalised and processed using GelCompar 3.1 software (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Diversity indices were calculated according to the Shannon and Weaver formula:

$$H = \sum P_i \log P_i$$

Where, P_i = number of profiles with 82% of similarity/total number of profiles

SPME/GC-MS analysis

Volatile compounds were analysed using the Solid-Phase MicroExtraction Gas-Chromatography technique (SPME/GC, 6890 Series GC System, Hewlett Packard), coupled with Mass-Spectrometry (MS, 5973 Mass Selective Detector, Hewlett Packard). Ten millilitres of supernatant were placed in a vial and heated at 60°C for 5 min. SPME-fiber was conditioned at 270°C for 30 min. Compounds were absorbed onto this fiber (SPME Fiber Assembly DVB/CAR/PDMS, Supelco, Sigma) at 60°C for 45 min. They were then desorbed and separated with a gradient of temperature according to Aggelopoulos *et al.* (2014). Helium was used as vector gas with a flow rate at 1 mL/min. Molecules were separated through a BPX 5 capillary column, 30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 µm, 5% diphenyl and 95% dimethylpolysiloxane (Phenomenex, Le Pecq, France). They were identified using Chemstation software by spectra comparison with NIST 05 and NIST 98 libraries.

Physicochemical parameters

pH of the supernatants was determined using a pH meter (HI 2211, pH/ORP Meter, Hanna instruments). Total phenolic contents were measured according to the methodology proposed by Kaprasob *et al.* (2017). Concentrations of citric, acetic and lactic acids, and ethanol were measured with enzymatic kits (R-Biopharm, Germany).

Statistical analyses

The influence of the parameters (temperature, grinding...) on the different factors we followed (organic acids, volatile molecules...) were tested according to a Multiple Linear Regression (MLR) procedure using the Modde V10 software (Sartorius Stedim Data Analytics AB Malmö, Sweden). The data gathered throughout the experiment (Shannon and Weaver diversity indices, levels of microbial populations, physicochemical measures), were analysed using the XLSTAT software.

3. Results and discussion

Microbial evolution during fermentation

As expected, the variations between the levels of the different populations were very slight on D0 (Figure 1A). The raw pulp was homogeneous, the standard deviation being lower than 0.5 log CFU/mL, irrespective of the microbial community considered. This observation was confirmed by Ascending Hierarchical Classification analysis which allowed us to highlight three groups of microorganisms (data not shown). LAB were preponderant in carrot pulps, their cell density ranging from 7.44 to 8.69 log CFU/mL. In raw vegetables, LAB are generally counted at lower levels - between 2 and 4 log CFU/mL (Di Cagno *et al.*, 2013; Paramithiotis *et al.*, 2010; Wouters *et al.*, 2013b). This implies that the pulps collected in the course of this experiment had already begun to ferment during the storage of the pulps in the plant. Enterococci, AAB, and yeasts and moulds were enumerated at sub-dominant levels - from 5.00 to 7.22 log CFU/mL. *Enterobacteriaceae*, *Bacillus* and *Pseudomonas* did not exceed 5.00 log CFU/mL in the carrot pulp ecosystem. The microbial diversity of raw vegetables and fruits has frequently been described. The authors observed dominant and constant populations generally composed of yeasts and fungi (2 to 6 log CFU/mL), *Enterobacteriaceae* (4 to 5 log CFU/mL) and *Pseudomonas* (no greater than 5 log CFU/mL). In raw vegetables, LAB were not so numerous, their concentration varying between 2 and 4 log CFU/mL. In our study, the microbial ecosystem composition was similar, except for Enterococci, which reached 5.3 log UFC/mL and rod shape and coccus shape LAB - 7.4 log CFU/mL.

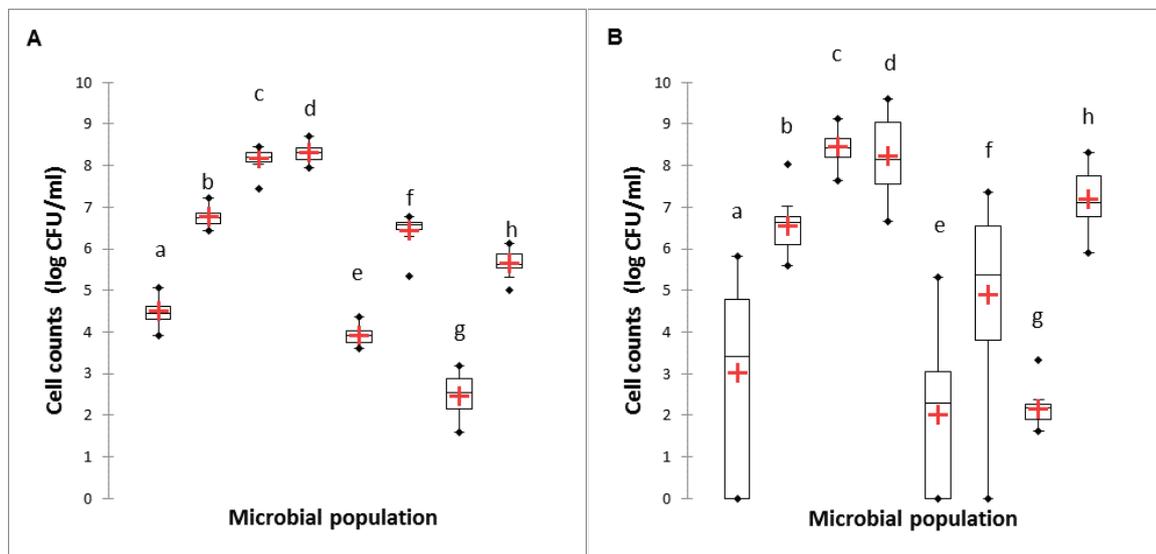


Figure 1: Levels of *Enterobacteriaceae* (a), yeasts and moulds (b), LAB (Lactic Acid Bacteria, rod shape) (c), LAB (coccus shape) (d), *Pseudomonas* (e), Enterococci (f), *Bacillus* (g) and Acetic Acid Bacteria (h), obtained from the 19 carrot pulp samples of the design (S1 to S19), at D0 (A) and D9 (B). Cell numbers are expressed in log CFU/mL.

After 9 days of fermentation, the development of the microbial populations under observation did not change significantly (Figure 1B). Some slight differences were noticed but the ratios between the populations remained roughly identical. LAB were still present at high levels - between 7.5 and 9.5 log CFU/mL. These results differ from the former data reported in the literature. Di Cagno *et al.* (2008) for instance investigated the capacity of LAB to develop in a carrot substrate, either after starter addition or based on the adventitious microflora. After 8 days of culture, they observed that the LAB level of the starter samples was close to 9.38 log CFU/mL whereas in the non-starter medium, this level was 1 000 to 10 000 times lower. The medium used by these authors was different from ours, which can explain these differences. For instance, the wastes they used (carrot juice, French beans or marrows) were first heated at 121°C for 10 min before fermentation.

Between D0 and D9, the extent of each population level varied greatly, especially for *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae* and Enterococci, which all decreased. In the case of the first two populations, a similar occurrence has also been observed by other authors; for example, in a leek fermented medium (Wouters *et al.*, 2013a). We can suppose that dominant LAB exerted a negative influence on the development of the other microbes. The level of AAB increased – the difference between D0 and D9 ranged from 0.3 to 2.35 log CFU/mL depending on the sample. Yeasts and moulds decreased slightly over the 9 days of fermentation (-0.5 log CFU/mL). These microorganisms have frequently been enumerated in vegetable raw materials (Di Cagno *et al.*, 2013). The development of *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae* and yeasts and moulds appeared to correlate (Principal Component Analysis, results not shown). This result concords with the observations made by Di Cagno *et al.* (2008).

REP-PCR profiles were performed by scraping off all the colonies obtained on the Petri dishes. As such, the profiles obtained can be considered as an image of the dominant and sub-dominant viable and culturable cells present in the pulps at a given step. An example of a profile is shown on Figure 2 for the rod shape LAB at D0 (Figure 2A) and D9 (Figure 2B). But the same procedure was carried out on all the media at the beginning and at the end of the fermentation step. Based on a coefficient of similarity of 82%, it was possible to calculate the diversity indexes for each bacterial community (Table 3). Three groups of behaviour were observed. For coccus shape LAB, Enterococci and *Bacillus*, the diversity indexes did not change from D0 to D9. They were very high for LAB and *Bacillus* flora, - respectively, $H_{D0} = 1.03$ and 0.98 and $H_{D9} = 1.01$ and 0.94 . However, as shown on Figure 2, the profiles obtained at D9 had changed compared with D0. While some bands were still present on D0 and D9 (250 pb and 900 pb), others had disappeared (1300 pb) or appeared (700 pb). We can then infer from these observations, that although the diversity remained stable, the LAB ecosystem had been partially renewed. According to Di Cagno *et al.* (2008), in vegetables and particularly in carrots, the species *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* is generally dominant during spontaneous fermentation. Wouters *et al.* (2013a) identified other LAB species during leek

fermentation, *Lactobacillus sakei*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Weissella soli* and *Leuconostoc gasicomitatum*. In both cases, the samples contained a similar level of LAB. *Lb. plantarum* is also commonly found in products resulting from spontaneous fermentations (Demarigny, 2012). For Enterococci (Figure 2C and 2D), except for one common band, the profiles obtained at D0 and D9 were different, meaning that the ecosystems of these two populations had almost completely changed as a consequence of the fermentation step. The same observation can be made for *Bacillus*.

The second group of profiles included the rod shape LAB, *Pseudomonas* and AAB populations. The diversity indexes decreased strongly concomitantly with a modification of the profiles.

The last group included the *Enterobacteriaceae* population, which seemed to adapt to the fermentation conditions. Indeed, while the counts showed a decrease in the number of cells, diversity increased.

It is noticeable that irrespective of the index evolution and whatever applied conditions, the final profiles obtained at D9 were identical, especially for the dominant populations. It shows that the dynamic of the microbial communities, in the range defined by the design we followed, was remarkably stable. Similar results have already been obtained on other substrates - vegetable wastes and cocoa bean vessels – by Lefeber *et al.* (2011), Liang *et al.* (2016) and Wouters *et al.* (2013b).

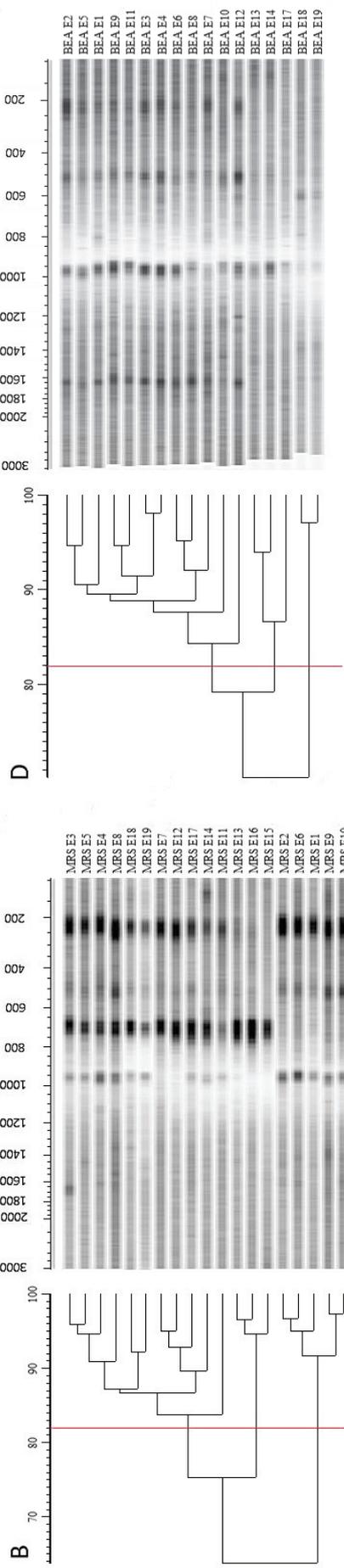
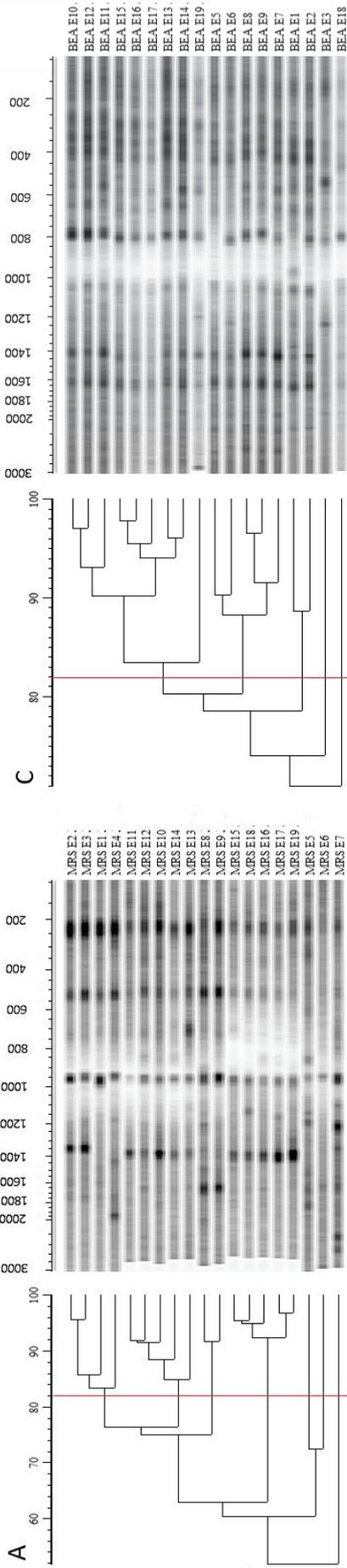
The presence of common bands on different profiles, for instance at around 1 000 pb for rod shape LAB and Enterococci at D9, allows us to think that it could correspond to the same population. Indeed, the media used are specifically selected to search for a genus we expect to encounter. It has been well known for a long time that Petri dishes give a crude image of the population being looked for (Gemelas *et al.*, 2013; Verdier-Metz *et al.*, 2012). The sequencing of these specific bands could be of further interest to identify in detail the populations concerned, and in doing so, we could evaluate the effectiveness of the methodology followed here.

Chapitre 5 : Fermentations spontanées des cinq sous-produits végétaux

Table 3: Shannon and Weaver diversity index (H); they were calculated for all bacterial communities, at D0 and D9 of fermentation, for the 19 fermentation samples of carrot pulps (S1 to S19).

Medium	Diversity index H
LAB (coccus shape) D0	1.03
LAB (coccus shape) D9	1.01
<i>Pseudomonas</i> D0	0.56
<i>Pseudomonas</i> D9	0.32
Enterococci D0	0.33
Enterococci D9	0.35
AAB D0	0.68
AAB D9	0.26
LAB (rod shape) D0	0.75
LAB (rod shape) D9	0.42
<i>Bacillus</i> D0	0.98
<i>Bacillus</i> D9	0.94
<i>Enterobacteriaceae</i> D0	0.23
<i>Enterobacteriaceae</i> D9	0.64

Chapitre 5 : Fermentations spontanées des cinq sous-produits végétaux



1

2Figure 2: REP-PCR profiles of carrot pulp samples, for rod shape LAB (Lactic Acid Bacteria, rod shape, A and B) and Enterococci (C and D), at D0 and D9, respectively. The coefficient of similarity 3(82%) is materialised by a vertical red line.

Physico-chemical parameters

Generally speaking, the pH of the samples decreased from D0 to D2, - from 4.03 to 3.73. Thereafter, the pH measures increased widely over the course of the fermentation period to reach 4.2 +/- 0.3 at the end of the fermentation step (Figure 3). It means that the samples evolved differently as the consequence of the parameters applied. The temperature in particular had a strong impact. This is the case for S3, S4 and S11 samples which were incubated at 37°C. Their final pH was respectively equal to 4.99, 4.91 and 4.51, 0.5 to 0.8 unit above the mean of the other samples. Di Cagno *et al.* (2008) observed the same variations on carrot media amended with an autochthonous LAB starter.

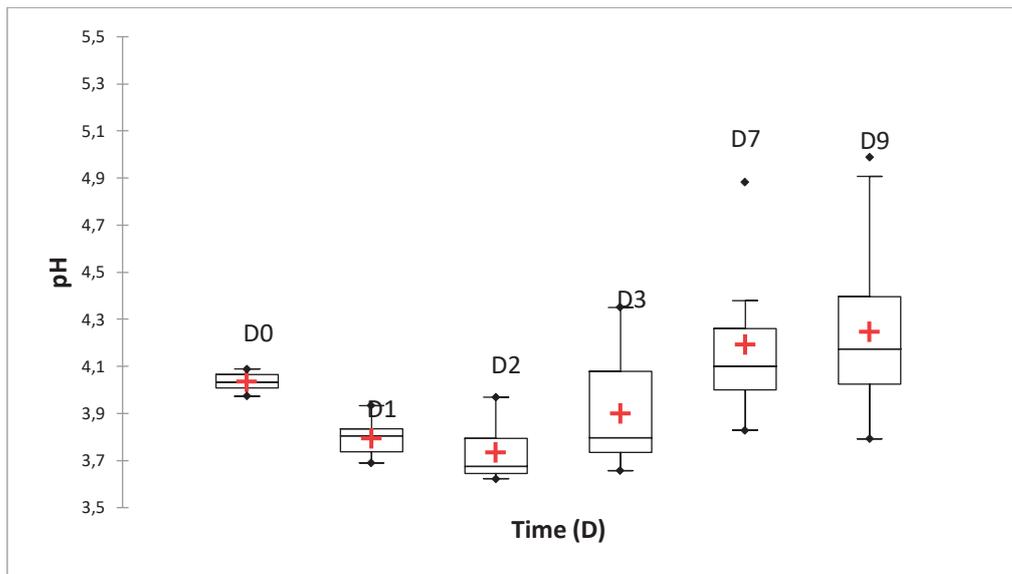


Figure 3: Change in pH during the fermentation of the 19 carrot pulp samples of the design (S1 to S19), from D0 at D9.

Citric acid, a compound frequently found in plant cells, was never detected in the supernatant. We can suppose that citric acid was either consumed or was not available for microbes and remained in the solid matters of the samples. Acetic acid concentration was highest at D3, with a mean of 319 mg/L. Thereafter, the rate decreased to stabilise at 190 mg/L after nine days. At D2, D and L-lactic acid were as high as 254 mg/L and 177 mg/L, respectively. The presence of these two acids seemed to correlate with the evolution of pH, even if no significant relation was observed. The presence of lactic and acetic acids, and ethanol was also reported during pulp carrot fermentation by Wouters *et al.* (2013a). But unlike what these authors found, in our case, acetic acid concentration was higher than that of lactic acid after 9 days of incubation. The rate of phenolic compounds remained stable during the whole fermentation step, at around 4.5 g gallic acid equivalent/L.

Evolution of the volatile compound composition from the beginning to the end of the fermentation step

Among the 208 chemical compounds obtained after static head space analysis, 24 molecules proved to be well identified with a high degree of proficiency (a minimum of 50% for the identification quality index). They were associated with fruity, sweet, and vegetable flavors (Table 4, Acree and Arn, 2012; Kim *et al.*, 2015). A first Principal Component Analysis (PCA), carried out with the 24 chemical compounds listed on Supplement Table S1, allowed us to find five molecules able to significantly differentiate the different samples: ethanol, 2-butanol, P-cymene (also named: 1-methyl-4-(1-methylethyl)benzene) and 2,5-bis(1,1-dimethylethyl)phenol). The fifth molecule was detected in 32 samples out of 38 but the molecules library proposed different identifications: 2-mercapto-4-phenylthiazole or 1-aminoanthracene or 9-phenantrenamine, which were difficult to associate with chemical reactions observed in fermented products. A second PCA was performed using these five molecules: the samples (D0 + D9) were separated into two sub-groups (Figure 4). Sub-group 1 was characterised by the presence of 2-butanol for all “D9” samples, except S3 and S9. This was reflected by an increase in the relative area of the peak of 2-butanol from 0% to 2.59% on D0, to 3.48% to 17.87% on D9. S3 and S9 samples were not ground and no water was added. 2-butanol is associated with a wine flavour and classified as a food additive – it is a flavouring agent - by the European Union. In the literature, *Clostridium acetobutylicum* and *C beijerinckii* are frequently described as 2-butanol producing microorganisms, as well as yeasts (Lee *et al.*, 2008; Maiti *et al.*, 2016; Steen *et al.*, 2008). However, the presence of Clostridia appears doubtful in our media: the redox potential is incompatible with the metabolic requirements of these bacteria. The second group of molecules encompassed the samples at D0, and S3 and S9 at D9. This group was characterised by the presence of ethanol and p-Cymene. P-cymene is described as an aromatic organic compound, used as a flavouring agent and involved in the elaboration of citrus flavors. It could originate from the carrots and probably accumulated as a consequence of the action of microorganisms (Vikram *et al.*, 2006).

Chapitre 5 : Fermentations spontanées des cinq sous-produits végétaux

Table 4: Flavours associated with molecules identified during carrot pulp fermentation (Acree and Arn, 2012; Kim et al., 2015).

Flavour	Compounds (PubChem name)
Sweet	ethanol, caryophyllene
Vegetable	octanal, caryophyllene (moss, earth), geranylacetone (mouldy)
Fruity	ethyl acetate (pineapple), isobutanol (wine), ethyl butyrate (apple), ethyl valerate, heptanal (citrus), ethyl caproate, octanal (citrus), O/P/M-cymene (citrus), ethyl octanoate, geranylacetone (tomato)
Others	2-butanol (solvent), isobutanol (solvent), heptanal (fat, rancid), ethyl caproate (dairy produce), octanal (fat), ethyl octanoate (dairy produce)

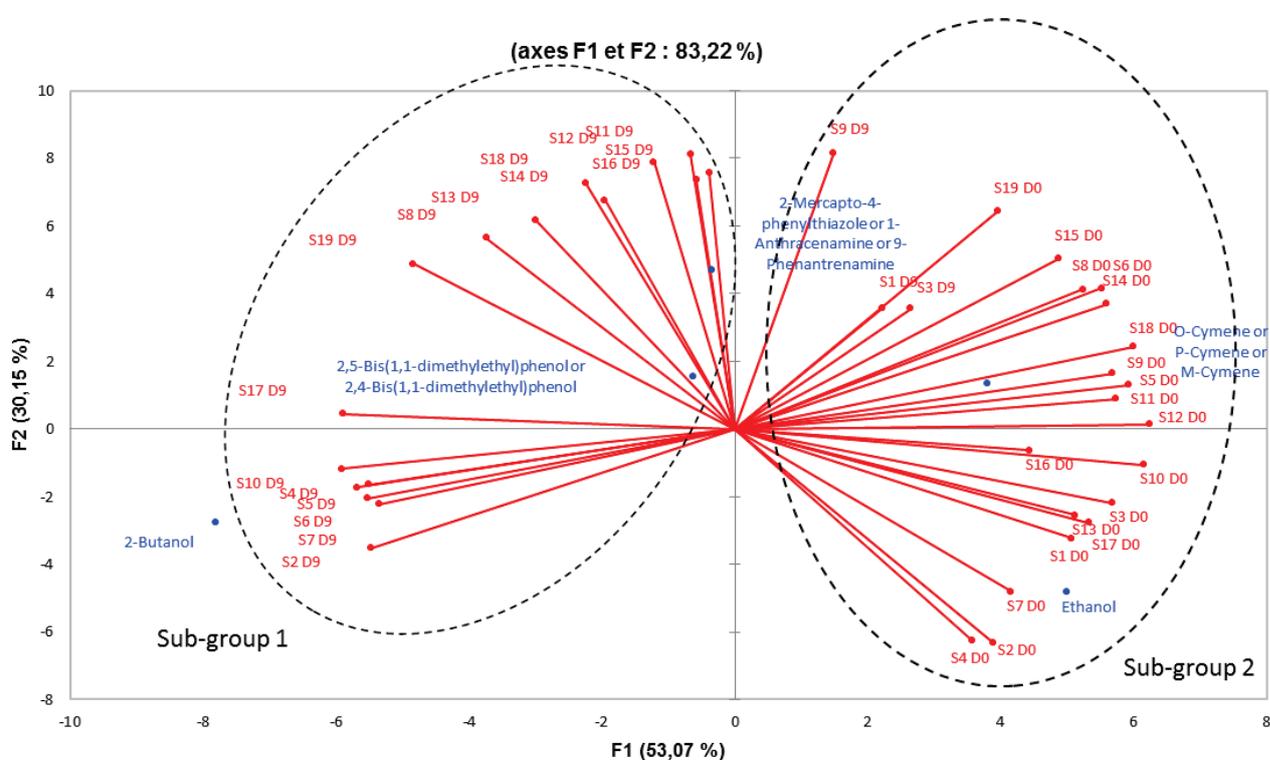


Figure 4: Principal Component Analysis made on the five significant molecules obtained after SPME analysis of the 19 samples analysed at D0 and D9.

Usually, the valorisation of vegetable wastes necessitates a chemical, mechanical or physical pre-treatment to improve the production yield of interesting molecules (Laufenberg *et al.*, 2003). And these processes can generate additional wastes, or consume large quantities of energy. These downsides have encouraged exploration into the reduction of chemical and microbial inputs (Lin and Tanaka, 2006). In our case, our results led us to deduce that the spontaneous fermentation of carrot pulps did not allow significant levels of chemical compounds to be obtained. This observation has to

be examined alongside the great stability of the ecosystem highlighted above. The experimental design probably did not go far enough in destabilising the carrot pulp to obtain interesting molecules.

Results of the experimental design

The parameters tested – culture temperature, grinding, water addition, refreshment – were analysed according to a Multiple Linear Regression (MLR) procedure, the physico-chemical data being used as responses. Whatever molecule measured or step considered, the negative influence of temperature was nearly systematically observed. This means that a rise in temperature led to a decrease in the production of mainly acetic acid, and consequently titratable acidity, ethanol and to a lesser extent D-lactic acid. We can propose two explanations: the two former molecules being volatile, the amount lost to evaporation was all the greater as the temperature rose higher. But, we could also suppose that microorganisms were used to living at low temperatures (between 15 and 20°C). Consequently, their metabolism was not adapted to higher values. It is noteworthy that a strong correlation was observed between the rod shape LAB level ($r > 0,8$) and ethanol, D-lactic and L-lactic acid, and acetic acid. This means that the amount of these substances mainly resulted from the metabolic activity of LAB. In a sense, if we are looking to obtain specific compounds, we will have to reduce the influence of this microflora or promote fermentation by the controlled addition of starters.

Considering the other factors, the addition of water systematically led to a significant reduction in the concentration of the products measured; we can suppose this is the result of water's diluting effect. This was particularly significant in the case of phenolic compounds: increasing the amount of water in the fermentation medium led to a concomitant diminution of the concentration of these molecules. The same observation could be made for the influence of refreshing the fermentation medium. Concerning the effect of grinding, no influence was noticed.

4. Conclusion

In this study, we investigated the use of carrot pulps to produce various compounds after spontaneous fermentation. Despite varying physico-chemical conditions, the pulp ecosystem proved to be stable, with a large domination of the presumed LAB and their metabolism. As a consequence, the parameters tested (organic acids, volatile molecules, ...) did not change a lot or were influenced by the direct effect of the factors tested on this dominant population. 2-butanol and p-cymene were frequently present. 2-butanol was mostly found at the end of the fermentation step; and the second substance might not be associated with a known bacterial metabolism. We can argue that the conditions applied were not harsh enough to destabilise the microbial populations to promote changes of physico-chemical parameters. In the future, we propose to use carrot pulps as a culture medium after addition of selected microbes known to exhibit interesting features: enzymes, aroma,

biosurfactants, etc. Alternatively, we can also propose to apply harsher conditions (high temperatures, low pH) to observe the behaviour of microbial populations and its ability to produce metabolic substances.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Endowment Fund “TERRA ISARA”, and the five food companies which have participated in this program: Charles et Alice, Florette Holding, Panzani, Philibert Savours, Pierre Martinet. The author would like to thank Carl Holland for English revision.

References

Abu Yazid, N., Barrena, R., Komilis, D., & Sánchez, A. (2017). solid-state fermentation as a novel paradigm for organic waste valorization: a review. *Sustainability*, 9, 224.

Acree, T., & Arn, H. (2012). Flavornet and human odor space. Retrieved August 23, 2018. Available online at: <http://www.flavornet.org/>

Aggelopoulos, T., Katsieris, K., Bekatorou, A., Pandey, A., Banat, I. M., & Koutinas, A. A. (2014). Solid state fermentation of food waste mixtures for single cell protein, aroma volatiles and fat production. *Food Chemistry*, 145, 710-716.

Banerjee, J., Singh, R., Vijayaraghavan, R., MacFarlane, D., Patti, A. F., & Arora, A. (2017). Bioactives from fruit processing wastes: Green approaches to valuable chemicals. *Food Chemistry*, 225, 10-22.

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. *International Journal of Food Science & Technology*, 47, 2469-2476.

Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2013). Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiology*, 33, 1-10.

Di Cagno, R., Surico, R. F., Siragusa, S., De Angelis, M., Paradiso, A., Minervini, F., Gobbetti, M. (2008). Selection and use of autochthonous mixed starter for lactic acid fermentation of carrots, French beans or marrows. *International Journal of Food Microbiology*, 127, 220-228.

Eş, I., Mousavi Khaneghah, A., Barba, F. J., Saraiva, J. A., Sant’Ana, A. S., & Hashemi, S. M. B. (2018). Recent advancements in lactic acid production - a review. *Food Research International*, 107, 763-770.

FAO. (2013). Food wastage footprint. Impacts on natural resources. Summary report. FAO, 1-63.

Gemelas, L., Rigobello, V., Ly-Chatain, M. H., & Demarigny, Y. (2013). Selective *Lactococcus* enumeration in raw milk. *Food and Nutrition Sciences*, 4, 49-58.

Kaprasob, R., Kerdchoechuen, O., Laohakunjit, N., Sarkar, D., & Shetty, K. (2017). Fermentation-based biotransformation of bioactive phenolics and volatile compounds from cashew apple juice by select lactic acid bacteria. *Process Biochemistry*, 59, 141-149.

Kim, S., Thiessen, P., Bolton, E., Fu, G., Gindulyte, A., Han, L., ... Bryant, S. (2015). PubChem substance and compound databases. Retrieved August 23, 2018. Available online at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

Laufenberg, G., Kunz, B., & Nystroem, M. (2003). Transformation of vegetable waste into value added products: *Bioresource Technology*, 87, 167-198.

Lee, S. Y., Park, J. H., Jang, S. H., Nielsen, L. K., Kim, J., & Jung, K. S. (2008). Fermentative butanol production by clostridia. *Biotechnology and Bioengineering*, 101, 209-228.

Lefeber, T., Gobert, W., Vrancken, G., Camu, N., & De Vuyst, L. (2011). Dynamics and species diversity of communities of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria during spontaneous cocoa bean fermentation in vessels. *Food Microbiology*, 28, 457-464.

Liang, S., Gliniewicz, K., Gerritsen, A. T., & McDonald, A. G. (2016). Analysis of microbial community variation during the mixed culture fermentation of agricultural peel wastes to produce lactic acid. *Bioresource Technology*, 208, 7-12.

Lin, Y., & Tanaka, S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69, 627-642.

Maiti, S., Sarma, S. J., Brar, S. K., Le Bihan, Y., Drogui, P., Buelna, G., & Verma, M. (2016). Agro-industrial wastes as feedstock for sustainable bio-production of butanol by *Clostridium beijerinckii*. *Food and Bioproducts Processing*, 98, 217-226.

Dalmasso, M., Pierre S., Rigobello V., & Demarigny Y. (2008). Evolution of the raw cow milk microflora, especially Lactococci, Enterococci, Leuconostocs and Lactobacilli over a successive 12 day milking regime. *International Journal of Dairy Science*, 3, 117-130.

Mertens, K., Freund, L., Schmoock, G., Hänsel, C., Melzer, F., & Elschner, M. C. (2014). Comparative evaluation of eleven commercial DNA extraction kits for real-time PCR detection of *Bacillus anthracis* spores in spiked dairy samples. *International Journal of Food Microbiology*, 170, 29-37.

Moreira, M., Noschang, J., Neiva, I. F., Carvalho, Y., Higuti, Ilma H., & Vicente, V. A. (2010). Methodological variations in the isolation of genomic DNA from *Streptococcus* bacteria. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53, 845-849.

Pandey, A., Soccol, C. R., & Mitchell, D. (2000). New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry*, 35, 1153-1169.

Papalexandratou, Z., Lefeber, T., Bahrim, B., Lee, O. S., Daniel, H.-M., & De Vuyst, L. (2013). *Hanseniaspora opuntiae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum*, and *Acetobacter pasteurianus* predominate during well-performed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these microbial species for a successful cocoa bean fermentation process. *Food Microbiology*, 35, 73-85.

Paramithiotis, S., Hondrodinou, O. L., & Drosinos, E. H. (2010). Development of the microbial community during spontaneous cauliflower fermentation. *Food Research International*, 43, 1098-1103.

Steen, E. J., Chan, R., Prasad, N., Myers, S., Petzold, C. J., Redding, A., ... Keasling, J. D. (2008). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of n-butanol. *Microbial Cell Factories*, 7, 36.

Tang, J., Wang, X., Hu, Y., Zhang, Y., & Li, Y. (2016). Lactic acid fermentation from food waste with indigenous microbiota: Effects of pH, temperature and high OLR. *Waste Management*, 52, 278-285.

Vandenbergh, L. P. S., Karp, S. G., de Oliveira, P. Z., de Carvalho, J. C., Rodrigues, C., & Soccol, C. R. (2018). Solid-state fermentation for the production of organic acids. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (p. 415-434). Elsevier.

Verdier-Metz, I., Gagne, G., Bornes, S., Monsallier, F., Veisseire, P., Delbès-Paus, C., & Montel, M.-C. (2012). Cow teat skin, a potential source of diverse microbial populations for cheese production. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 326-333.

Vikram, A., Lui, L. H., Hossain, A., & Kushalappa, A. C. (2006). Metabolic fingerprinting to discriminate diseases of stored carrots. *Annals of Applied Biology*, 148, 17-26.

Wadhwa, M., & Bakshi, M. P. S. (2013). Utilization of fruit and vegetable wastes as livestock feed and as substrates for generation of other value added products. *Rap Publication*, 4.

Wouters, D., Bernaert, N., Conjaerts, W., Van Droogenbroeck, B., De Loose, M., & De Vuyst, L. (2013a). Species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of spontaneous leek fermentations. *Food Microbiology*, 33, 185-196.

Wouters, D., Grosu-Tudor, S., Zamfir, M., & De Vuyst, L. (2013b). Bacterial community dynamics, lactic acid bacteria species diversity and metabolite kinetics of traditional Romanian vegetable fermentations: Romanian spontaneous vegetable fermentations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 749-760.

Yalçinkaya, B., Yumbul, E., Mozioglu, E., & Akgöz, M. (2017). Comparison of DNA extraction methods for meat analysis. *Food Chemistry*, 221, 1253-1257.

Youssef, N. H., Duncan, K. E., Nagle, D. P., Savage, K. N., Knapp, R. M., & McInerney, M. J. (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 56, 339-347.

5.3. Fermentations spontanées des cinq sous-produits végétaux

En complément de la phase exploratoire initiée au départ du projet, l'objectif de cette partie était de suivre la fermentation spontanée des cinq sous-produits, soumis à des conditions d'incubation (température, broyage, rafraîchissement et humidité) différentes. La démarche expérimentale utilisée a été construite à partir des résultats obtenus pour la fermentation de pulpe de carottes et est décrite dans le paragraphe 5.2.2. L'évolution des fermentations a été suivie au cours du temps par mesure du pH, de l'acidité titrable et des taux des flores adventices fréquemment associées à ce processus (ex : flores lactiques). De plus, la comparaison des profils REP-PCR des différentes communautés microbiennes, au départ et après neuf jours de fermentation, permet d'observer l'effet du biotope sur ce critère.

5.3.1. Résultats

5.3.1.1. Construction de la démarche utilisée pour la fermentation spontanée des cinq sous-produits végétaux

Le plan factoriel utilisé précédemment (partie 5.2.2.) pour la fermentation spontanée de pulpe de carottes comprenait 19 essais. Comme pour ce sous-produit, l'objectif était d'observer l'effet des variables de culture : température d'incubation, pourcentage en eau ajouté, rafraîchissement et broyage sur les cinq sous-produits végétaux. Placer les matrices dans des conditions similaires de culture a également permis d'évaluer l'effet de la nature du sous-produit lors de la fermentation spontanée. Afin de répondre aux objectifs fixés et pour des raisons de temps, le plan d'expérience

factoriel complet ne pouvait pas être testé pour chacune des matrices. Un plan d'expérience simplifié a donc été construit. Les teneurs en composés phénoliques, en acides organiques, le pH, l'acidité titrable, d'éthanol et les dénombrements des différents types de micro-organismes cultivables des essais de pulpe de carottes fermentée spontanément ont été traités par Classification Ascendante Hiérarchique (CAH, Figure 21).

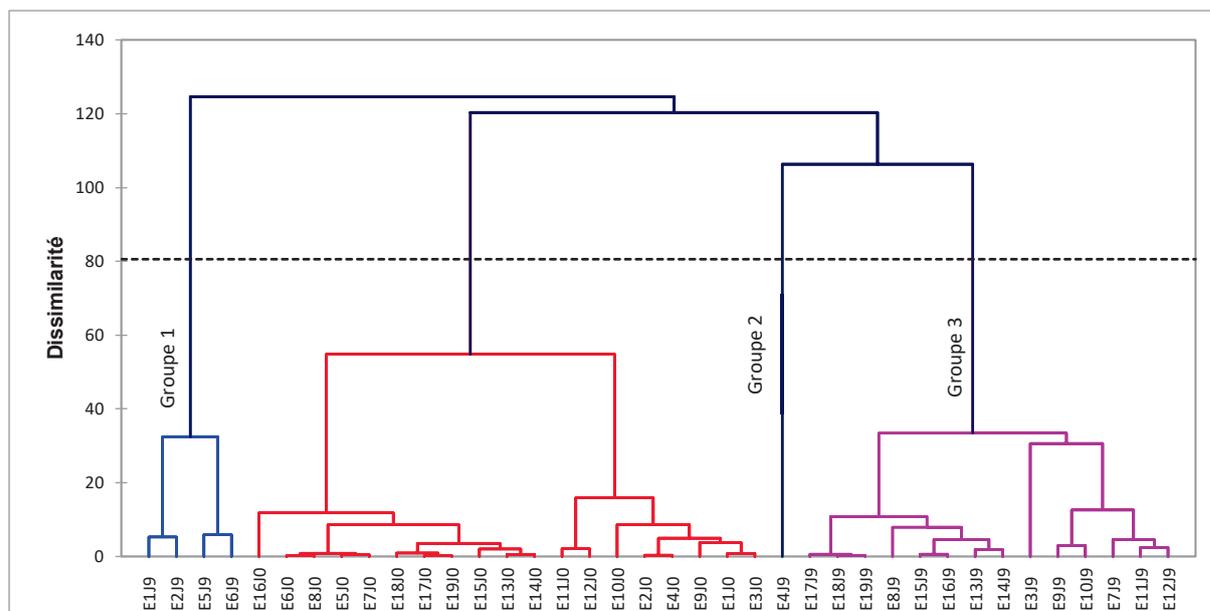


Figure 21 : Classification Ascendante Hiérarchique des résultats de fermentation spontanée observés à partir du sous-produit de pulpe de carottes, au départ (J0) et après neuf jours (J9). Les conditions de culture appliquées aux différents échantillons sont répertoriées dans le Tableau 2.

Les données à l'état initial et après neuf jours de fermentation spontanée ont été analysées afin de tenir compte de l'évolution des réponses au cours du temps. Le but était d'identifier les conditions de culture mettant en avant une dissimilarité entre les données et les essais. Cette analyse met en évidence quatre groupes homogènes, matérialisés par un seuil de dissimilarité de 80.

Les quatre groupes identifiés séparent l'ensemble des essais à J0 des essais après neuf jours de fermentation. Excepté pour les échantillons E17/E18 et E19, la combinaison des différentes conditions de fermentation est spécifique à chaque essai. Il n'est donc pas possible d'identifier une modalité identique à l'ensemble des essais d'un groupe, après analyse par CAH. Cependant, des tendances peuvent être observées pour les trois groupes formés à partir des résultats à J9 :

- Groupe 1 (bleu clair, Figure 21) : il regroupe les échantillons incubés à 24°C et non rafraîchis. D'après les réponses mesurées, les quantités d'acides acétique (de 291 à 520 mg/L de

surnageant), D-lactique (de 9 à 53 mg/L de surnageant) et L-lactique (de 62 à 218 mg/L de surnageant), et d'éthanol (pour E1 et E2 : 54 et 75 mg/L de surnageant) étaient parmi les plus élevées pour ces échantillons. Les conditions de culture semblaient également favoriser la croissance des flores présumées : *Enterococcus* (de $1,2 \cdot 10^7$ log UFC/ml et $2,3 \cdot 10^7$ log UFC/mL), *Lactobacillus* (de $6,4 \cdot 10^8$ log UFC/mL à $1,3 \cdot 10^9$ log UFC/mL), *Pseudomonas* (de $5 \cdot 10^2$ log UFC/mL à $2,1 \cdot 10^5$ log UFC/mL), et les bactéries acétiques (de $1,3 \cdot 10^7$ log UFC/mL à $1,4 \cdot 10^8$ log UFC/mL).

- Groupe 2 (bleu foncé, Figure 21) : E4J9 est le seul échantillon incubé à 37°C et broyage, qui n'a pas été dilué par ajout d'eau au départ, ou par des rafraîchis. D'après les résultats bruts considérés pour l'analyse. Cet échantillon présentait les taux les plus élevés d'*Enterobacteriaceae* ($6,6 \cdot 10^5$ log UFC/mL), de levures et de moisissures ($1,1 \cdot 10^8$ log UFC/mL), et de bactéries acétiques ($2 \cdot 10^8$ log UFC/mL). De plus, la quantité de composés phénoliques mesurée était la plus importante.
- Groupe 3 (violet, Figure 21) : il regroupe l'ensemble des essais dilués (exceptés E5 et E6, pour lesquels la pulpe de carottes a été diluée au 1/2) par ajout d'eau au départ de la fermentation ou le nombre de rafraîchis appliqué. Toujours d'après les données brutes, les échantillons non dilués au départ, mais rafraîchis deux fois (E9/E10/E11 et E12) présentaient des taux plus élevés de Flore Lactique Mésophile (FLM) après fermentation, compris entre $2,7 \cdot 10^9$ log UFC/mL et $3,4 \cdot 10^9$ log UFC/mL.

L'analyse des résultats par CAH est cohérente avec les conclusions observées dans le chapitre précédent. La température et la dilution des échantillons semblent orienter l'évolution des écosystèmes. La discussion du premier article commente l'effet de ces deux paramètres en mentionnant que pour les modalités d'incubation définies, la température de 24°C favoriserait le développement des flores lactiques, dont les *Enterococcus* et les *Lactobacillus* présumés, et *in fine* la fermentation lactique et la production d'acides organiques. Dans le cas de matrices peu riches en eau, l'ajustement de l'humidité peut déterminer le développement microbien. Pour la pulpe de carottes, il semble que l'ajout d'eau initial et le rafraîchissement du surnageant, au cours de la fermentation, aient un effet diluant. Cette méthode a été utilisée dans le but de classer les échantillons et construire un plan d'expérience pour la fermentation des cinq matrices végétales, sur la base des résultats obtenus à partir de la pulpe de carottes fermentée. Les quatre groupes ont donc permis de définir les quatre conditions de fermentation appliquées aux cinq sous-produits végétaux. Ainsi, pour chaque variable de culture, le niveau le plus fréquent a été retenu. Par exemple, les résultats ont montré que l'ensemble des échantillons du groupe 1 (Figure 21), avaient été incubés à 24°C. Cette modalité a donc été appliquée pour la seconde condition de fermentation (code d'expérience : E2, Tableau 6). Lorsque

les fréquences entre deux niveaux, pour une même variable, étaient identiques, la valeur de l'essai au centre de la classe était conservée. Sur la base des conclusions obtenues dans le chapitre 4, le pourcentage d'eau additionnée a été ajusté selon la nature du sous-produit. Des valeurs haute, basse et intermédiaire ont été définies. L'ensemble des conditions définies sont détaillées dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Plan d'expérience appliqué lors de la fermentation spontanée des cinq sous-produits végétaux (n=1).

Code expérience	Sous-produit	Broyage	Température d'incubation (°C)	Pourcentage d'eau ajouté (p/p)	Nombre de rafraîchis (J+3 et J+7)
E1L	Levain de germe de blé	Sans	30,5	25	1
E2L	Levains de germe de blé	Avec	24	50	0
E3L	Levain de germe de blé	Sans	37	50	2
E4L	Levain de germe de blé	Avec	37	0	0
E1B	Son de blé	Sans	30,5	75	1
E2B	Son de blé	Avec	24	90	0
E3B	Son de blé	Sans	37	90	2
E4B	Son de blé	Avec	37	50	0
E1S	Epluchures de salades	Sans	30,5	25	1
E2S	Epluchures de salades	Avec	24	50	0
E3S	Epluchures de salades	Sans	37	50	2
E4S	Epluchures de salades	Avec	37	0	0
E1C	Pulpe de carottes	Sans	30,5	25	1
E2C	Pulpe de carottes	Avec	24	50	0
E3C	Pulpe de carottes	Sans	37	50	2
E4C	Pulpe de carottes	Avec	37	0	0
E1P	Peau de pommes	Sans	30,5	25	1
E2P	Peau de pommes	Avec	24	50	0
E3P	Peau de pommes	Sans	37	50	2
E4P	Peau de pommes	Avec	37	0	0

5.3.1.2. Comparaison globale des sous-produits bruts

L'Analyse Factorielle Multiple (AFM) en Figure 22 a été réalisée à partir des mesures de pH, d'acidité titrable et des charges de micro-organismes cultivables dénombrées pour les différentes flores, pour l'ensemble des sous-produits bruts. Ses deux premières dimensions représentent 44,5% de la variance totale.

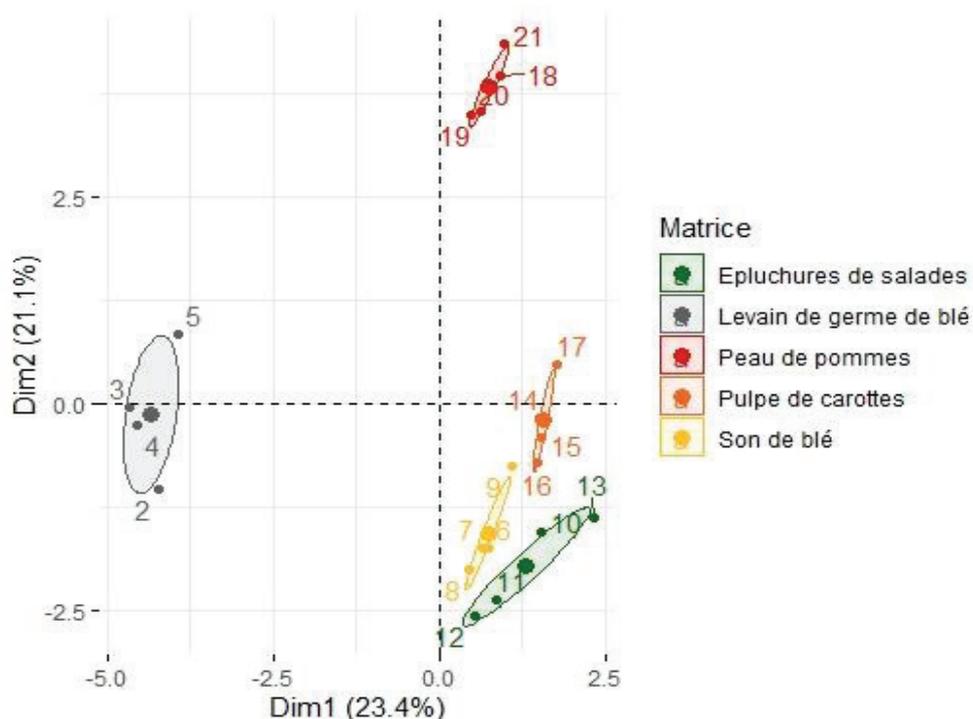


Figure 22 : Analyse de facteurs multiples des cinq sous-produits végétaux, au départ de la fermentation.

La projection des ellipses de confiance met en avant le regroupement des essais selon la nature du sous-produit. Les échantillons de « levain de germe de blé » sont séparés des autres matrices par l'axe factoriel 2 (Dim 2 = 21,1%). Les essais sur peaux de pommes sont séparés par l'axe factoriel 1 (Dim 1 = 23,4%) du reste des sous-produits. Bien que les sous-produits de son de blé, de pulpe de carottes et d'épluchures de salades semblent proches sur la base de ces critères, les essais sont regroupés significativement selon la nature de la matrice. Parmi les variables de culture, la nature du sous-produit contribue majoritairement aux axes factoriels, respectivement à hauteur de 19,6 et 21,1%. A ce stade, elle est la variable la plus susceptible d'avoir un effet sur les réponses mesurées. Les variables broyage, température d'incubation, pourcentage d'eau ajouté et rafraîchissement expliquent les axes à des niveaux inférieurs à 3,8%, quel que soit l'axe considéré. Bien que le broyage et l'ajout d'eau aient des effets destructif et diluant, ils n'expliquent pas les différences entre les essais de fermentation. D'après le graphique des variables actives, les réponses mesurées sont bien représentées sur le plan. Celui-ci semble mettre en avant une forte corrélation entre le pH et les taux de *Pseudomonas*. D'un point de vue du biotope, l'axe 1 est lié à l'acidité titrable (coefficient de corrélation = -0.893). En termes de valeurs brutes, ceci se traduit par des quantités équivalentes d'acide lactique plus importantes pour le sous-produit de levain de germe de blé, avec une moyenne de 3,85 g d'acide lactique/L de surnageant. L'acidité titrable moyenne des essais sur peaux de pommes est de 0,66 g équivalent acide lactique/L de surnageant. Enfin, celle-ci est comprise entre 0,22 et 0,05 g équivalents acide lactique/L de surnageant pour les sous-produits de pulpe de carottes, de son

de blé et d'épluchures de salades. La composition de la biocénose, au départ de la fermentation est également variable. Les levures et les moisissures, et les *Lactobacillus* présumés, sont notamment fortement corrélées et retrouvées dans des quantités plus importantes pour les essais issus de peaux de pommes.

5.3.1.3. Evolution physico-chimique de l'environnement fermentaire

Les sous-produits de levain de germe de blé, de peau de pommes, de pulpe de carottes, de son de blé et d'épluchures de salades avaient des valeurs moyennes de pH respectivement égales à 3,84 - 3,93 - 6,19 - 6,50 et 7,46.

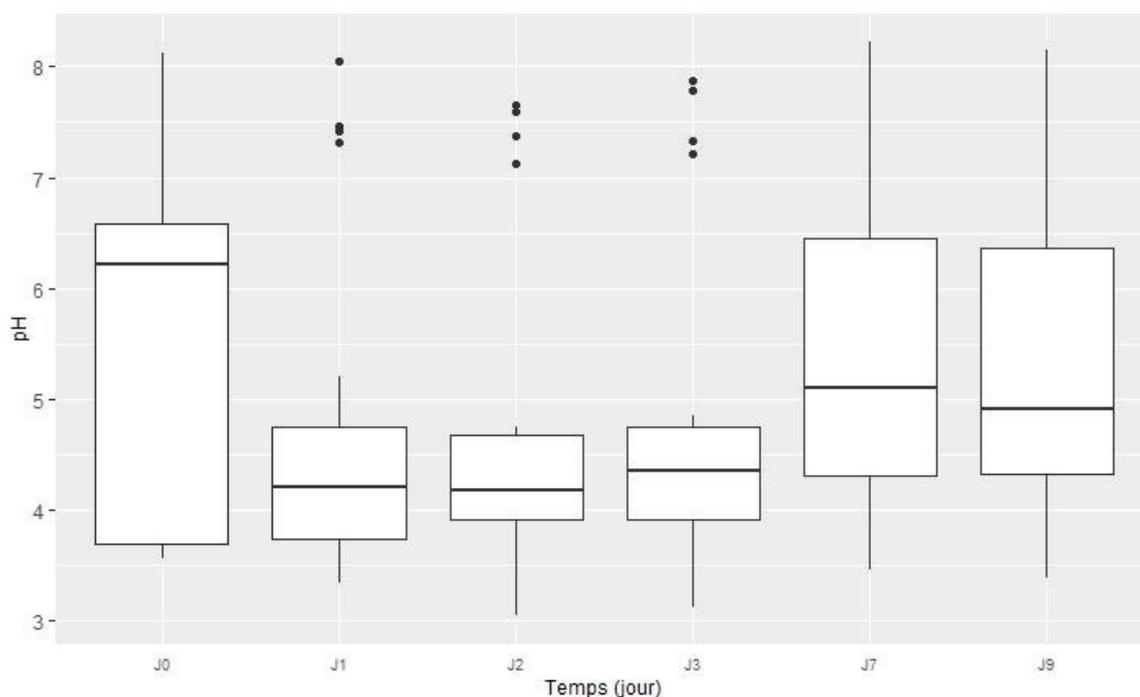


Figure 23 : Evolution du pH au cours du temps, pour les cinq sous-produits végétaux placés à des conditions variables d'incubation (broyage, température, pourcentage d'eau ajouté et rafraîchissement). Les boxplot représentent les 20 essais menés, soit les quatre combinaisons de culture testées pour chaque matrice.

Il y a donc une hétérogénéité du pH au départ de la fermentation, liée à la nature des sous-produits. A priori, le pH acide du levain de germe de blé résulte de sa fermentation. En comparant l'ensemble des essais au cours du temps, une diminution du pH est observée dès le premier jour de fermentation (Figure 23). Pour l'ensemble des matrices, sauf les épluchures de salades, les mesures sont comprises entre 3,3 et 5,2. Les épluchures de salades se distinguent par un pH supérieur à 7, quelles que soient les conditions de culture appliquées. La diminution du pH s'accompagne d'une augmentation de l'acidité titrable plus ou moins importante en fonction des essais considérés. Bien que l'acidité titrable soit plus importante au départ pour le sous-produit de levain de germe de blé, elle diminue au cours du temps (Figure 23).

Une augmentation plus importante de l'acidité a été observée pour les sous-produits de son de blé et de peau de pommes (Figure 24).

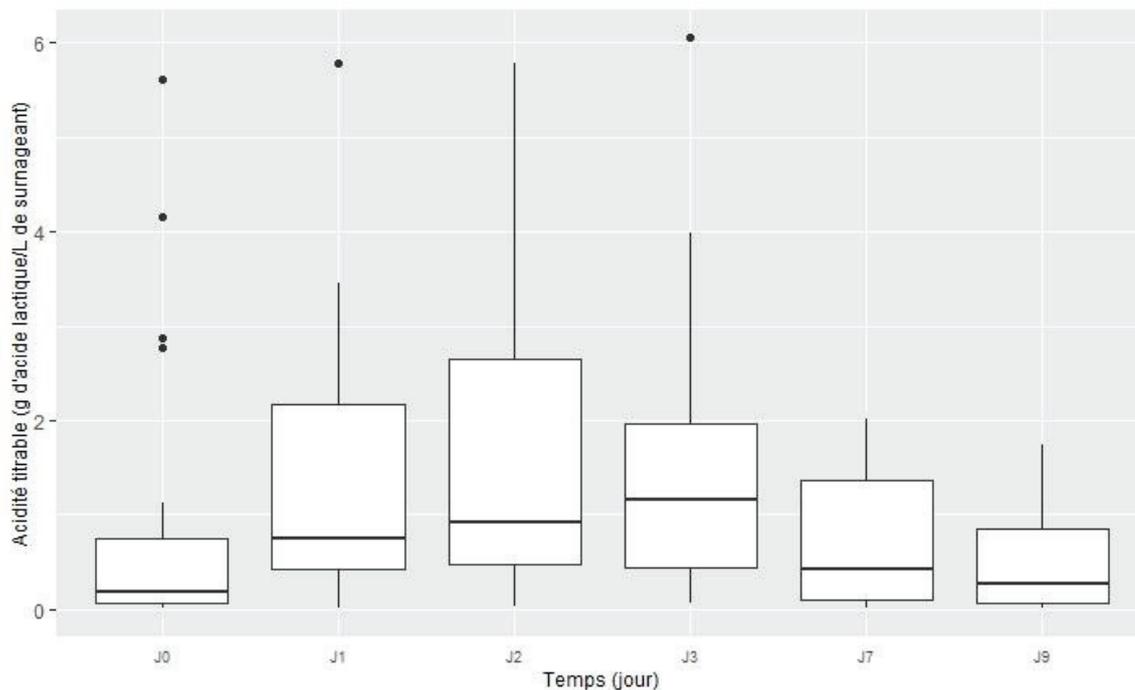


Figure 24 : Evolution de l'acidité titrable au cours du temps, pour les cinq sous-produits végétaux placés dans des conditions variables d'incubation (broyage, température, pourcentage d'eau ajouté et rafraîchissement). Les boxplot représentent les 20 essais menés, soit les quatre combinaisons de culture testées pour chaque matrice.

Pour les deux matrices, la quantité maximale d'acides organiques produite était obtenue après deux jours de fermentation spontanée, avec un broyage initial, une température d'incubation de 37°C, une absence de rafraîchissement et des pourcentages d'eau ajoutés respectivement égaux à 50% et 0% (conditions d'incubation E4B et E4P, Tableau 6). Les quantités équivalentes d'acide lactique sont d'environ 6 g/L de surnageant de peau de pommes, et 3 g/L de surnageant de son de blé (Figure 25). Pour le sous-produit de pulpe de carottes, les quantités obtenues étaient moindres mais maximales aux mêmes conditions d'incubation que pour la peau de pommes. Pour les épluchures de salades, dont le pH est resté stable au cours du temps, l'acidité titrable n'a pas varié. Sur la base de ces deux réponses, les conditions d'incubation testées ne semblent pas favoriser la fermentation spontanée des épluchures de salades.

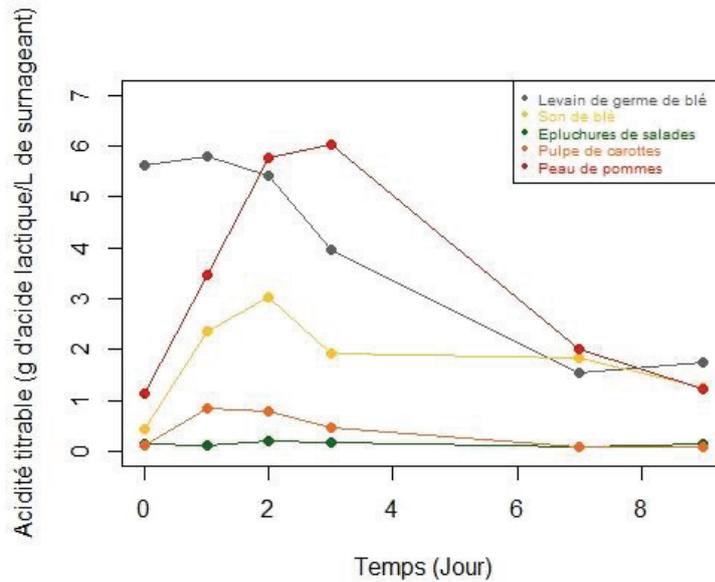


Figure 25 : Evolution de l'acidité titrable au cours du temps pour les cinq sous-produits végétaux. La figure représente les essais broyés, placés à une température d'incubation de 37°C, avec un pourcentage faible d'eau ajoutée (0% ou 50% pour le sous-produit de son de blé) et non rafraîchi.

En complément du suivi de l'acidité des milieux de fermentation, il est intéressant d'observer les flores microbiennes qui se sont développées, en fonction des conditions d'incubation.

5.3.1.4. Dynamique microbienne des systèmes fermentaires

5.3.1.4.1. Evolution des flores viables cultivables

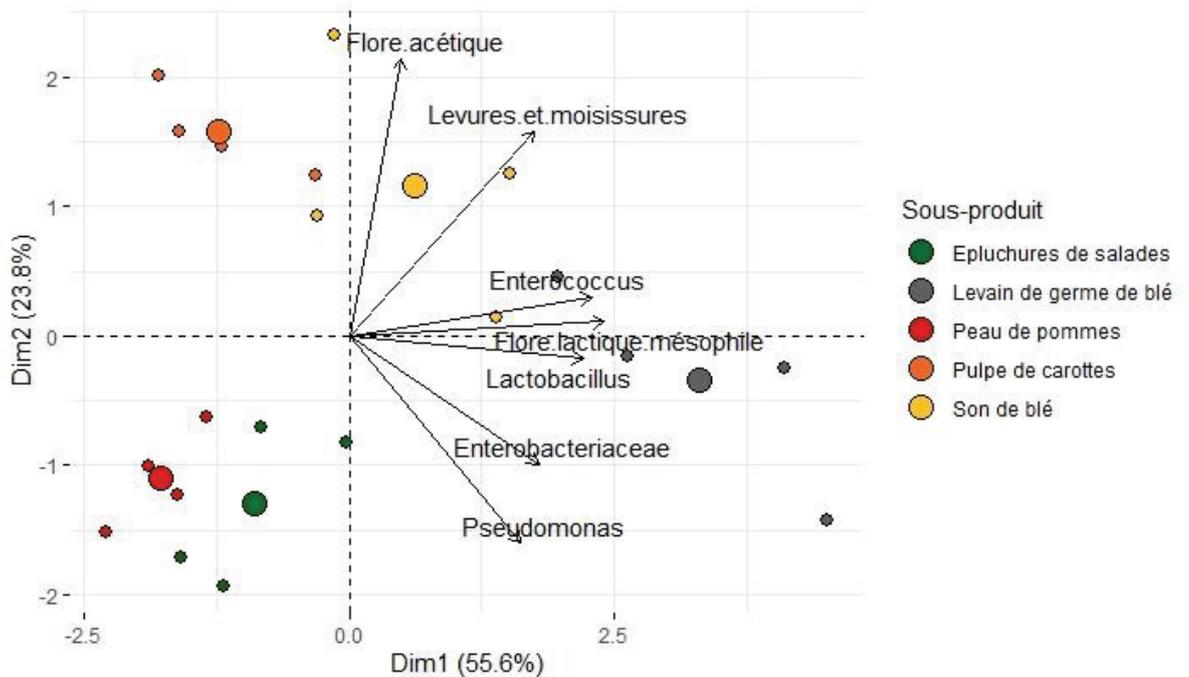


Figure 26 : Analyse en Composante Principale des différences J9-J0 des différentes flores microbiennes et projection des variables supplémentaires

L'ACP réalisée sur les différences de niveaux de populations microbiennes cultivables entre le neuvième jour et au départ de la fermentation, pour sept flores microbiennes (Flore acétique-Levures et moisissures-*Enterococcus-Lactobacillus*-Flore lactique mésophile-*Enterobacteriaceae* et *Pseudomonas*) indique que les deux premiers facteurs représentent 79,4% de la variance totale des données (Figure 26).

Le premier axe (Dim 1 = 55,6%) de l'ACP oppose les sous-produits d'épluchures de salades et de peau de pommes aux sous-produits issus de blé et de pulpe de carottes. Cette dimension factorielle est expliquée par la flore lactique mésophile (cor = 0,950) dont les *Enterococcus* et les *Lactobacillus* font partie. La flore mésophile totale a augmenté d'au minimum 8 log d'UFC/mL pour le levain de germe de blé. En parallèle, le dénombrement des *Enterococcus* présumés indique une augmentation d'environ 6 log d'UFC/mL, quelle que soit la condition de culture considérée. En revanche, le développement des *Lactobacillus* était plus important pour les échantillons G1 et G2, placés à des conditions d'incubation variables de broyage, d'humidité, rafraîchi ou non, et des températures d'incubation inférieures ou égales à 30,5°C. Pour les matrices issues de pommes, de salades et de carottes, la différence entre J9 et J0 était inférieure à 4 log d'UFC/mL, pour toutes les flores et les conditions testées. Seule la condition S2 des épluchures de salades indique une augmentation de 7 log d'UFC/mL des *Lactobacillus*. Les sous-produits céréaliers sont séparés des autres matrices par le second axe factoriel (Dim 2 = 23,8%). La corrélation positive de ces axes à la flore acétique (cor = 0,843) et aux levures et aux moisissures (cor = 0,621) indique que les sous-produits de pulpe de carottes et de son de blé sont favorables à leur croissance. La pulpe de carottes et le son de blé étaient les plus adaptés à la croissance de la flore acétique avec une augmentation comprise entre 4 et 8 log d'UFC/mL. Les levures et les moisissures augmentaient de 2 à 4 log d'UFC/mL. Au contraire, la croissance des bactéries à Gram négatif, et particulièrement des *Pseudomonas* (cor = -0,630), a été inhibée.

5.3.1.4.2. Etude de la diversité au sein des flores bactériennes viables cultivables

Le terme de diversité utilisé dans ce chapitre désigne l'évolution des profils de REP-PCR obtenus après le raclage de colonies microbiennes préalablement isolées sur des milieux gélosés, plus ou moins sélectifs.

5.3.1.4.2.1. Diversité des flores : Flore Lactique Mésophile, *Lactobacillus* et *Enterococcus*

Les profils de REP-PCR sont directement issus du raclage des colonies dénombrées pour calculer les taux microbiens discutés en partie 5.3.1.5..

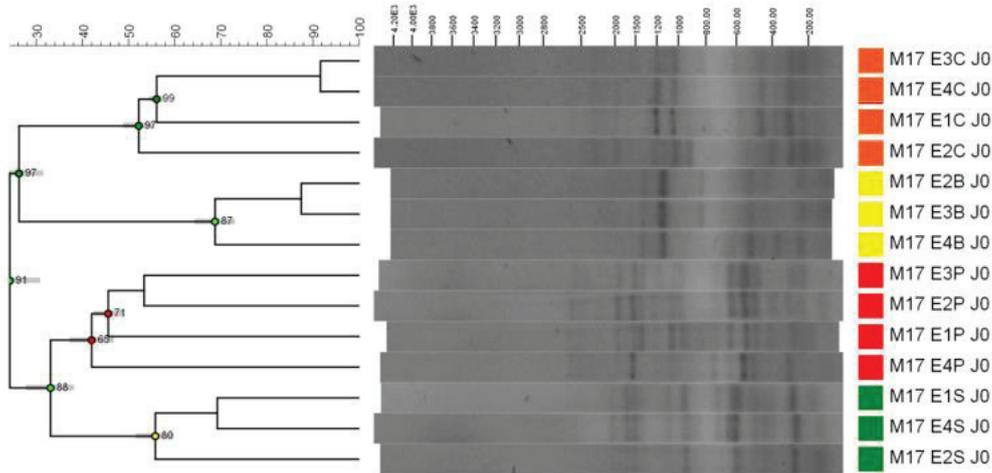


Figure 27 : Dendrogramme des profils de REP-PCR pour les colonies présumées de la Flore Lactique Mésophile (raclées sur milieu M17), à J0 de fermentation spontanée, et construit par le calcul des coefficients de similarité de Jaccard. Les sous-produits sont matérialisés par des couleurs différentes : pulpe de carotte = orange (EnC), son de blé = jaune (EnB), épluchures de salades = verte (EnS) et peau de pommes = rouge (EnP).

Parmi les flores discriminantes, la flore mésophile totale, observée sur milieu M17, le profil de REP-PCR indique un regroupement au départ de la fermentation en fonction de la nature du sous-produit, avec des pourcentages d'homologie variables compris entre 42 et 68% pour les sous-produits de pommes, de pulpe de carottes et de son de blé (Figure 27).

Les profils de REP-PCR ont également été analysés par ACP. Après neuf jours, les essais d'épluchures de salades S3 et S4 ont des profils différents et corrélés au premier axe factoriel qui explique 24,9% de la variabilité des résultats. A J0, les profils des *Enterococcus* présumés étaient similaires pour un même sous-produit. Les pourcentages d'homologie étaient respectivement de 16%, 50%, 44% et 26%, pour les épluchures de salades, la peau de pommes, le son de blé et la pulpe de

carottes. Après fermentation, les profils sont hétérogènes selon les matrices et les conditions de cultures appliquées.

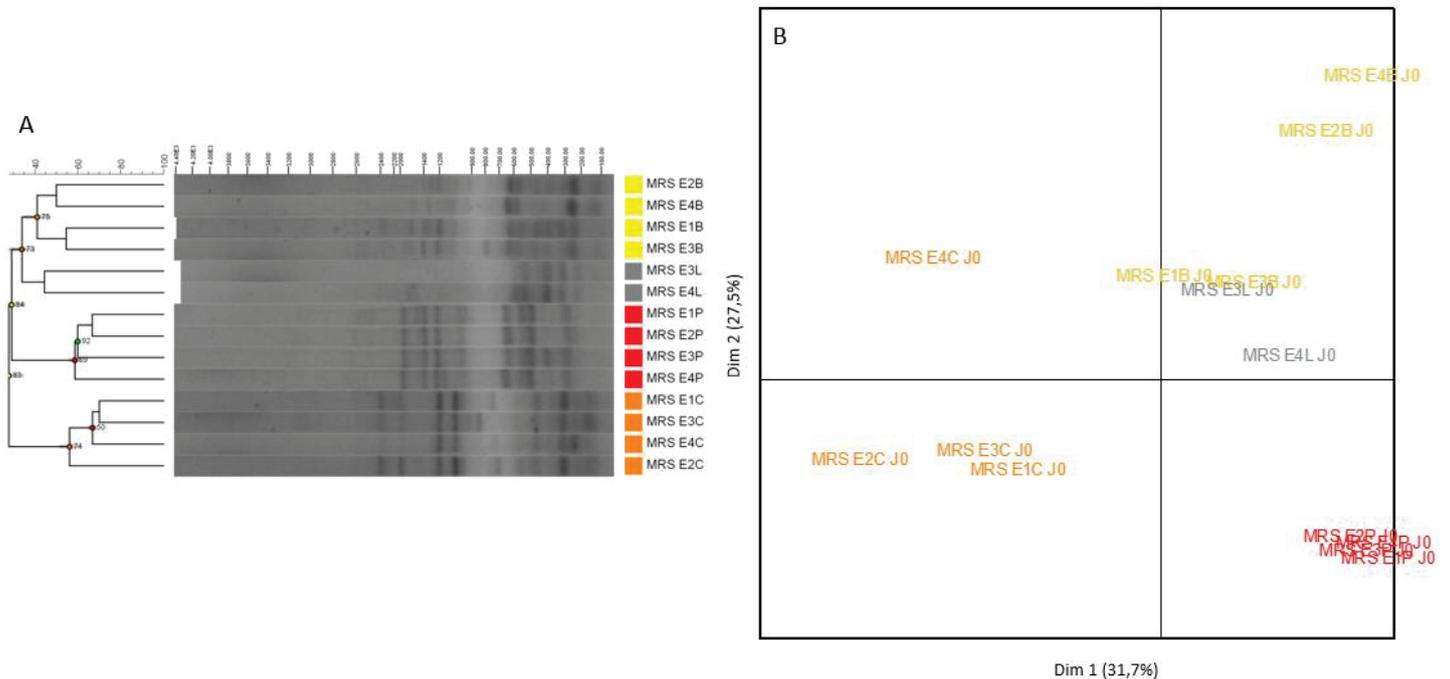


Figure 28 : Dendrogramme des profils de REP-PCR pour les colonies de la flore des *Lactobacillus* présumés (raclées sur milieu MRS), à J0 de fermentation spontanée, et construit par le calcul des coefficients de similarité de Jaccard (A) et analyse par ACP des coordonnées des bandes du gel (B). Les sous-produits sont matérialisés par des couleurs différentes : pulpe de carotte = orange (EnC), son de blé = jaune (EnB), levain de germe de blé = gris (EnL) et peau de pommes = rouge (EnP).

Enfin, l'évolution au cours du temps de la diversité des *Lactobacillus* est liée à la nature du sous-produit. Le dendrogramme, construit à partir de l'ensemble des essais, met en évidence une évolution des profils entre le premier et le neuvième jour de fermentation. Les essais forment deux clusters avec un pourcentage d'homologie de 25%. Au sein même de ces clusters, les échantillons sont regroupés selon la nature du sous-produit. A J0, l'ACP (Figure 28, B) indique une corrélation négative des essais de pulpe de carottes à l'axe factoriel 1 (Dim 1 = 31,7%), et positive pour les peaux de pommes. Les profils des échantillons de son de blé E2B et E4B sont particulièrement corrélés au second axe factoriel (Dim 2 = 27,5%). D'après le dendrogramme associé, les pourcentages d'homologie entre les essais pour un même sous-produit sont compris entre 40 et 55%, en utilisant le coefficient de similarité de Jaccard pour le traitement des résultats (Figure 28, A).

Après 9 jours d'incubation, l'ACP (Figure 29, B) indique pour les *Lactobacillus* une corrélation négative sur le premier axe factoriel (Dim 1 = 27,3%) des sous-produits d'épluchures de salades et de son de blé.

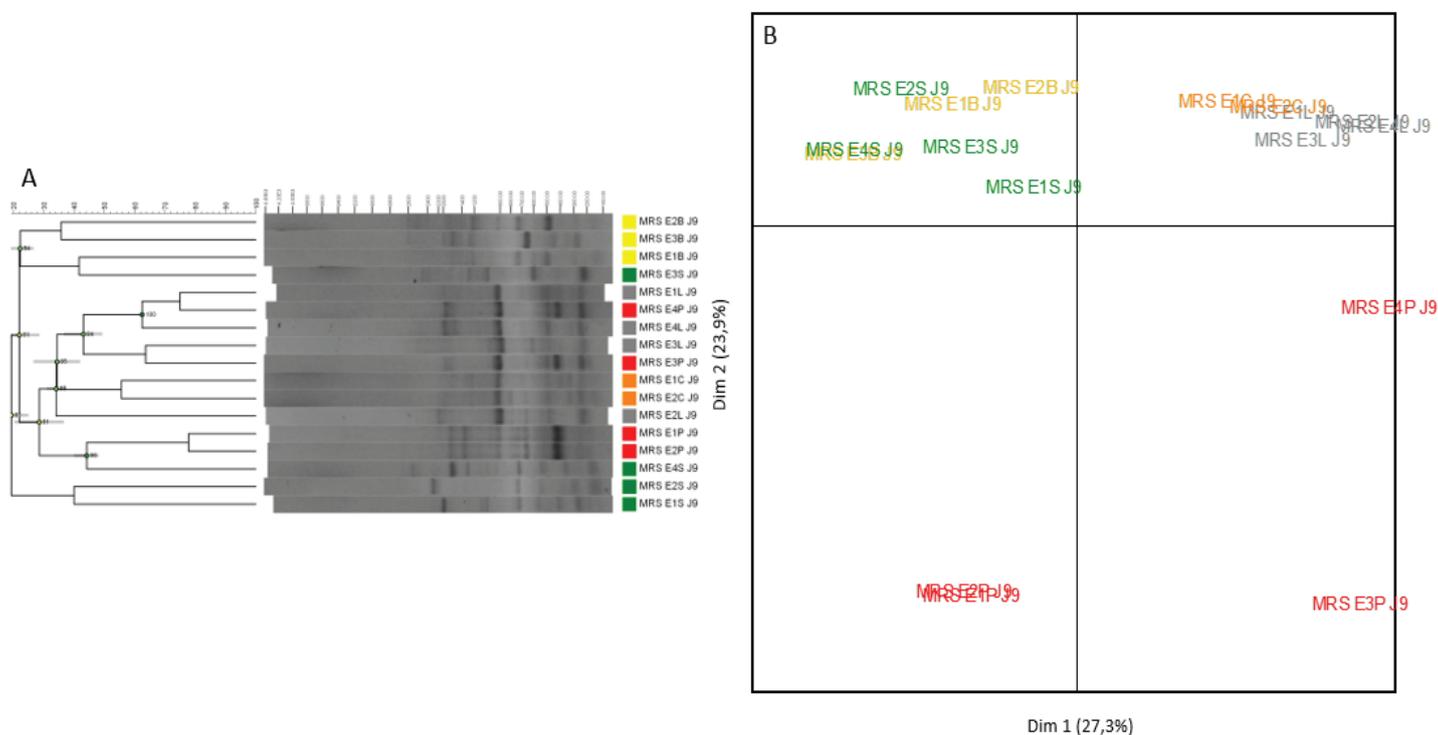


Figure 29 : Dendrogramme des profils de REP-PCR pour les colonies de la flore des *Lactobacillus* présumés (raclées sur milieu MRS), à J9 de fermentation spontanée et construit par le calcul des coefficients de similarité de Jaccard (A) et analyse par ACP des coordonnées des bandes du gel (B). Les sous-produits sont matérialisés par des couleurs différentes : pulpe de carotte = orange (EnC), son de blé = jaune (EnB), levain de germe de blé = gris (EnL) et peau de pommes = rouge (EnP).

Au contraire, une corrélation positive est observée pour la pulpe de carottes et le levain de germe de blé. Le dendrogramme permet d'identifier une bande commune à ces deux matrices, à une taille d'environ 920 pb. Les échantillons de peau de pommes sont corrélés négativement à la seconde dimension factorielle (Dim 2 = 23,9%) et sont caractérisés par la présence d'une bande à 420 pb sur les gels de REP-PCR (Figure 29, A). Les niveaux de température, de pourcentage en eau, de broyage et de rafraîchissement testés ne semblent pas favoriser la croissance d'espèces spécifiques selon les conditions d'incubation fixées.

Les pistes obtenues à J0 et J9 pour les trois flores évoquées précédemment ont été comparées. D'après le dendrogramme construit, les clusters de profils homologues regroupent généralement des essais provenant d'un même sous-produit, en début ou fin de fermentation. Ils mettent également en avant une homologie entre les profils supposés être la Flore Mésophile Lactique, des *Enterococcus* ou des *Lactobacillus*. Ceci appuie l'utilisation du terme de « flore présumée » pour décrire les écosystèmes microbiens. Les milieux utilisés pour le dénombrement semblent favoriser la croissance de microorganismes ayant des profils REP-PCR homologues.

5.3.1.4.2.2. Diversité de la flore acétique et des bactéries à Gram négatif

Le Figure 30 permet de visualiser le regroupement des profils de REP-PCR, pour la flore acétique, en fonction de la nature des sous-produits.

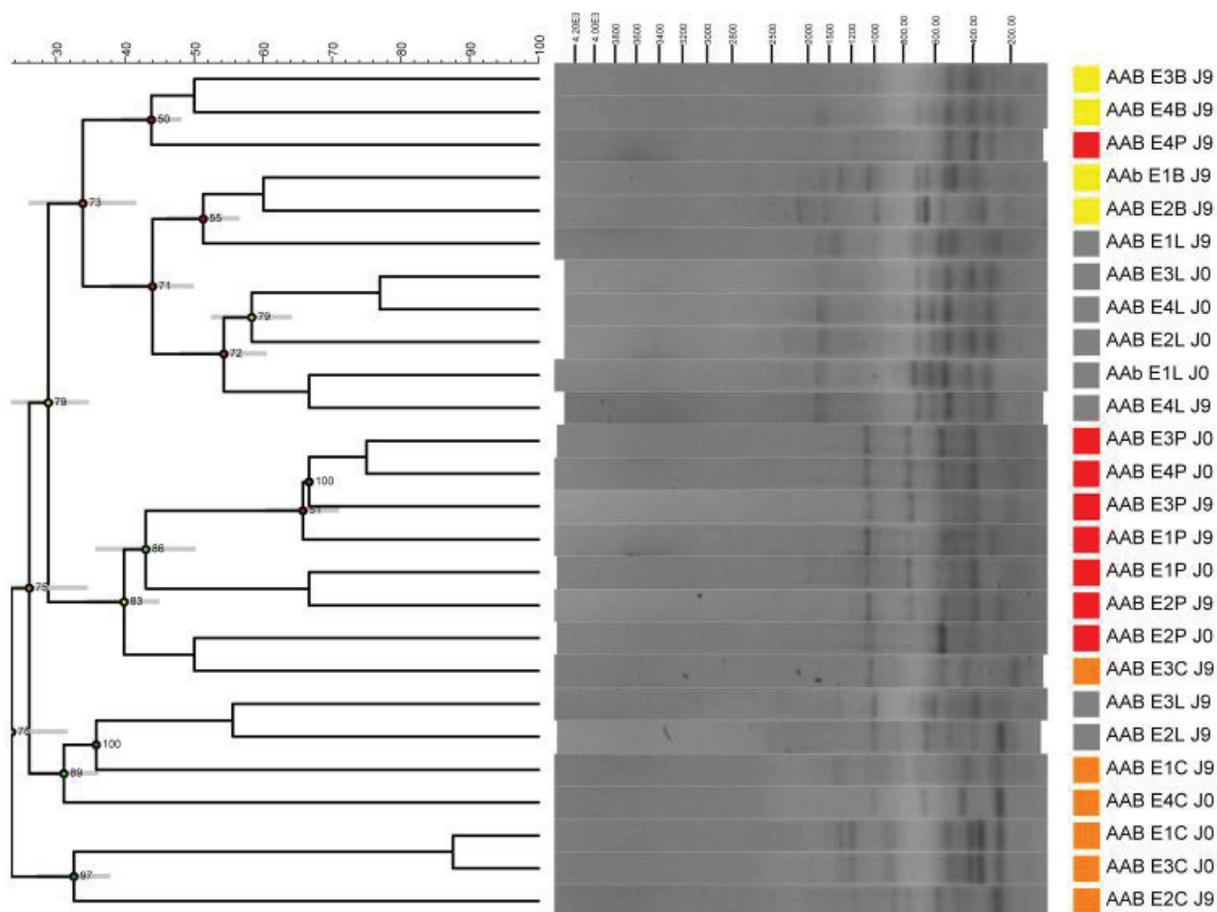


Figure 30 : Dendrogramme des profils de REP-PCR pour les colonies de la flore acétique présumée (raclées sur milieu AAB), à J0 et J9 de fermentation spontanée, et construit par le calcul des coefficients de similarité de Jaccard. Les sous-produits sont matérialisés par des couleurs différentes : pulpe de carotte = orange (EnC), son de blé = jaune (EnB), levain de germe de blé = gris (EnL) et peau de pommes = rouge (EnP).

Les clusters contiennent les échantillons fermentés ou non. Par exemple, les essais obtenus à partir de peaux de pommes (en rouge sur la Figure 30), à J0 et J9, forment un groupe de profils homologues à 42%. La diversité au sein de cette flore semble donc peu évoluer au cours de la fermentation.

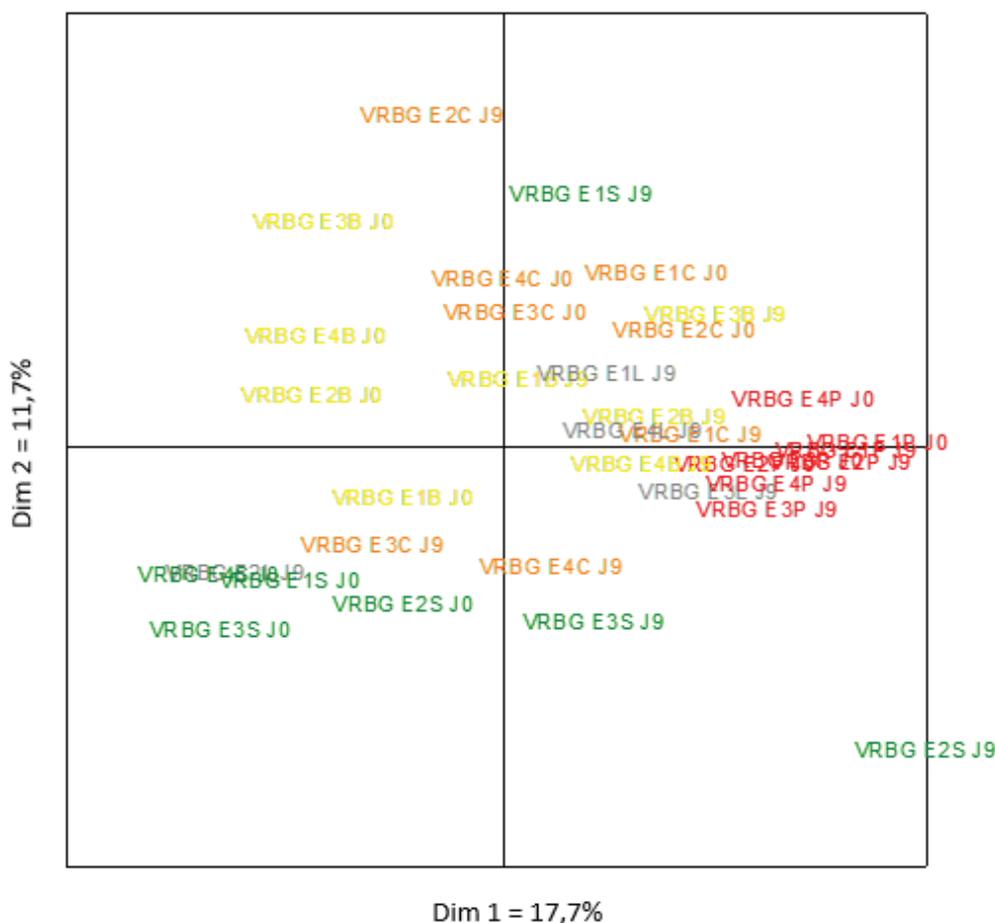


Figure 31 : ACP des coordonnées des bandes des gels de REP-PCR pour les colonies de la flore des Enterobacteriaceae présumées (raclées sur milieu VRBG), à J0 et J9 de fermentation spontanée. Les sous-produits sont matérialisés par des couleurs différentes : pulpe de carottes = orange, son de blé = jaune, levain de germe de blé = gris, épluchures de salades = vert et peaux de pommes = rouge.

Les *Enterobacteriaceae* sont des bactéries fréquemment retrouvées à la surface des végétaux bruts. Au départ de la fermentation de la pulpe de carottes, du son de blé, des épluchures de salades et de la peau de pommes, les pourcentages d'homologie étaient compris entre 30 et 68%. Ceci traduit une répartition homogène de cette flore à l'état initial et une diversité spécifique à la nature du végétal. Après fermentation, l'évolution de la diversité était différente entre les cinq sous-produits végétaux (Figure 31).

Pour le levain de germe de blé, les colonies sélectionnées sur milieu VRBG avaient des profils différents selon les conditions de cultures appliquées. La Figure 31 met en avant une différence d'autant plus importante pour l'essai E2L, non broyé, non rafraîchi, supplémenté à 50% d'eau physiologique et placé à 24°C. Les essais réalisés à partir de peaux de pommes avaient une diversité stable au cours du temps. Les sous-produits de pulpe de carottes et d'épluchures montraient une évolution au cours du temps des profils de REP-PCR et ces évolutions étaient différentes selon les

conditions d'incubation testées. Cependant, une homologie d'environ 44% était observée pour les échantillons E3C et E4C, tous deux incubés à 37°C. Enfin, pour le sous-produit de son de blé, la diversité des microorganismes présents en début et en fin de fermentation a évolué.

5.3.1.5. Interactions entre les conditions de culture et l'évolution des communautés microbiennes

L'analyse factorielle multiple de l'ensemble des réponses permet d'observer l'impact des conditions de culture sur le biotope et la biocénose, après neuf jours de fermentation spontanée.

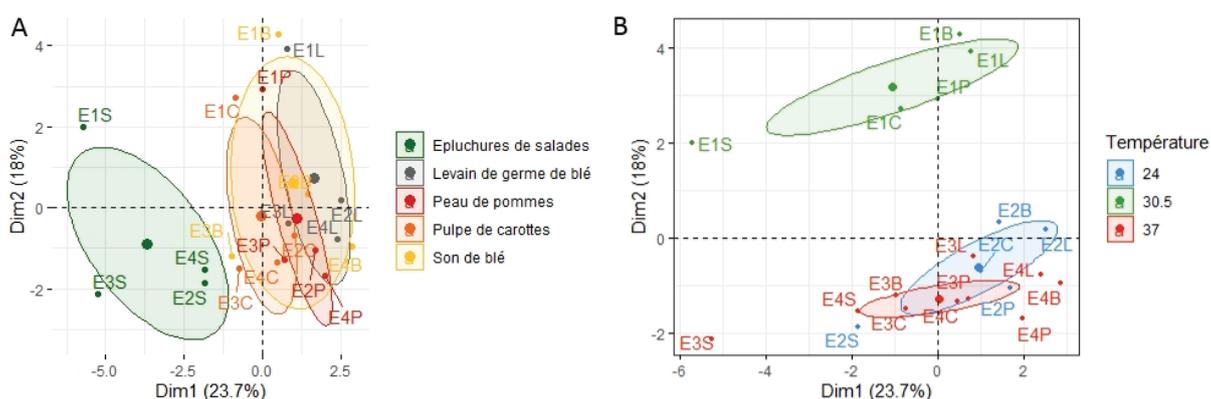


Figure 32 : Analyse Factorielle Multiple des réponses mesurées après neuf jours d'incubation, pour les 20 essais de fermentation. Visualisation des essais en fonction de la nature du sous-produit (A) ou de la température d'incubation (B). Code des essais : S = sous-produit d'épluchures de salades (EnS), P = sous-produit de peaux de pommes (EnP), C = sous-produit de pulpe de carottes (EnC), B = sous-produit de son de blé (EnB) et L = sous-produit de levain de germe de blé (EnL). Les conditions d'incubation détaillées sont disponibles dans le Tableau 6 du chapitre 5.

De plus, ceci permet de mettre en avant les interactions entre les conditions de culture et les réponses mesurées, d'une part, et les interactions entre les réponses d'autre part. Le plan factoriel sur lequel sont projetés les essais de fermentation exprime 41,7% de l'inertie des données. Parmi les variables de culture, la nature du sous-produit et le broyage sont corrélés positivement au premier axe factoriel (Pourcentage de contribution = 18,5%), tandis que les variables température, rafraîchissement et pourcentage en eau ajouté sont corrélées positivement au second axe factoriel avec un pourcentage de contribution pour chaque paramètre d'environ 23%. La projection des ellipses de confiance en fonction de la nature du sous-produit indique que les sous-produits d'épluchures de salades semblent différents des autres matrices sur la base des réponses mesurées (Figure 32, A). En effet, les ellipses des sous-produits de levain de germe de blé, de peau de pommes, de pulpe de carottes et de son de blé, sont confondues entre elles. Le même traitement pour les variables de broyage et de pourcentage en eau ne semble pas regrouper les échantillons entre eux (Figure 32, B). En revanche, les essais E1 des cinq sous-produits végétaux, placés à 30,5°C et rafraîchis une fois, sont corrélés à la dimension 2. Les essais avec la pulpe de carottes, la peau de pommes et le levain de germe de blé sont contenus dans l'ellipse de confiance et sont significativement identiques. L'échantillon E1B

semble proche de ces trois échantillons. Bien que l'essai E1S d'épluchures de salades semble différent des essais menés à 24 et 37°C, il est corrélé négativement au premier axe factoriel et différent des échantillons incubés à 30,5°C. En lien avec ce qui a pu être observé dans les paragraphes précédents, les flores lactiques (*Lactobacillus* et *Enterococcus*), la flore acétique et les levures et moisissures, expliquent les différences entre les essais. Elles sont corrélées positivement à la première dimension. Concernant les paramètres physico-chimiques, l'acidité titrable est également corrélée positivement au premier axe factoriel. Autrement dit, plus les taux des flores lactiques, de la flore acétique et des levures et moisissures sont importants, plus l'acidité titrable, et indirectement la production d'acides organiques, est importante. En accord avec cette observation, le pH est corrélé négativement à l'axe 1 et à l'acide titrable.

5.4. Discussion

La problématique initiale de ce projet était de produire des métabolites d'intérêt, sans *a priori*, en pilotant les paramètres de culture lors de la fermentation spontanée de cinq co-produits végétaux. Cependant, la nature des molécules d'intérêt produites peut s'avérer très diverse : des molécules antimicrobiennes, des molécules aromatiques, des molécules antioxydantes, des enzymes ou encore des acides organiques (Abu Yazid *et al.*, 2017; Kowalska *et al.*, 2017). Dans le cadre de la valorisation de sous-produits végétaux et du contexte industriel dans lequel s'inscrit ce travail, l'objectif était d'utiliser les matrices brutes en limitant les pré-traitements, l'ajout de substrat de synthèse ou de microorganismes allochtones. La fermentation spontanée des sous-produits végétaux a donc été envisagée dans un premier temps, par fermentation de la pulpe de carottes, selon un plan d'expérience factoriel. L'intérêt était également de favoriser la croissance des flores microbiennes natives et leurs métabolismes. En utilisant un plan d'expérience simplifié, la fermentation spontanée de pulpe de carottes a été comparée à l'évolution de la fermentation spontanée des quatre autres sous-produits végétaux, soumis à des conditions de cultures équivalentes. L'objectif était de développer la méthodologie utilisée pour la matrice modèle, à l'ensemble des sous-produits, et en adaptant les conditions physico-chimiques.

Les caractéristiques physico-chimiques au départ des fermentations étaient variables selon les sous-produits. Le levain de germe de blé et la peau de pommes étaient acides, tandis que la pulpe de carottes, les épluchures de salades et le son de blé présentaient des pH neutres. L'acidité de la peau de pommes et du levain de germe de blé n'est pas optimale pour le développement de certaines flores microbiennes. Les valeurs acides de pH étaient associées à des quantités équivalentes d'acide lactique plus importantes. Les flores microbiennes commensales des végétaux étaient retrouvées dans des quantités variables selon le sous-produit étudié.

Chaque série d'essais a été menée à partir d'un même batch de sous-produits. Pour des raisons logistiques, les mesures des différentes réponses ont été effectuées sur des échantillons congelés mais récupérés dans des conditions de temps et de prélèvement similaires. L'objectif était de mettre en place les fermentations le plus rapidement possible après réception des sous-produits pour limiter leur stockage et leur altération. Les différentes expérimentations réalisées sur la pulpe de carottes ont permis d'appréhender la variabilité entre les lots de sous-produits envoyés par les industriels. En effet, le pH initial du produit était de 4 en moyenne pour les essais du plan d'expérience factoriel, et d'environ 6,2 pour les essais du plan simplifié. Cette différence peut s'expliquer par une initiation non contrôlée de la fermentation spontanée. Ceci se traduit, pour le pH le plus acide, par une valeur d'acidité titrable environ six fois plus élevée. Les taux microbiens observés étaient équivalents pour la flore lactique mésophile, dont les *Lactobacillus* et les *Enterococcus* présumés. Pour les 19 essais du plan factoriel, les levures et les moisissures, et les *Enterobacteriaceae* étaient supérieurs d'1,5 log d'UFC/mL environ. La quantité de bactéries acétiques était supérieure de 3 log d'UFC/mL. Les résultats du projet indiquent une dominance de la flore lactique au départ de la fermentation de pulpe de carottes. Ils indiquent également une variabilité microbiologique et physico-chimique des parties du végétal en contact direct avec l'environnement extérieur.

Les essais menés selon le plan d'expérience factoriel ont montré que les bactéries lactiques, dont la flore lactique mésophile, les *Lactobacillus* et *Enterococcus* présumés, étaient prépondérantes au départ et au cours de la fermentation. Les bactéries acétiques, les levures et les moisissures sont également des flores commensales des sous-produits végétaux. Leurs métabolismes peuvent être favorables à la production de molécules d'intérêt. Les résultats avec la pulpe de carottes ont montré, dans les conditions choisies, une diminution des microorganismes eucaryotes. Les taux d'*Enterobacteriaceae* et de *Pseudomonas*, ont diminué au cours du temps. Ceci est caractéristique de la compétition qui régit le développement microbien au sein des écosystèmes végétaux, suite aux modifications du biotope (Di Cagno *et al.*, 2008). La production d'acides organiques résulte de la consommation des sucres disponibles et provoque l'acidification du milieu (Gänzle, 2015b). D'un point de vue global, les conditions testées à travers le plan d'expérience n'ont pas permis de déstabiliser les écosystèmes et de favoriser significativement la production de molécules aromatiques. De plus, parmi les quatre paramètres de croissance testés, la température d'incubation a montré une corrélation négative pour la production d'acides organiques et d'éthanol. La synthèse de ces molécules est également corrélée au développement des bactéries lactiques, et particulièrement des *Lactobacillus* présumés. Dans le cadre de la fermentation spontanée, la recherche des communautés microbiennes par des méthodes culture-dépendantes implique d'identifier au préalable les flores recherchées d'après les données de la littérature. En comparaison, Peng *et al.* (2018), ont étudié la diversité

bactérienne de différentes espèces végétales fermentées (chou, pousse de bambou, haricots verts et pastèque) en considérant également leur origine de prélèvement, par métagénomique. Les conclusions de l'étude ont montré une dominance des bactéries appartenant au phylum des Firmicutes, et particulièrement des genres *Lactobacillus*, *Pediococcus* et *Weissella*. Ils parlent ainsi de « core genome ». Bien que des différences aient été observées dans les phylums représentés dans les différentes régions de prélèvement, l'analyse des données comparant la diversité des différents écosystèmes (diversité beta) montre une diversité significativement différente selon l'espèce végétale considérée.

L'enjeu de ce chapitre était également d'étudier la fermentation spontanée des cinq sous-produits végétaux à disposition afin de produire des molécules d'intérêt et d'observer l'évolution des écosystèmes d'un point de vue du biotope et de la biocénose. Comme pour la fermentation de pulpe de carottes et la plupart des végétaux, l'acidification globale des écosystèmes a eu lieu dès le premier jour de fermentation spontanée (Wouters *et al.*, 2013a). Dans l'objectif d'utiliser les matrices brutes et de réduire les intrants difficilement recyclables, les variables de température d'incubation et d'ajout d'eau ont été retenues dans un premier temps. Le broyage a été intégré comme variable destructive afin d'homogénéiser les écosystèmes et éventuellement de favoriser l'accès des nutriments aux microorganismes. Enfin, la variable « nombre de rafraîchis » avait pour objectif initial d'ôter le surnageant de culture pendant la fermentation et de récupérer les composés d'intérêt produits au cours du temps par les différentes communautés microbiennes successives. D'après les observations réalisées dans le chapitre 4, les conditions ont été ajustées à chacun des sous-produits. Quel que soit le type de réponse (microbiologique ou physico-chimique), la nature du sous-produit explique principalement les différences mesurées. D'après les critères de pH et d'acidité titrable, le levain de germe de blé, soumis aux conditions de culture sélectionnées ne semble pas favoriser la fermentation lactique. Les quantités d'acides organiques présentes au départ auraient pour origine la fermentation initiale de la matrice, liée directement aux processus de fabrication du levain. Comme dans le chapitre 4, les épluchures de salades n'étaient pas favorables aux processus de fermentation. La pulpe de carottes, le son de blé et la peau de pommes sont des sous-produits pour lesquels une augmentation de l'activité microbienne a été observée, par croissance des flores et l'évolution de l'acidité globale.

Les profils REP-PCR des essais de fermentation de pulpe de carottes montrent des bandes, pour les *Lactobacillus* présumés, spécifiques aux conditions de culture et au temps de fermentation (J0 : 1350 pb, 950 pb, 500 pb, 250 pb et J9 : 950 pb, 700 pb et 250 pb). Après fermentation, deux groupes étaient observés, dont l'un regroupait les essais incubés à 24°C et non supplémentés en eau. La comparaison de l'ensemble des profils permet d'identifier des bandes communes à plusieurs flores supposées, dont les *Lactobacillus* et les *Enterococcus*, pour lesquels une bande se situe à 1000 pb. Au-

delà de la croissance ou non des microorganismes, l'analyse REP-PCR montre une diversité des profils spécifique à chaque sous-produit brut qui évolue au cours de la fermentation. Les principaux changements ont été observés pour la flore lactique (FLM, les *Lactobacillus* et les *Enterococcus*). Cependant, les profils montrent des bandes d'ADN communes aux trois sous-populations recherchées. Wouters *et al.* (2013), ont également mis en avant une homologie entre des profils (GTG)₅-PCR obtenus à partir d'isolats sur les milieux MRS et M17. En comparant les profils des essais à des profils témoins de souches séquencées (ADNr 16s). Pour les sous-produits de son de blé, de pulpe de carottes et de peau de pommes des bandes communes ont été observées mettant en avant une diversité commune des *Lactobacillus* au départ de la fermentation. Malgré la spécificité globale des profils, liée à la nature des sous-produits, cette diversité commune est présente au sein de la flore acétique, de la FLM, des *Enterococcus* et des *Enterobacteriaceae*. Pour la flore acétique en particulier, bien que les taux microbiens évoluent au cours de la fermentation, les dendrogrammes mettent en avant une diversité constante des profils au cours du temps et un regroupement des pistes en fonction de la matrice. L'identification taxonomique de colonies isolées à partir du milieu de culture, mis au point dans les travaux de Miguel *et al.* (2017), a montré que les isolats obtenus en fermentation spontanée appartenaient aux genres *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Gluconobacter*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* et *Acetobacter*. Il est donc cohérent d'identifier des bandes d'ADN communes dans les profils REP-PCR obtenus à partir des milieux MRS et AAB.

L'utilisation des plans d'expérience factoriels est adaptée pour tester différentes variables de culture. S'ils permettent d'étudier les interactions qui régissent l'évolution des écosystèmes fermentaires, leur mise en place et le traitement des échantillons augmentent le temps et les coûts nécessaires pour réaliser les expériences. Dans le cadre des essais menés, des variables non invasives et non destructives ont été retenues : la température et le pourcentage en eau ajouté. Les valeurs de température ont été définies à 24°C, 30,5°C et 37°C. Elles se situent dans l'intervalle des températures optimales de croissance de la plupart des bactéries lactiques (Jawad *et al.*, 2013). La température minimale correspondait à une température ambiante, permettant de réduire les dépenses énergétiques liées au chauffage des milieux réactionnels. La valeur de 37°C est notamment utilisée pour le dénombrement des bactéries lactiques dans les produits laitiers et la culture d'isolats provenant de l'Homme. Pour les essais menés à partir des sous-produits de pulpe de carottes, les analyses ont montré une corrélation négative entre la température et la production d'acides organiques, dont l'acide acétique et l'acide D-lactique. Le taux d'humidité du milieu définit le type de fermentation : fermentation liquide, solide ou semi-immersée. Ce paramètre peut être limitant pour la croissance des microorganismes. De plus, d'un point de vue technologique, il est un levier d'action intéressant pour la réduction des coûts de production de métabolites d'intérêt et l'optimisation des

processus de valorisation, notamment par la réduction de consommation d'eau ajoutée. L'utilisation de sous-produits végétaux permettrait une amélioration supplémentaire des rendements et a montré un potentiel pour la production de métabolites ayant une valeur ajoutée (ex : enzymes, acides organiques, bioénergies). La fermentation dite « en milieu solide » est également adaptée à la croissance de la plupart des microorganismes : levures, moisissures, bactéries (Abu Yazid *et al.*, 2017). Cependant, ce paramètre doit être ajusté selon les propriétés physico-chimiques initiales des sous-produits végétaux considérés. En effet, comme le montrent les résultats du chapitre 4, et ce dernier chapitre, le son de blé par exemple est une matrice dont la teneur en extrait sec est élevée. L'ajout d'eau permet d'initier la croissance des microorganismes et les métabolismes associés. De plus, l' a_w d'un produit sélectionne les flores capables de se développer. Le broyage est une variable destructive des structures végétales permettant de libérer des composés nutritifs pour les microorganismes, et d'augmenter les surfaces d'échange entre le produit végétal et le milieu extérieur. Au travers des essais menés, ce paramètre n'a pas d'effet significatif sur l'évolution des fermentations spontanées. Enfin, les rafraîchis ne sont pas corrélés aux changements observés, tels que la diminution du pH ou la croissance microbienne. Le plan d'expérience factoriel construit pour la fermentation de pulpe de carottes avait pour objectif d'identifier les variables de culture ayant de l'influence sur les réponses et d'identifier les interactions entre les variables. La température et le pourcentage en eau ajoutée sont les paramètres qui modifient les écosystèmes de façon significative. D'après les observations réalisées à partir des deux plans d'expérience, il semble nécessaire d'appliquer des conditions de culture plus drastiques afin de perturber les écosystèmes et d'orienter les voies métaboliques. L'utilisation d'un plan d'optimisation est donc envisagée pour la production de métabolites d'intérêt. De plus, les fermentations menées sur les cinq sous-produits montrent de fortes corrélations entre la nature des matrices et la croissance des microorganismes, leur diversité et l'évolution du biotope (ex : le pH). La prise en compte de la nature du sous-produit pour l'ajustement de l'humidité a permis d'initier la fermentation spontanée de la matrice son de blé. La démarche utilisée pour la fermentation spontanée des cinq sous-produits végétaux devait permettre de traiter l'ensemble des matrices. Les essais menés dans cette étude, à travers la sélection des conditions semblant les plus discriminantes sur la matrice modèle, la pulpe de carottes, ont permis le traitement similaire des sous-produits. De plus, cette démarche a permis d'ajuster le pourcentage d'eau en fonction du taux d'humidité des matrices. En revanche, l'analyse repose sur la prise en compte de valeurs uniques pour chaque réponse. La dispersion des données pour un même essai ne peut donc pas être étudiée.

Les mesures effectuées ont montré une homogénéité des paramètres physico-chimiques et de la répartition des flores microbiennes à la surface des sous-produits bruts. En revanche, entre deux lots, de pulpe de carottes notamment, les conditions physico-chimiques pouvaient varier, comme le pH. Les sous-produits n'étant pas stabilisés dès le départ, lors des processus de transformation en industrie, la fermentation peut être initiée lors du transport et du stockage. A ce stade du projet, les conditions de fermentation spontanée testées n'ont pas permis de déstabiliser les équilibres microbiens. De plus, il semblait nécessaire d'optimiser la production d'une molécule en particulier.

A partir de ces conclusions, la dernière partie du projet s'est donc orientée vers la production d'acide lactique. En accord avec les industriels participant au projet, l'acide lactique a été retenu comme molécule modèle pour la mise en place des derniers essais. En effet, sa production est associée au métabolisme des bactéries lactiques et qui sont majoritaires au cours de la fermentation des végétaux. Du point de vue technologique, l'intérêt était de produire de l'acide lactique via la synthèse biologique et non chimique. Dans le but de perturber les écosystèmes et d'optimiser la production de cet acide organique, la stratégie choisie a été de sélectionner une bactérie lactique directement issue de la fermentation de pulpe de carottes, appartenant au genre *Lactobacillus* (Alves de Oliveira *et al.*, 2018). L'ensemble des résultats obtenus dans les chapitres 4 et 5 ont permis d'identifier les flores microbiennes qui composent le milieu et qui pourraient entrer en compétition avec le microorganisme sélectionné et être ajoutées pour la fermentation. L'évolution de la diversité permet également de caractériser l'environnement dans lequel la souche sélectionnée doit s'installer et se développer. Un plan D-optimal a été utilisé afin de définir les conditions optimales de production d'acide lactique. Les paramètres de culture testés ont été modifiés par rapport au chapitre 4. Tel que le suggèrent Wang *et al.* (2015), le pH, la température et la taille de l'inoculum ajouté ont été retenus (Eş *et al.*, 2018; Park *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2016). Un cocktail enzymatique a également été testé afin de favoriser la libération des nutriments dans le milieu extérieur et la production d'acide lactique (John *et al.*, 2007b). Enfin, l'objectif était de développer une démarche méthodologique dans le cadre de la valorisation de sous-produits végétaux issus de l'industrie agroalimentaire.

Chapitre 6

Optimisation de la production d'acide lactique à partir de la matrice modèle : la pulpe de carottes

Après avoir étudié l'évolution des écosystèmes de cinq sous-produits végétaux en fermentation spontanée, pour la production de métabolites d'intérêt, ce chapitre s'intéresse particulièrement à la production d'acide L-lactique à partir de pulpe de carottes. Le premier objectif a été de sélectionner un candidat producteur de cet acide organique et d'évaluer dans un second temps les conditions les plus favorables à la production de cet acide organique.

6. Optimisation de la production d'acide lactique à partir du sous-produit modèle : la pulpe de carottes

6.1. Matériel et méthodes analytiques

Excepté pour les méthodes analytiques développés dans le manuscrit de l'article ci-dessous, les conditions expérimentales pour le dénombrement des flores microbiennes, la réalisation des REP-PCR, les mesures de pH, d'acidité titrable, et le dosage des acides organiques, sont identiques à celles appliquées dans les chapitres 4 et 5.

6.2. Sélection d'un microorganisme producteur d'acide lactique

6.2.1. Résumé

Le manuscrit de l'article « Selection of *Lactobacillus paracasei* strains from grated carrots by-products for L-lactic acid production », publié dans le journal « International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research », présente la sélection d'un microorganisme producteur d'acide lactique capable d'utiliser le sous-produit « pulpe de carottes » comme substrat. Quarante bactéries lactiques présumées ont été isolées directement de pulpe de carottes fermentée et criblées selon les taux d'acide lactique produits. Le milieu de culture MRS a été utilisé en première approche comme milieu modèle. Un milieu « carotte-like » a permis d'évaluer la production d'acide dans un milieu similaire au sous-produit brut. Les espèces *Lb. paracasei* et *Lactobacillus harbinensis* ont été retenues sur la base de ces critères.

Les 40 souches isolées étaient des *Lactobacillus* et *Leuconostoc*, homofermentaires ou hétérofermentaires, réparties selon 17 espèces différentes. Un premier criblage a permis de retenir neuf souches capables d'acidifier les milieux carotte-like et MRS rapidement. Ceci s'est traduit par le changement de couleur du milieu de culture et un virage de l'indicateur coloré. La proportion des isomères D et L d'acide lactique étaient différents selon les souches et le milieu de culture considéré. L'acide L-lactique étant identifié dans la littérature comme la forme la plus intéressante dans le cadre de la valorisation, les *Lb. paracasei* A1L et F7L, et les *Lb. harbinensis* E6L et A9L, producteurs à plus de 94% de cet isomère ont été retenus. Les variations de pH, ainsi que l'acidité titrable, indiquent une acidification plus importante du milieu par *Lb. paracasei*. Les quantités d'acide L-lactique produites étaient également plus importantes pour les deux souches de cette espèce.

Les souches ayant été isolées à partir d'échantillons similaires, les profils fermentaires et génotypiques de ces quatre souches ont été étudiés, afin de déterminer si les isolats étaient des clones.

D'après les résultats des galeries API, la souche *Lb. paracasei* A1L utilise l'amidon. De plus, les profils (GTG)₅-PCR montrent que les souches sont différentes selon le coefficient de similarité de 80% retenu comme seuil de similarité.

Les taux d'acide L-lactique produits en milieu carotte-like étaient nettement inférieurs à ceux obtenus en milieu MRS. Dans le but de maximiser les quantités synthétisées, des essais de fermentation de pulpe de carotte ont été menés en faisant varier les conditions de culture suivantes : la température, le pH initial, la concentration en microorganisme ajoutée au départ et la quantité d'enzymes. Les résultats de ces essais font l'objet du chapitre suivant 6.2. Le microorganisme ensemencé était la souche *Lb. paracasei* A1L pour ses quantités d'acide L-lactique produites et son aptitude à utiliser l'amidon.

6.2.2. Article

Selection of *Lactobacillus paracasei* strains from grated carrots by-products for L-lactic acid production

Justine Godard* and Yann Demarigny

Univ Lyon, ISARA Lyon, Université Lyon 1, BioDyMIA (Bioingénierie et Dynamique Microbienne aux Interfaces Alimentaires), EA n°3733, ISARA, Agrapôle, 23 rue Jean Baldassini, F-69364, LYON, cedex 07, France

Abstract

Beside its utilisation as food preservative, lactic acid can be also used to make biopolymers, or to enter in the composition of cleaning products. Nowadays, different ways are explored to optimize its production. The use of vegetable wastes could appear a profitable option to reduce costs. In this work, we compared the ability of 40 different native lactic acid bacteria isolated from fermented carrot pulps originating from grated carrots, to produce lactic acid. The selection relied on the use of two model media, the synthetic MRS medium and a sterilized carrot-like medium. It allowed us to keep two interesting species: *Lactobacillus paracasei* and *Lb. harbinensis*, which produced high concentrations of L-lactic acid in MRS broth. However, the yield obtained with the carrot-like medium were less important and will have to be optimize in the future. *Lb. paracasei* proved to be more interesting than *Lb. harbinensis*. In particular, the strain A1L was able to metabolize starch. This ability could be a selective advantage in a complex vegetable matrix to overwhelm the other adventitious microorganisms.

Key words

Vegetable fermentation, carrot pulps, L-lactic acid production, *Lb. paracasei*

1. Introduction

In 2013, 1.6 billion tonnes of wastes were generated, 15 to 25% being from vegetable origins (FAO, 2013). At present, different methods are used to valorise these by-products; for instance, composting, animal feed or anaerobic digestion to produce methane. At the same time, many studies focus on the production of interesting biomolecules by fermentation processes, which could be used, for example in cosmetics or in medicine (López-Gómez *et al.*, 2019). These compounds include organic acids, enzymes, or aroma molecules (Abu Yazid, Barrena *et al.*, 2017). However, the composition of vegetable matrix varies a lot depending on their degradation state, adventitious microbes inside or harvest conditions. Furthermore, during the optimization step, the type of vegetable and its biochemical composition are key factors to produce compounds and to obtain good yields. Now, it is essential to find new options to replace synthetic culture media and to avoid using agriculture plots to produce chemical molecules.

Among the different native microbes which can be found in and on raw vegetables, lactic acid bacteria (LAB) population frequently dominates. These bacteria have been used for centuries to ferment different substrates, spontaneously or in a controlled way. For instance, LAB are used to make fermented food products; among them, olives, kimchi or pickles are often referred to in the literature. The LAB microflora of these food products includes different genera, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella* and *Pediococcus*. If homofermentative LAB produce only lactic acid, heterofermentative LAB also release acetic acid, CO₂ and ethanol, depending on the type of carbohydrate metabolized and the physico-chemical environment (Gänzle, 2015). In recent years, L-lactic acid has become more and more interesting. It is used to synthesize poly(lactic acid) substances available for bioplastic production (Abdel-Rahman *et al.*, 2013).

Our project was undertaken to investigate the fermentation aptitude of carrot pulps to produce L-lactic acid. The carrot pulps resulted from the peeling step during the industrial production of grated carrots. Two strategies can be followed: 1- the utilisation of type LAB strains or 2- the direct isolation of microorganisms from the vegetable wastes which will be further used as substrate (Di Cagno *et al.*, 2013; Gardner *et al.*, 2001). We decided to focus on this second way, considering that wild bacteria are supposed to be more adapted to their native environment. Di Cagno *et al.*, (2008), for instance fermented three different vegetable matrix (carrot, marrows and French beans). They observed that autochthonous LAB were able to grow at higher levels than allochthonous LAB, to reach

around 9.2 log CFU/mL. The acidification ability of these autochthonous microbes was also more intense. As a consequence, higher lactic acid rates were obtained. As highlighted in this study, and because of the tremendous amounts of by-products generated by the food industry, carrots pulps could be used as substrate to support LAB growth. To release lactic acid, LAB need an available carbon source. Alasalvar *et al.*, (2001) detected sucrose, glucose and fructose in carrots by HPLC – around 2.69, 1.44 and 1.34 g/100 g, respectively. This substrate appears so convenient for microbial cultures.

Based on a previous study made on carrot pulps (Godard *et al.*, 2018), in the present work, we decided to select autochthonous LAB. We intend to use them as starters to value this by-product to obtain high quantities of lactic acid.

2. Materials and methods

LAB isolation

LAB were chosen and isolated from MRS agar on the basis of their morphotypes (Biokar diagnostics, France) after culture of fermented carrot pulp samples. These products originated from a food plant located in the Region of Lyon (France). They have been incubated at 24°C and 37°C in Erlenmeyer flasks (320 g/flask) for 9 days, as described by Godard *et al.* (2018). MRS petri dishes were incubated at 30°C in anaerobic condition (GENbag Anaerobic, Biomérieux, Marcy l'Etoile, France), for 48 h. Bacterial colonies were picked, purified on MRS agar and tested for the presence of the catalase. Only the catalase negative isolates were reserved. A sample of an overnight culture (MRS broth, 30°C) was then put in glycerol (15%, v/v, Roth) to be kept at -80°C.

16S rRNA gene sequencing

Total DNA of the 40 isolate used in this work was extracted from a dense suspension of bacteria obtained from several colonies mixed together in 1 mL of pure water (Godard *et al.*, 2018). The 16S rRNA gene (~1500 bp) was amplified using the universal primers W02R (5'-GNTACCTTGTTACGACTT-3') and W18F (5'-GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') (Sigma, Germany). The PCR reaction medium included 12.5 µL of Phusion High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific), 1.25 µL of each primer (0.5 µM), 5 µL of pure DNA and 5 µL of distilled water. Amplifications were performed using the PCR cycle described by Schlüsselhuber *et al.*, (2018) (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad, USA). DNA sequences were analysed by BIOFIDAL (France). Sequences were then compared to GenBank database (NCBI). Alignments of 16S rRNA gene sequences were achieved with the Muscle Alignment tool of the MEGA 7 software. Evolutionary distances were computed according to the Tamura-Nei method. For the LAB group assignment, we followed the classification proposed by Salvetti *et al.*, (2012) and Gu *et al.*, (2013).

Screening of isolated LAB for lactic acid production

Isolates were screened in microplates (96 wells) with modified-MRS medium (mMRS): glucose (20 g/L, Sigma), polypeptone (10 g/L, Oxoid), meat extract (10 g/L, Biokar), autolytic yeast extract (5 g/L, Biokar), tween 80 (1.08 g/L, AppliChem PanReac), sodium acetate (5 g/L, Sigma), ammonium citrate (2 g/L, Honeywell, USA), magnesium sulfate (0.2 g/L, Sigma), manganese sulfate (0.05 g/L, Sigma), bromocresol green (0.004 g/L, Chimie-Plus Laboratoires), adjusted to pH 6.4. After thawing, 10 mL of MRS broth were inoculated with one strain and incubated at 30°C. The optical density at 600 nm (OD_{600}) of the overnight culture was then adjusted to 1. In each well of the microplate, 180 μ L of sterile mMRS medium were added with 20 μ L of the adjusted suspension. Acidification efficiency was evaluated after a 4.5 h delay. This time, sufficient to discriminate the samples from each other, was based on the shift of the pH indicator. The most effective strains were kept for further tests.

Then, strains previously selected were tested in Erlenmeyer flasks. LAB cultures were first carried out in 10 mL of MRS broth (30°C, one night). The OD_{600} of each culture was adjusted to 0.1 in MRS broth to be cultured at 30°C. As soon as the OD_{600} reached 0.3 (exponential phase, corresponding to 8 log CFU/mL), the Erlenmeyer flasks containing either MRS broth (150 mL) or carrot like medium (150 g) were inoculated at OD_{600} of 0.01 (for description of the carrot like medium, see below). Fermentations were carried out for 72 h at 30°C. For the MRS medium, supernatants were recovered after a centrifugation step of 5 min at 20,000 g. For carrot-like medium, 2 g of carrot pulps were suspended in 18 mL of sterile physiological water (NaCl, 9 g/L, Sigma) and homogenised with a stomacher apparatus (Smasher®, Biomérieux, France).

Carrot-like medium characterization

Fermentations carried out in the carrot-like medium were performed in triplicate at 30°C for 72 h. Supernatants samples were stored at -20°C prior any analysis. Concentrations of acetic and lactic acids were measured with enzymatic kits (R-Biophram, Germany). The total titratable acidity (TTA) value was defined as the amount of a 0.1 N NaOH solution required to reach a pH-value of 8.5. The results were expressed in microliters (Rizzello *et al.*, 2018).

Carrot pulps were retrieved from the same producer stated above and stored at -20°C. The composition of the carrot-like medium was the following (for 100 g): 75 g of mashed carrots formerly cooked at 100°C for 30 min, 25 g of water, 0.4 mg of bromocresol green; the pH was adjusted at pH 6.4. The medium was then heat-treated at 100°C for 30 min.

pH was determined with a pH-meter (HI 2211, pH/ORP Meter, Hanna instruments), on 10 mL of the supernatant. Water availability (A_w) was measured with a A_w meter (Aw Sprint, TH-500, Novasina) on a sample of the carrot-like medium.

(GTG)₅ LAB profile

The comparison of LAB isolates was performed by (GTG)₅-PCR. PCR mix contained: 2 µL 10X Reaction Buffer, 4 µL (GTG)₅ primer (5'-GTG GTG GTG GTG GTG-3'), 1 µL dNTP (20 mM), 0.6 µL MgCl₂ (50 mM), Taq DNA polymerase (5 units/µL, Sigma), 15.2 µL of water and 1 µL of diluted DNA (1/10). All reagents came from Eurogentec (Belgium). The initial denaturation at 94°C for 5 min was followed by 32 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, primer annealing at 50°C for 1 min and extension at 72°C for 1 min. The last cycle was followed by the final elongation at 72°C for 10 min. The band patterns were normalized and processed using GelCompar 3.1 software (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) as previously described by Demarigny *et al.*, (2012). To ensure reproducible (GTG)₅-PCR results, total DNA from two strains was prepared independently six times and assayed by (GTG)₅-PCR. All profiles of a strain had similarity coefficient higher or equivalent to 80%.

Carbohydrate utilization profile

The four selected strains for lactic acid production were tested according to biochemical tests based on the fermentation of 49 different sugars using an API 50 CHL *Lactobacillus* system (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France). Kits were inoculated and incubated according to the manufacturer's procedures.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the XLStat software (Microsoft, 2016).

3. Results

LAB diversity in fermented carrot pulps

According to the results we obtained in a previous study (Godard *et al.*, 2018), LAB population dominated over the other microflora enumerated in the carrot pulps. The LAB levels ranged between 8.20 and 9.07 log CFU/mL following the samples used for the isolation steps. Yeasts and fungi, enterococci and acetic acid bacteria were counted at sub-dominant levels, ranging between 5.35 and 7.22 log CFU/mL. *Enterobacteriaceae*, *Bacillus* and *Pseudomonas* never exceed 5.06 log CFU/mL. Forty colonies were isolated from MRS agar cultured in anaerobic conditions. All the isolates proved to be catalase negative, a feature characteristic of LAB. Among them, two genera were identified according to the 16S rRNA gene sequencing: *Lactobacillus* and *Leuconostoc*. Seventeen species were identified: *Lactobacillus paracasei* (7 out of 40 isolates), *Lb. nenjiangensis* (6/40), *Lb. harbinensis* (4/40), *Lb. coryniformis* (3/40), *Lb. parabuchneri* (3/40), *Leuconostoc kimchii* (3/40), *Lb. sunkii* (2/40), *Lb. mudanjiangensis* (2/40), *Lb. delbrueckii* (2/40), *Lb. silogincola* (1/40), *Lb. rhamnosus* (1/40), *Lb. porcinae* (1/40), *Lb. plantarum* (1/40), *Lb. perolens* (1/40), *Lb. otakiensis* (1/40), *Lb. koreensis* (1/40) and *Lb. bif fermentans* (1/40) (Figure 1). The phylogenetic relationships between LAB strains, based on

their 16S rRNA gene sequencing, were represented on Figure 2. Nine groups of *Lactobacillus* were identified.

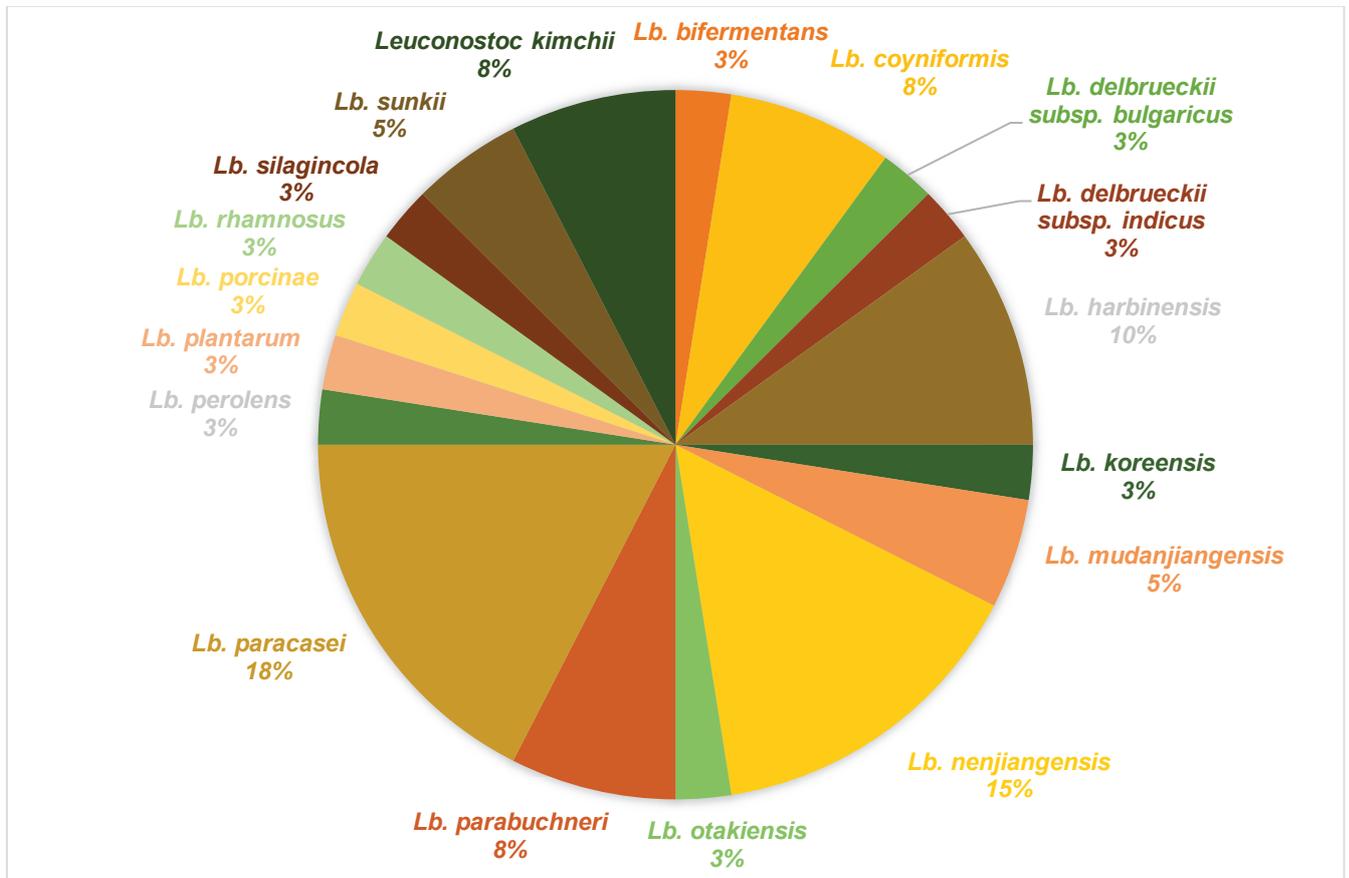


Figure 1: Diversity of the 40 strains isolated from fermented carrot pulps based on the 16S rRNA gene sequencing. Strains were picked on MRS agar incubated in anaerobic conditions for 72 h at 30°C.

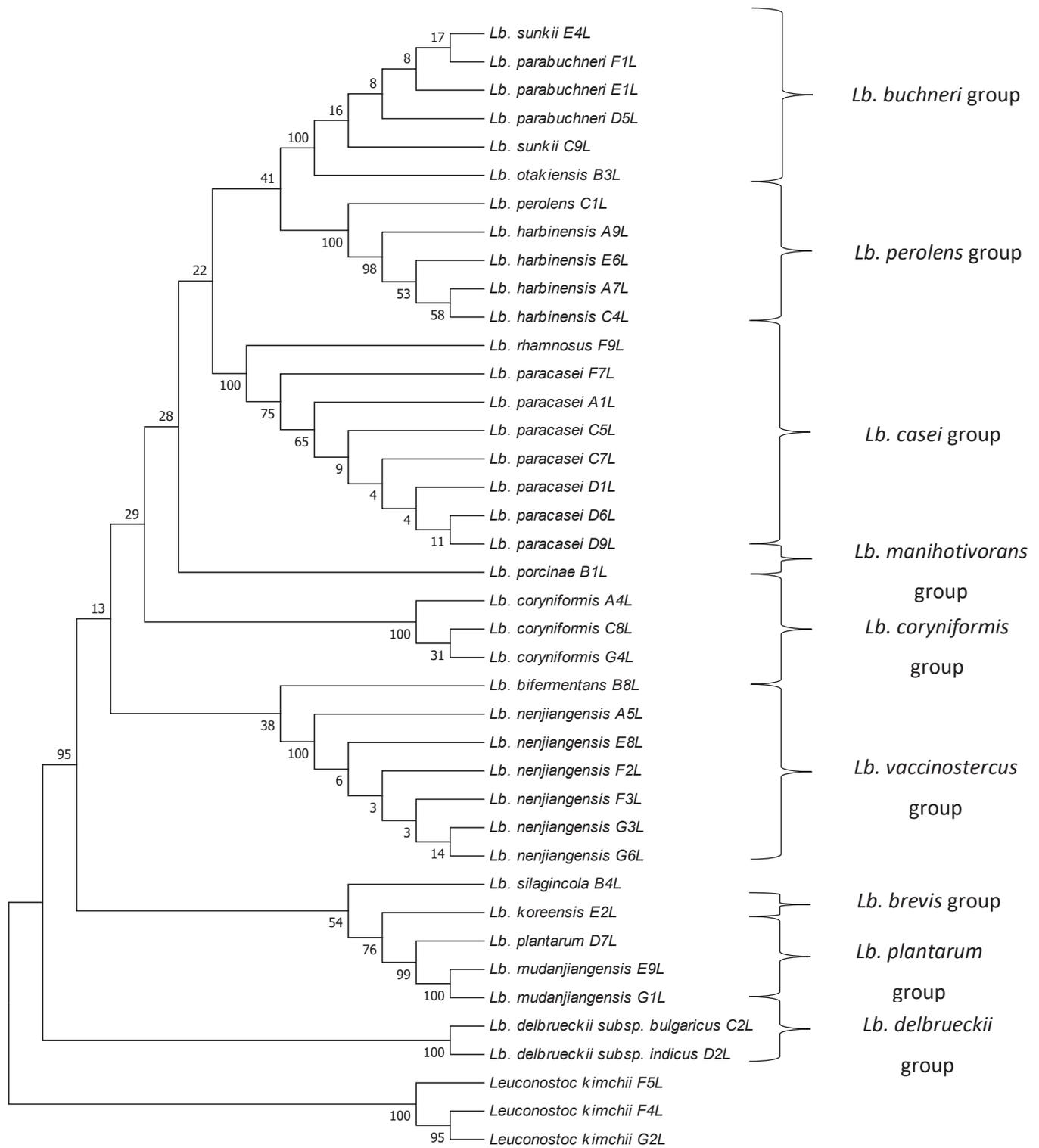


Figure 2: Phylogenetic tree of the LAB 16S rRNA genes isolated from carrot pulps based on the Neighbour-joining method. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1,000 replicates) are shown next to the branches. The evolutionary distances were computed using the Tamura-Nei method.

Screening of LAB for lactic acid production

Among the 40 strains, 31 were able to grow in MRS broth after an overnight incubation at 30°C. Their acidification ability was tested in microplates in mMRS medium. After a 4.5 h delay, nine strains changed quickly the pH indicator from blue to yellow. The other strains were put aside for the rest of the study. The nine strains belonged to the species *Lb. paracasei* (2), *Lb. nenjiangensis* (1), *Lb. harbinensis* (2), *Lb. coryniformis* (1), *Lb. mudajiangensis* (1), *Lb. porcinae* (1), *Ln. kimchii* (1). D- and L-lactic acid concentrations produced by the nine LAB strains were measured in Erlenmeyer flasks containing either 150 mL of MRS broth or 150 g of carrot-like medium (approximately 150 mL). The mean concentrations measured were respectively equal to 998 mg/L and 628 mg/L in carrot-like medium and 13,721.2 mg/L and 14,952.7 mg/L in MRS medium. In detail, lactic acid rates measured in the carrot-like medium after 72 h varied from 225 to 1,008 mg/L. The L-lactic acid proportion ranged between 15 and 98% depending on the strains. On the basis of the D and L-lactic acid rates obtained (materialized by the outlined variables on Figure 3), a principal component analysis was performed. The first and the second axes of the PCA totaled 90.11% of the information inertia. B1L, F3L and F5L strains produced lesser amounts of D- and L-lactic acid on carrot-like medium (on the left of the figure 3). They were not kept afterwards. The two species of *Lactobacillus paracasei* (A1L and F7L) and *Lb. harbinensis* (E6L and A9L), placed on the right of the figure, were able to produce high lactic acid concentrations. For these four strains, L-lactic acid accounted for more than 94% of the total lactic acid produced.

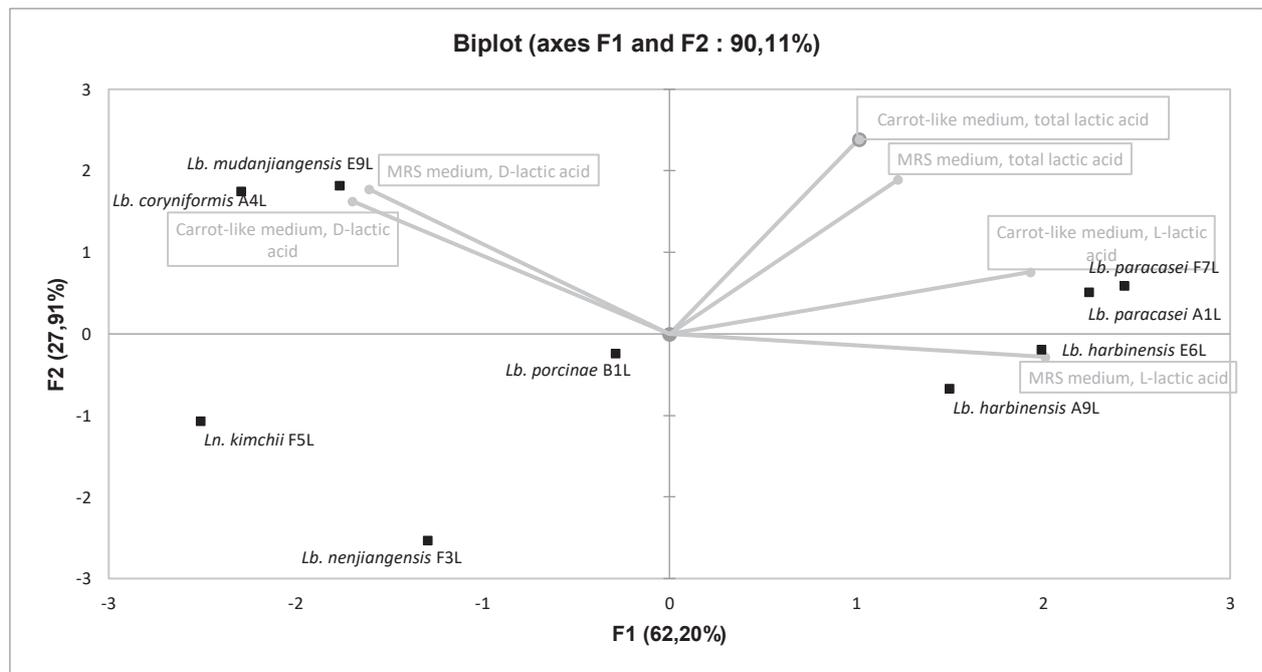


Figure 3: Principal Component Analysis (PCA) of D-, L- and total lactic acid rates. Results were obtained after MRS and carrot-like media fermentation for 72 h at 30°C. Strains able to acidifying mMRS medium after a 4.5 h delay, are figured in plain squares; and variables in plain circles and surrounded.

Carrot-like medium characterization

Forty-nine carbohydrates were tested to determine the fermentative profiles of the strains; nine allowed us to discriminate the two *Lactobacillus paracasei* (A1L and F7L) and the two *Lb. harbinensis* (E6L and A9L) (Table 1). In particular, strain A1L used dulcitol and starch, and strain F7L, D-sorbitol and D-adonitol. Concerning the two *Lb. harbinensis* strains, some differences were also observed. For instance, A9L strain was able to metabolize D-lactose, unlike E6L strain which specifically used D-arabinose and D-sorbitol.

Table 1: Carbohydrate profiles of *Lb. paracasei* A1L and F7L and *Lb. harbinensis* A9L and E6L. Absence of growth: -, growth: +, weak growth: +/-

Substrate	<i>Lb. paracasei</i> A1L	<i>Lb. paracasei</i> F7L	<i>Lb. harbinensis</i> A9L	<i>Lb. harbinensis</i> E6L
D-Arabinose	-	-	-	+/-
L-Arabinose	-	-	+	+
D-Adonitol	-	+	-	-
Dulcitol	+	-	-	-
D-Mannitol	+	+	-	-
D-Sorbitol	+/-	+	-	+/-
D-Lactose	+	+	+	-
D-Melibiose	-	-	+	+/-
Starch	+/-	-	+/-	+/-

(GTG)₅-PCR profiles allowed us to separate the strains. At the similarity coefficient of 80%, the four strains finally selected appeared clearly distinct (Figure 4).

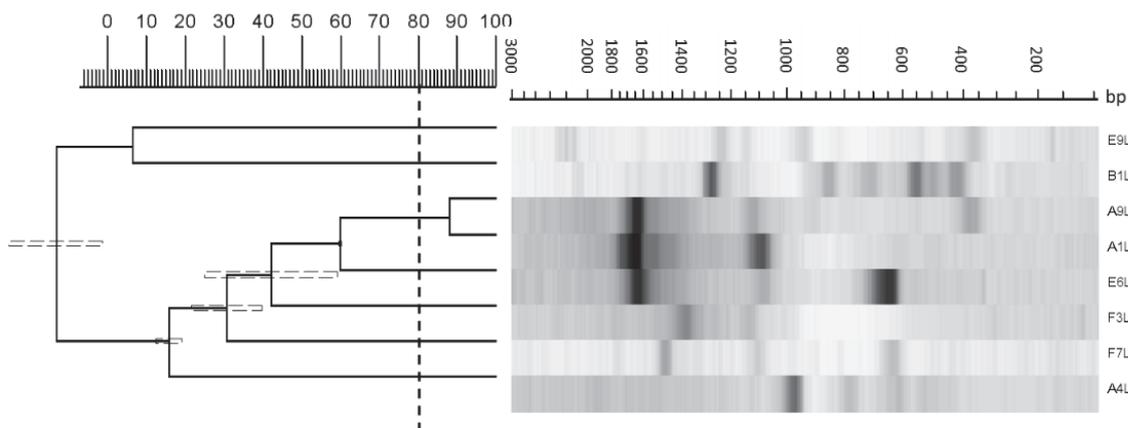


Figure 4: Dendrogram drawn by UPGMA of correlation value of normalized (GTG)₅-PCR patterns from lactobacilli obtained with primer (GTG)₅. Each pattern is identified by the codification of the strain. The coefficient of similarity (80%) is materialised by a vertical dotted line.

Environmental parameters, especially pH and A_w , are crucial for microbial growth. In the carrot-like medium, the pH, the TTA and the A_w at the beginning of the fermentation step were respectively equal to 5.30 +/- 0.07 and 127.50 +/- 10.55 μL and 0.994 +/- 0.001. After 72 h of incubation, the carrot-like medium seeded with *Lb. paracasei* A1L or F7L strains was more acid than the media containing *Lb. harbinensis* A9L or E6L strains (Table 2). The initial pH measured for all samples was equal to 5.30 +/- 0.07. pH variations measured were equal to -1.67 +/- 0.23 and -1.80 +/- 0.08, and -1.22 +/- 0.03 and -1.40 +/- 0.03, respectively. Thereafter, as a consequence of the fermentation step, the pH decreased to reach respectively 3.57 +/- 0.13 and 3.53 +/- 0.07, and 4.10 +/- 0.02 and 3.89 +/- 0.01. TTA differences were higher for *Lb. paracasei* strains, with NaOH volumes equal to 620.0 +/- 272.2 and 740.0 +/- 132.3 μL . According to TTA changes, the L-lactic acid quantities measured were higher with *Lb. paracasei* strains in comparison with *Lb. harbinensis* strains, with values at the end of fermentation of 713.2 +/- 254.7 and 873.8 +/- 148.5 mg/L. *Lb. paracasei* A1L strain produced 19.22 +/- 14.68 mg/L of D-lactic acid, unlike other strains, for which D-lactic acid was not detected. Acetic acid was never measured whatever the strain considered. pH, TTA and lactic acid concentrations were analysed by ANOVA. *Lb. paracasei* and *Lb. harbinensis* appeared significantly different ($p < 0.001$). The two strains of *Lb. paracasei* were able to produce higher lactic acid concentrations, - and consequently they strongly acidified the medium - than *Lb. harbinensis*. However, within each species, the two strains could not be separated from each other ($p > 0.05$).

Table 2: Means and standard deviations (3 repetitions) of pH, titratable acidity (TTA) and organic acid rates, after 72 h of fermentation in carrot-like medium. Final pH refers to the value at the end of the fermented step. Other data are expressed as the difference between 72 h and the initial time. TTA is expressed in μL and lactic acid in mg/L; nd: not detected.

Strain	Final pH	Δ pH	TTA	L-Lactic acid	D-lactic acid
<i>Lb. paracasei</i> A1L	3.57 +/- 0.13	-1.67 +/- 0.23	620.0 +/- 272.2	713.2 +/- 254.7	19.22 +/- 14.68
<i>Lb. paracasei</i> F7L	3.53 +/- 0.07	-1.80 +/- 0.08	740.0 +/- 132.3	873.8 +/- 148.5	n.d
<i>Lb. harbinensis</i> A9L	4.10 +/- 0.02	-1.22 +/- 0.03	193.3 +/- 37.8	435.3 +/- 35.6	n.d
<i>Lb. harbinensis</i> E6L	3.89 +/- 0.01	-1.40 +/- 0.03	266.7 +/- 41.6	466.5 +/- 63.0	n.d

4. Discussion

The present study focused on the valorisation of carrot pulp wastes and the selection of LAB strains for their ability to produce L-lactic acid. Lactic acid being used, for instance, in bioplastic production, the optimization of this processing represents an industrial challenge. Among the dominant microflora of the fermented vegetables, LAB are frequently found (Gänzle, 2015). In order to select a strain of technological interest, two culture media were used. The MRS medium was considered as a control for the fermentation. A sterile carrot-like medium was developed to test the microorganisms in an environment as close as possible to the vegetable substrate. We isolated an interesting lactic acid bacteria from fermented carrot pulps, which was further identified as

Lb. paracasei A1L. LAB were isolated from samples of fermented carrot pulps submitted to two different temperatures, 24°C or 37°C (Godard *et al.*, 2018). Samples were picked at several stages during the nine days of the fermentation step. Cultural-dependant approach was chosen to allow us the isolation of viable and cultivable LAB from Petri dishes.

Whatever the sampling stage, LAB ranged between 7.57 and 9.07 log CFU/mL. Using cultural methods, Wouters *et al.*, (2013c) investigated the microbial diversity during the fermentation of cauliflower and vegetable mix (tomatoes, carrots and celery). At the beginning of the fermentation step, the authors counted lower LAB rates - between 1 and 2 log CFU/mL - compared with our results obtained in fermented carrot pulps. However, after 1 to 2 months, the levels were similar with ours, values ranging between 5.3 and 11.4 log CFU/mL following the substrate. Among the 253 isolates collected, the genera *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* and *Weissella* were identified using the (GTG)₅-PCR method. In our study, we only found the two genera *Lactobacillus* and *Leuconostoc*. This association is frequently noticed when vegetables are fermented. It is assumed that the heterofermentative metabolism of *Leuconostoc* linked with their ability to produce exopolysaccharides could explain their aptitude to survive in harsh conditions (Demarigny, 2012). In a vegetable environment, heterofermentative cocci, and among them *Leuconostoc*, produce gas from carbohydrate sources, generating advantageous growth conditions for lactobacilli (J. Yang *et al.*, 2010). The 40 strains identified from carrot pulps were shared into nine *Lactobacillus* groups, seven being already known for their implication in vegetable fermentations. Among them, *Lb. plantarum* has been described for long time as very adaptable to drastic conditions. This microbe is found in many food products such as pickles, sauerkraut or olives (Gänzle, 2015). This bacterium owns many genes able to degrade various carbon sources (Kleerebezem *et al.*, 2003). Moreover, *Lb. plantarum* is rather resistant to the low pH (below 4) that are frequently reached during vegetable fermentation (Todorov and Franco, 2010). In our case, *Lb. plantarum* proved to be less frequent than awaited. The specific physico-chemical characteristics of the carrots could explain this observation.

In the fermented carrot pulps, the main species identified were *Lb. paracasei*, *Lb. nenjiangensis* and *Lb. harbinensis*. As stated before in the literature, they were found in different food products, Chinese sauerkraut for example (Table3). We also identified some other species of *Lactobacillus* and *Leuconostoc*, but at low frequencies. Among them, *Lb. coryniformis*, *Lb. bif fermentans*, *Lb. parabuchneri*, *Lb. rhamnosus* and *Lb. delbrueckii* were also isolated from the surface of cabbage and lettuce leaves (J. Yang *et al.*, 2010).

Chapitre 6 : Optimisation de la production d'acide lactique à partir de la matrice modèle : la pulpe de carottes

Table 3: *Lactobacillus* species identified in the literature during vegetable fermentation. Groups were defined according to Salvetti et al., (2012) and Gu et al., (2013).

Lactobacillus group	Species of this study	Fermented vegetable	References
<i>Lb. buchneri</i>	<i>Lb. parabuchneri</i>	Wet wheat, cabbage, lettuce	(Olstorpe et al., 2010; J. Yang et al., 2010)
	<i>Lb. sunkii</i>	Pickle	(Watanabe et al., 2009)
	<i>Lb. otakiensis</i>	Pickle	(Watanabe et al., 2009)
<i>Lb. perolens</i>	<i>Lb. perolens</i>	Wet wheat	(Olstorpe et al., 2010)
	<i>Lb. harbinensis</i>	Chinese sauerkraut	(Miyamoto et al., 2005; Sagdic et al., 2014)
<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	Chinese sauerkraut, cabbage, lettuce	(J. Yang et al., 2010; Z. Yang et al., 2010)
<i>Lb. delbrueckii</i>	<i>Lb. delbrueckii</i>	Cabbage, lettuce	(J. Yang et al., 2010)
<i>Lb. coryniformis</i>	<i>Lb. coryniformis</i>	Cabbage, lettuce	(J. Yang et al., 2010)
	<i>Lb. bif fermentans</i>	Kimchi, cabbage, lettuce	(Jhon and Lee, 2003; J. Yang et al., 2010)
<i>Lb. vaccinostercus</i>	<i>Lb. nenjiangensis</i>	Pickle	(Gu et al., 2013)
<i>Lb. koreensis</i>	<i>Lb. koreensis</i>	Kimchi	(Bui et al., 2011)
<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. plantarum</i>	Wet wheat, leek, Romanian vegetable, carrots, sauerkraut, pickle	(Gänzle, 2015; Olstorpe et al., 2010; Wouters et al., 2013; Wouters et al., 2013b)
	<i>Lb. mudanjiangensis</i>	Chinese pickle	(Gu et al., 2013)

As indicated in the result part, nine of the strains out of forty exhibited significant acidifying capacities on modified MRS broth; L-lactic acid rates ranged between 67 and 960 mg/L depending on the strain. The modified MRS medium did not contain dipotassium phosphate. It was not buffered to allow the pH and the titratable acidity to vary during the culture. Moon et al., (2012) and Zhang et al., (2015) used a similar approach to screen *Lactobacillus* strains submitted to different conditions. This allowed them to test the metabolic activity of their microorganisms in controlled and growth enhancing model media, *i.e.* rich in glucose and available nitrogen compounds.

Some of our strains were homofermentative (*Lb. mudanjiangensis* and *Lb. porcinae*) and the other facultatively heterofermentative (*Lb. paracasei*, *Lb. nenjiangensis*, *Lb. harbinensis*, *Lb. coryniformis* and *L. kimchii*). On the basis of the results obtained with the MRS medium, cultures in carrot-like medium were carried out in order to mimic what could be the microbial development in the carrot pulps. Results confirmed the trends observed on MRS medium. *Lb. paracasei* and *Lb. harbinensis* mainly produced L-lactic acid (>93% of the total amount of lactic acid). If the metabolic characteristics of *Lb. paracasei* are now well documented in some products (*e.g.* cheeses), the role of

these two species in fermented vegetable products is still largely unknown. For example, *Lb. paracasei* can be added during cheese making for its probiotic abilities (Buriti *et al.*, 2007). This bacterium is able to survive to acid pH (3) and to bile salts (0.3%), which are conditions as harsh as those found in the digestive tract (Kask *et al.*, 2003).

In modified MRS broth, the lactic acid production of *Lb. harbinensis* was 10% higher than those obtained with *Lb. paracasei*; whereas in carrot-like medium, *Lb. paracasei* produced 1.6 times more of lactic acid. The lactic acid concentrations were respectively 14 and 24 times lower in carrot-like medium compared to MRS medium, whatever the species considered. In all cases, the D-lactic acid rate was very low, no more than 2 to 6% of the total acid produced; acetic acid was never detected. These facultative heterofermentative lactobacilli seemed therefore to favour the homofermentative pathway. Such a metabolic choice is largely dependent on the physico-chemical and nutritional parameters of the environment. For instance, Prückler *et al.*, (2015b) reported that the two heterofermentative *Lb. plantarum* and *Lb. pentosus* cultured on wheat bran – a substrate which contains high concentrations of available glucose -, only produced lactic acid (41.75 mg/g). Acetic acid was not detected as well. In the meantime, *Lb. acidophilus* and *Lb. delbrueckii* (strictly homofermentative and thermophilic bacteria) were unable to release lactic acid under the given conditions. However, these experiments were made at 30°C. This temperature being lower than the optimal growth temperature of these two last microorganisms, their low activity seemed logical. As observed in the course of our experiments, *Lb. plantarum* and *Lb. pentosus* did not produced acetic acid. Moon *et al.*, (2012) used the strain *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* CHB2121 to produce L-lactic acid in MRS broth. After 21 hours of culture, the lactic acid concentration in the medium was close to 95 g/L for a yield of 93%. In presence of glucose as the only carbon source, the *Lb. paracasei* metabolism led to the exclusive production of lactic acid.

Based on the (GTG)₅-PCR profiles, we can argue that the strains we isolated were clearly distinct. This assertion was confirmed by the analysis of some of their respective abilities; in particular, the use of specific carbohydrates. For example, *Lb. paracasei* A1L was able to use starch. This polymer is frequently found inside plant cells. The concentration of starch in raw carrots is close to 0.8 g/100 g. This aptitude can then give a putative selective advantage to the bacteria (Anses, 2017). The carrot pulp used to make the carrot-like medium was sterilized to avoid any competition with the adventitious microorganisms present in the raw pulp. In a later work, we will test the settlement of our strains under the pressure of the other microbes. It is so important as native bacteria are generally known to be well adapted to their environment. Wouters *et al.*, (2013a) investigated the influence of the addition of a selected *Lb. plantarum* strain during the fermentation of vegetable mix (carrot,

tomato and cauliflower). Compared with the control, a rapid acidification rate of the inoculated samples was observed.

We are also aware of the strong variability of the carrot pulp characteristics - depending on the carrot species, harvesting conditions, season or adventitious microbial flora. Consequently, L-lactic acid concentrations depend on the physico-chemical environment of the matrix, which is likely to impair the results; this will be later assessed. The measures we made on the raw carrots were usual – pH 5.2, A_w 0.99. This is frequently found in fresh carrots, the pH ranging between 4.9 to 5.2. Such a pH value can be considered as favourable to support the growth of most of the *Lactobacillus* strains. It is assumed that, depending on species and strains, lactobacilli can cope with pH as low as 3. If we consider A_w , a level of 0.99 favours the growth of any microbes (Jay *et al.*, 2005). The physico-chemical conditions of the pulps seemed therefore adapted to their re-use as fermentation substrate. This work brought evidences that the addition of lactobacilli could appear a good option to obtain bio-lactic acid. From now on, it is necessary to optimize the culture conditions to maximize the lactic acid production.

5. Conclusion

In this study, we showed that *Lb. paracasei* A1L was able to produce L-lactic acid in a carrot substrate. However, at that time, the yields are still too low to allow its transfer at the industrial scale. Consequently, experiments have to be made to optimize the lactic acid production. The first optimization step involves the extrinsic and intrinsic factor adjustment, mainly the temperature and the pH; but also the sugar or nitrogen compound concentrations. The second step will focus on inhibiting factors that could impair lactic acid production; and that would be specific to carrot pulp. In the context of industrial processes, it could be interesting to use co-cultures with two *Lb. paracasei* strains to avoid phage infection or with one *Lactobacillus* and one *Leuconostoc*. The compatibility of the two strains and their ability to cooperate in the same ecosystem will have to be tested. To conclude, scale-up will have to be taken into account to obtain sufficient yields of lactic acid.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Endowment Fund “TERRA ISARA”, the competitiveness cluster “Terralia” and the industrial supports.

References

Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2013). Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances*, 31, 877-902.

Abu Yazid, N., Barrena, R., Komilis, D., & Sánchez, A. (2017). Solid-State Fermentation as a Novel Paradigm for Organic Waste Valorization: A Review. *Sustainability*, 9, 224.

Chapitre 6 : Optimisation de la production d'acide lactique à partir de la matrice modèle : la pulpe de carottes

Alasalvar, C., Grigor, J. M., Zhang, D., Quantick, P. C., & Shahidi, F. (2001). Comparison of Volatiles, Phenolics, Sugars, Antioxidant Vitamins, and Sensory Quality of Different Colored Carrot Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1410-1416.

Anses (2017). Ciqual tables of nutritional composition of foods. Retrieved May 22, 2019. Available online at: <https://ciqual.anses.fr/>

Bui, T. P. N., Kim, Y.-J., In, J.-G., & Yang, D.-C. (2011). *Lactobacillus koreensis* sp. nov., isolated from the traditional Korean food kimchi. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 61, 772-776.

Buriti, F., Cardarelli, H., Filisetti, T., & Saad, S. (2007). Synbiotic potential of fresh cream cheese supplemented with inulin and *Lactobacillus paracasei* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*. *Food Chemistry*, 104, 1605-1610.

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. *International Journal of Food Science & Technology*, 47, 2469-2476.

Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2013). Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiology*, 33, 1-10.

Di Cagno, R., Surico, R. F., Siragusa, S., De Angelis, M., Paradiso, A., Minervini, F., ... Gobbetti, M. (2008). Selection and use of autochthonous mixed starter for lactic acid fermentation of carrots, French beans or marrows. *International Journal of Food Microbiology*, 127, 220-228.

FAO. (2013). Food wastage footprint. Impacts on natural resources. Summary report. FAO, 1-63.

Gänzle, M. G. (2015). Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, 2, 106-117.

Gardner, N. J., Savard, T., Obermeier, P., Caldwell, G., & Champagne, C. P. (2001). Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage, beet and onion vegetable mixtures. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 261-275.

Godard, J., Hennequin, D., Hallier, A., & Demarigny, Y. (2018). Evolution of carrot pulps during spontaneous fermentation. *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research*, 6.

Chapitre 6 : Optimisation de la production d'acide lactique à partir de la matrice modèle : la pulpe de carottes

Gu, C. T., Li, C. Y., Yang, L. J., & Huo, G. C. (2013). *Lactobacillus mudanjiangensis* sp. nov., *Lactobacillus songhuajiangensis* sp. nov. and *Lactobacillus nenjiangensis* sp. nov., isolated from Chinese traditional pickle and sourdough. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 63, 4698-4706.

Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2005). *Modern food microbiology* (7th ed). New York: Springer.

Jhon, D.-Y., & Lee, S. H. (2003). Complete DNA sequence and analysis of a cryptic plasmid isolated from *Lactobacillus bifementans* in Kimchi. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13, 1018-1020.

Kask, S., Adamberg, K., Orłowski, A., Vogensen, F. K., Møller, P. L., Ardö, Y., & Paalme, T. (2003). Physiological properties of *Lactobacillus paracasei*, *L. danicus* and *L. curvatus* strains isolated from Estonian semi-hard cheese. *Food Research International*, 36, 1037-1046.

Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O. P., Leer, R., ... Siezen, R. J. (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 1990-1995.

López-Gómez, J. P., Alexandri, M., Schneider, R., & Venus, J. (2019). A review on the current developments in continuous lactic acid fermentations and case studies utilising inexpensive raw materials. *Process Biochemistry*, 79, 1-10.

Miyamoto, M., Seto, Y., Hai Hao, D., Teshima, T., Bo Sun, Y., Kabuki, T., ... Nakajima, H. (2005). *Lactobacillus harbinensis* sp. nov., consisted of strains isolated from traditional fermented vegetables 'Suan cai' in Harbin, Northeastern China and *Lactobacillus perolens* DSM 12745. *Systematic and Applied Microbiology*, 28, 688-694.

Moon, S.-K., Wee, Y.-J., & Choi, G.-W. (2012). A novel lactic acid bacterium for the production of high purity l-lactic acid, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CHB2121. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114, 155-159.

Olstorpe, M., Axelsson, L., Schnitzler, J., & Passoth, V. (2010). Effect of starter culture inoculation on feed hygiene and microbial population development in fermented pig feed composed of a cereal grain mix with wet wheat distillers' grain: Starter culture in feed fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 129-138.

Prückler, M., Lorenz, C., Endo, A., Kraler, M., Dürschmid, K., Hendriks, K., ... Michlmayr, H. (2015). Comparison of homo- and heterofermentative lactic acid bacteria for implementation of fermented wheat bran in bread. *Food Microbiology*, 49, 211-219.

Rizzello, C. G., Coda, R., Wang, Y., Verni, M., Kajala, I., Katina, K., & Laitila, A. (2018). Characterization of indigenous *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc kimchii*, *Weissella cibaria* and *Weissella confusa* for faba bean bioprocessing. *International Journal of Food Microbiology*.

Sagdic, O., Ozturk, I., Yapar, N., & Yetim, H. (2014). Diversity and probiotic potentials of lactic acid bacteria isolated from gilaburu, a traditional Turkish fermented European cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) fruit drink. *Food Research International*, 64, 537-545.

Salvetti, E., Torriani, S., & Felis, G. E. (2012). The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4, 217-226.

Schlüsselhuber, M., Godard, J., Sebban, M., Bernay, B., Garon, D., Seguin, V., ... Desmasures, N. (2018). Characterization of Milkisin, a Novel Lipopeptide With Antimicrobial Properties Produced By *Pseudomonas* sp. UCMA 17988 Isolated From Bovine Raw Milk. *Frontiers in Microbiology*, 9.

Todorov, S. D., & Franco, B. D. G. D. M. (2010). *Lactobacillus plantarum*: Characterization of the Species and Application in Food Production. *Food Reviews International*, 26, 205-229.

Watanabe, K., Fujimoto, J., Tomii, Y., Sasamoto, M., Makino, H., Kudo, Y., & Okada, S. (2009). *Lactobacillus kisonensis* sp. nov., *Lactobacillus otakiensis* sp. nov., *Lactobacillus rapi* sp. nov. and *Lactobacillus sunkii* sp. nov., heterofermentative species isolated from sunki, a traditional Japanese pickle. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 59, 754-760.

Wouters, D., Bernaert, N., Conjaerts, W., Van Droogenbroeck, B., De Loose, M., & De Vuyst, L. (2013). Species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of spontaneous leek fermentations. *Food Microbiology*, 33, 185-196.

Wouters, Dorrit, Grosu-Tudor, S., Zamfir, M., & De Vuyst, L. (2013a). Applicability of *Lactobacillus plantarum* IMDO 788 as a starter culture to control vegetable fermentations: *Lactobacillus plantarum* IMDO 788 as a starter culture for vegetable fermentations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 3352-3361.

Wouters, Dorrit, Grosu-Tudor, S., Zamfir, M., & De Vuyst, L. (2013b). Bacterial community dynamics, lactic acid bacteria species diversity and metabolite kinetics of traditional Romanian

vegetable fermentations: Romanian spontaneous vegetable fermentations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 749-760.

Yang, J., Cao, Y., Cai, Y., & Terada, F. (2010). Natural populations of lactic acid bacteria isolated from vegetable residues and silage fermentation. *Journal of Dairy Science*, 93, 3136-3145.

Yang, Z., Li, S., Zhang, X., Zeng, X., Li, D., Zhao, Y., & Zhang, J. (2010). Capsular and slime-polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* JAAS8 isolated from Chinese sauerkraut: Potential application in fermented milk products. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110, 53-57.

Zhang, Y., & Vadlani, P. V. (2015). Lactic acid production from biomass-derived sugars via co-fermentation of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119, 694-699.

6.3. Production d'acide L-lactique à partir de pulpe de carottes et l'ensemencement de *Lactobacillus paracasei* A1L

6.3.1. Résultats

6.3.1.1. Variation des conditions d'incubation sur la base d'un plan d'expérience D-optimal

Après avoir sélectionné un microorganisme producteur d'acide L-lactique : *Lactobacillus paracasei* A1L, directement issu de la fermentation de pulpe carotte, la suite du travail s'est intéressée à l'identification des conditions d'incubation les plus favorables à la production de cet acide. L'utilisation d'un plan D-optimal avait pour objectif de déterminer les conditions les plus favorables à la production d'acide lactique, de tester plusieurs variables de fermentation et d'alléger la partie expérimentale en réduisant le nombre d'essais. Les essais ont été menés selon un plan d'expérience D-optimal prenant en compte quatre facteurs : la température d'incubation, la quantité d'enzymes, la quantité de *Lb. paracasei* A1L ensemencée et le pH initial ajusté. Une protéase et une hémicellulase ont été ajoutées dans le but de libérer des substrats protéiques et glucidiques à partir des sous-produits végétaux pour favoriser la croissance microbienne. En parallèle, la capacité de la souche à coloniser le milieu a été étudiée.

Les résultats obtenus n'ont pas pu être exploités selon le plan d'expérience D-optimal. En effet, bien que des essais préalables aient été menés pour ajuster les taux microbiens, au plus proche des valeurs initiales prévues de 10^6 et 10^8 UFC/mL ; les taux réels dénombrés après ensemencement

Chapitre 6 : Optimisation de la production d'acide lactique à partir de la matrice modèle : la pulpe de carottes

étaient nettement supérieurs, impliquant une non-validité des modèles construits (Tableau 7). La matrice d'expérience ne répondait plus au critère de D-optimalité. Les coefficients du modèle étaient alors mal estimés et le modèle non valide. Les données auraient été difficilement exploitables par cette méthode et les conclusions obtenues peu fiables. Afin de faciliter la compréhension du discours, le plan d'expérience restera néanmoins nommé « plan D-optimal » dans la suite du chapitre, celui-ci ayant été construit comme tel au départ des expérimentations.

Tableau 7 : Valeurs attendues et réelles des modalités des facteurs pour le plan d'expérience D-optimal de la fermentation du sous-produit de pulpe de carottes, et la production d'acide L-lactique (n=1). Les enzymes sont une protéase (0,5 U/mL de solution) et une hémicellulose (1,5 U/mL de solution). La quantité finale de pulpe de carottes pour chaque essai était de 300 g.

Code d'expérience	Température d'incubation (°C)	Volume solution enzymatique (ml)	Quantité de <i>Lactobacillus paracasei</i> A1L (UFC/ml) attendue	Quantité de <i>Lactobacillus paracasei</i> A1L (UFC/ml) réelle	pH initial attendu	pH initial mesuré
N1	25	0	0	0	6	5,8
N2	30	0	0	0	4	4,3
N3	20	0,5	0	0	4	4,2
N4	30	0,5	0	0	8	8,2
N5	20	1	0	0	8	8,3
N6	25	1	0	0	4	4,2
N7	30	1	0	0	6	6,1
N8	20	0	10 ⁶	7,98.10 ⁵	4	4,1
N9	20	0	10 ⁶	8,94.10 ⁶	8	8,3
N10	30	0	10 ⁶	8,94.10 ⁶	8	7,9
N11	30	0,5	10 ⁶	7,98.10 ⁵	4	4,2
N12	20	1	10 ⁶	7,98.10 ⁵	6	5,8
N13	25	1	10 ⁶	7,98.10 ⁵	8	8,2
N14	20	0	10 ⁸	8,94.10 ⁸	4	4,3
N15	20	0	10 ⁸	8,00.10 ⁷	8	8,3
N16	30	0	10 ⁸	8,00.10 ⁷	4	3,9
N17	30	0	10 ⁸	8,00.10 ⁷	8	8,2
N18	25	0,5	10 ⁸	8,94.10 ⁸	6	6,3
N19	20	1	10 ⁸	8,00.10 ⁷	4	4,2
N20	20	1	10 ⁸	8,00.10 ⁷	8	7,9
N21	30	1	10 ⁸	8,00.10 ⁷	4	4,3
N22	30	1	10 ⁸	8,94.10 ⁸	8	8,5
N23	25	0,5	10 ⁶	8,94.10 ⁶	6	6,2
N24	25	0,5	10 ⁶	7,98.10 ⁵	6	6,3
N25	25	0,5	10 ⁶	8,94.10 ⁶	6	5,8

Les données ont été traitées par régression linéaire multiple dans le but d'expliquer les différentes réponses mesurées (pH, acidité titrable et quantités d'acides organiques) par les facteurs considérés (la température, l'ajout d'enzymes, l'ensemencement de *Lb. paracasei* A1L et l'ajustement du pH initial). Dans les faits, les analyses tiennent compte des valeurs réelles obtenues lors de l'ajustement des facteurs. La fiabilité des modèles et leur interprétation sont liées à l'indépendance des facteurs entre eux. La matrice des corrélations des facteurs indique des coefficients inférieurs 0,07 qui est la valeur maximale obtenue pour la corrélation entre le pH et la quantité d'enzymes. Les facteurs n'étant pas fortement corrélés, la construction de modèles à partir des données a pu être envisagée. Les modèles tenant compte des interactions entre les facteurs n'ont pas montré d'effets significatifs. La significativité, pour la suite de l'exploitation des résultats, renvoie à des conclusions obtenues par la construction de modèles ne considérant pas les interactions entre les facteurs.

6.3.1.2. Conditions de culture favorables à la production d'acides organiques

L'évolution des paramètres biochimiques de la pulpe de carottes, placée dans les conditions d'incubation décrites dans le plan d'expérience D-optimal, a été suivie durant quatre jours de fermentation.

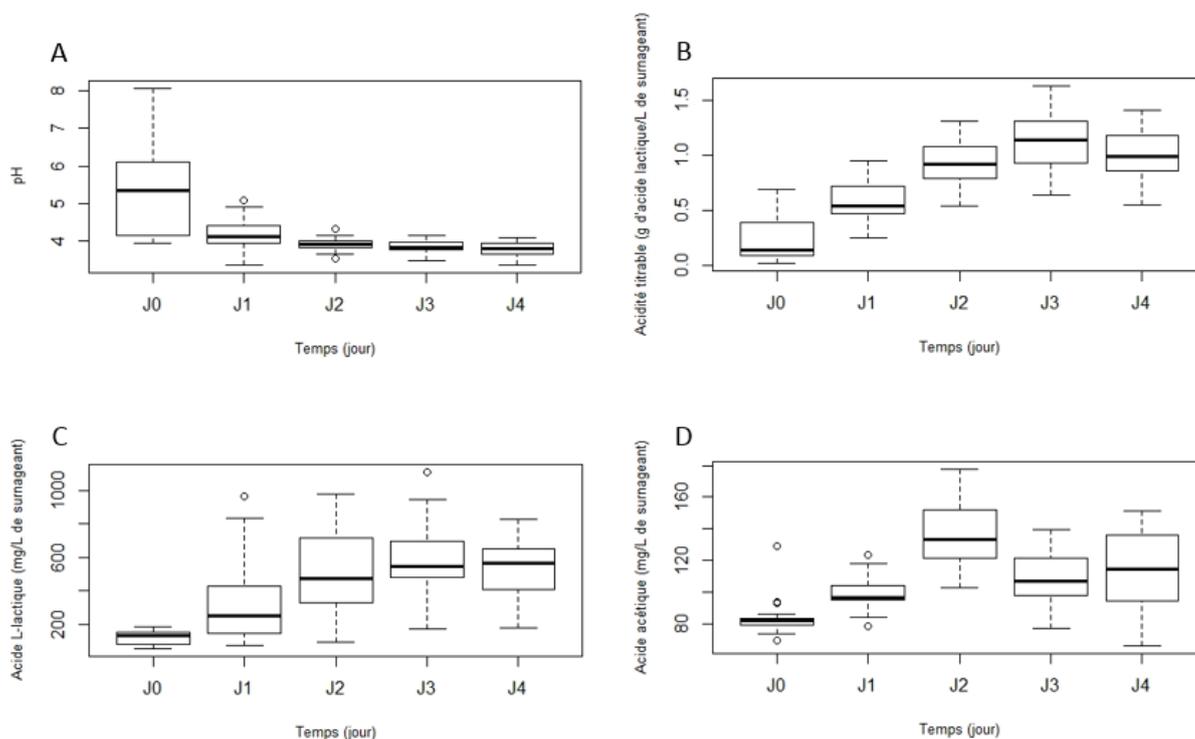


Figure 33 : Evolution du pH, de l'acidité titrable, de la quantité d'acide L-lactique et de l'acide acétique au cours de la fermentation de pulpe de carottes, selon un plan d'expérience D-optimal. Les boxplots représentent les 25 essais menés.

Le pH médian, observé sur l'ensemble des essais, a diminué d'environ 1,5 unité pH au cours du temps pour atteindre une valeur de 3,9 après deux jours de fermentation (Figure 33, A). Cette acidification a été observée pour la totalité des échantillons, quelles que soient les conditions d'incubation appliquées. Elle s'est traduite par une augmentation de l'acidité titrable jusqu'au troisième jour d'incubation (Figure 33, B). Concernant les acides organiques produits, l'acide D-lactique était synthétisé dans des concentrations variables respectivement comprises entre 177 et 556 mg/L, et 131 et 538 mg/L, après deux et trois jours de fermentation. De plus, les médianes étaient proches avec des valeurs de 350 et 367 mg/L. Bien qu'une dispersion des données d'acides L-lactique et acétique synthétisés soit observée, la production moyenne semble augmenter au cours du temps. La quantité médiane maximale d'acide L-lactique était de 564 mg/L, après quatre jours de fermentation (Figure 33, C). Dès le deuxième jour celle-ci était 3,5 fois plus importante que la quantité obtenue à partir du sous-produit brut. Enfin, la quantité d'acide acétique était maximale après deux jours de fermentation, pour une valeur médiane de 133 mg/L (Figure 33, D). Toutefois, il est important de noter, que ceci est une tendance et que les données obtenues pour les quatre jours sont comprises dans un intervalle de 65 à 151 mg/L d'acide acétique produit. Les essais menés semblaient privilégier la production homofermentaire d'acide lactique, et particulièrement l'isomère L-lactique. De plus, l'activité métabolique liée à cette production spécifique a eu lieu dès le deuxième jour de fermentation. L'analyse des données obtenues pour ce jour a donc été approfondie afin d'identifier les modalités d'incubation les plus favorables à la production d'acide L-lactique et leur effet sur la biocénose.

Pour chaque acide organique suivi, l'effet des différentes modalités pour chaque facteur a été observé. Pour l'acide L-lactique, les quantités d'enzymes ajoutées ne favorisent pas significativement sa production.

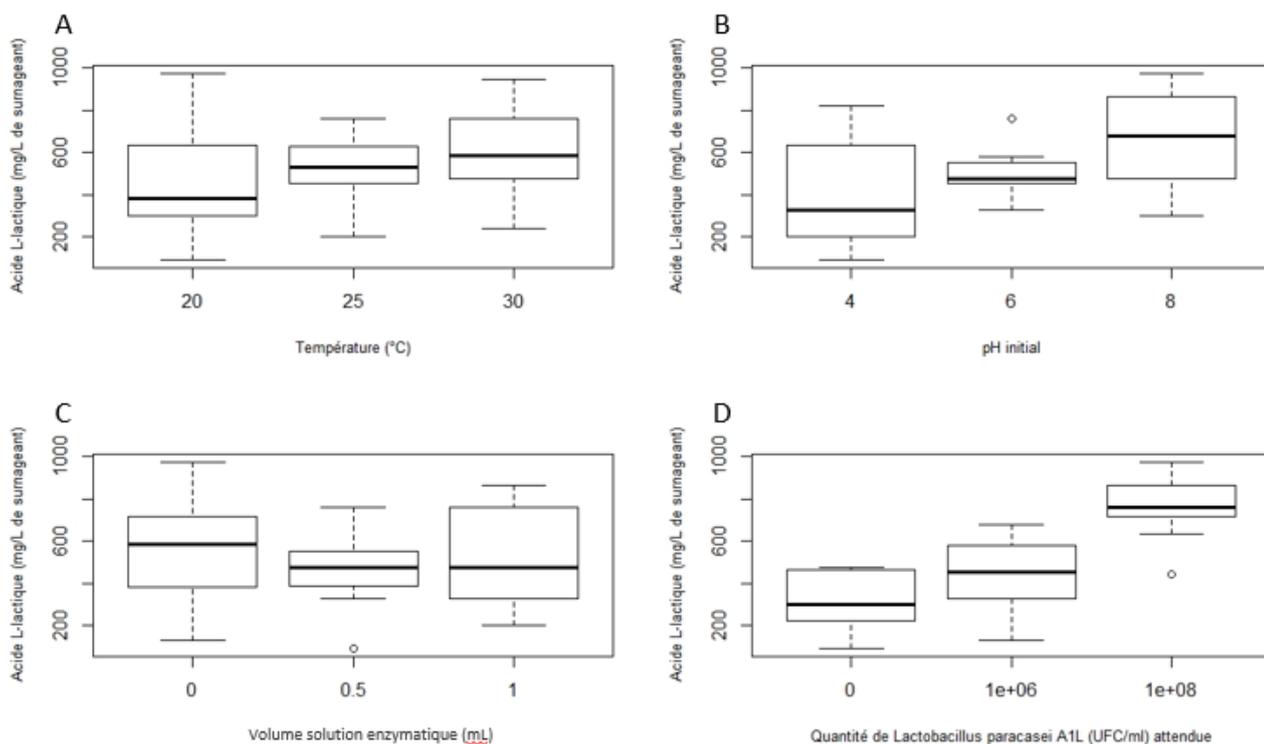


Figure 34 : Quantité d'acide L-lactique après deux jours de fermentation de pulpe de carottes, selon un plan d'expérience D-optimal, en fonction de la température d'incubation, du pH initial, du volume de solution enzymatique ajouté (protéase (0,5 U/mL de solution) et une hémicellulose (1,5 U/mL de solution)) et de la quantité de *Lb. paracasei* A1Lensemencée.

Une légère augmentation des quantités médianes obtenues pour les essais placés à 25 et 30°C est observée ($p < 0,05$), avec des valeurs supérieures à 500 mg/L (Figure 34, A et C). Les quantités maximales d'acide L-lactique étaient obtenues pour les essais dont le pH était de 8 au départ de la fermentation (Figure 34, B, $p < 0,01$). Enfin, la pulpe de carottesensemencée au taux microbien le plus élevé de *Lb. paracasei* A1L (10^8 UFC/mL) présentait des quantités d'acide L-lactique, après deux jours de fermentation, significativement plus importantes ($p < 0,001$).

L'équation ajustée de la régression linéaire ($R^2 = 0,65$) associée pour la production d'acide L-lactique tient compte des facteurs : température d'incubation (X_1), quantité de *Lb. paracasei* A1Lensemencée (X_2) et pH initial (X_3).

$$[\text{Acide L-lactique}] = -447,437 + 16,095X_1 + 19,208X_2 + 54,971X_3$$

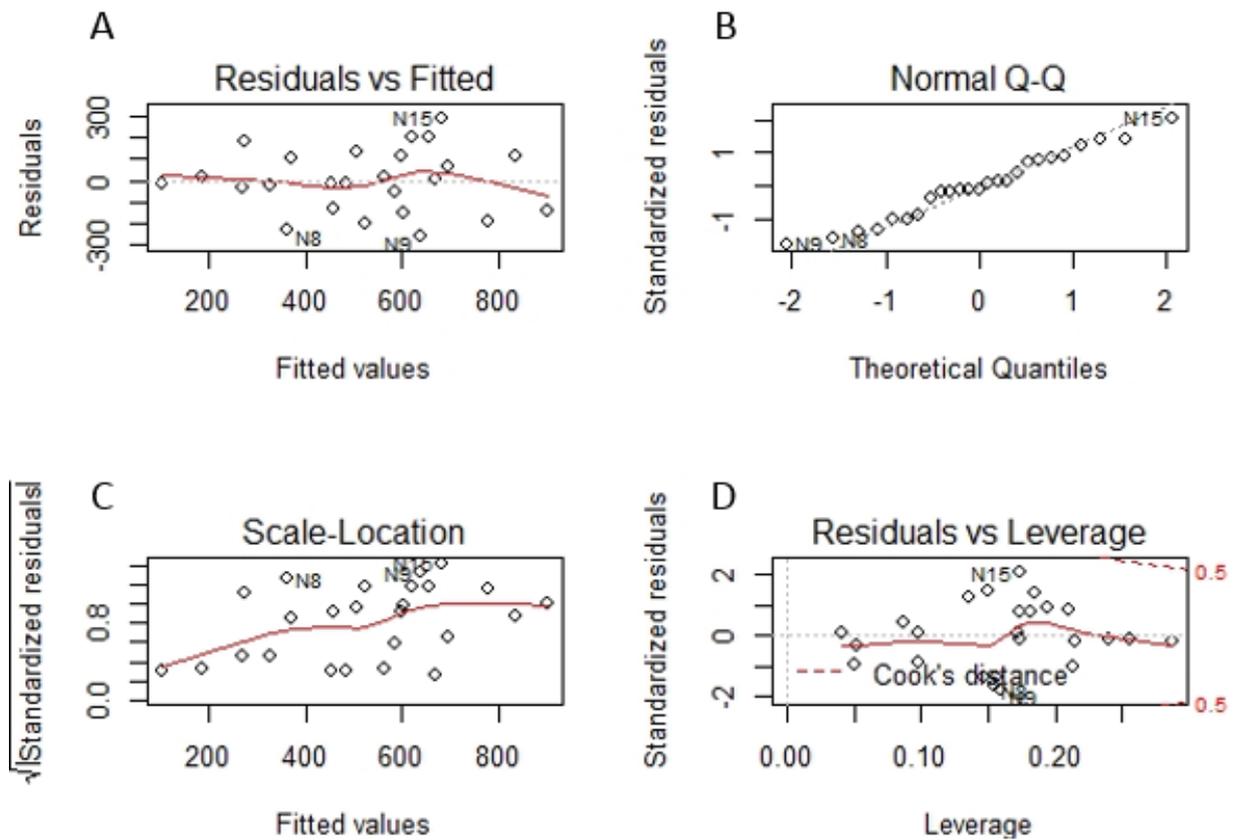


Figure 35 : Diagnostic graphique de la régression linéaire pour la production d'acide L-lactique.

L'analyse des résidus permet d'évaluer la qualité du modèle. Le graphique « Residuals vs fitted » met en évidence une répartition homogène des résidus autour du modèle et l'indépendance des résidus (Figure 35, A). Les résidus semblent également suivre une loi normale, bien que les résidus des essais N8, N9 et N15 ne soient pas exactement alignés au reste des essais (Figure 35, B). Enfin, la variance des résidus est répartie de façon homogène et il n'y a pas de points influents parmi les essais (Figure 35, C et D). Les résidus présentent des distances de Cook inférieures au seuil de 0,5 et sont matérialisés sur le graphique par des lignes pointillées rouges. Ceci va dans le sens d'une estimation correcte et fiable des coefficients de l'équation de régression.

Les quantités produites de l'isomère D-lactique ont également été mesurées selon les modalités de chaque facteur.

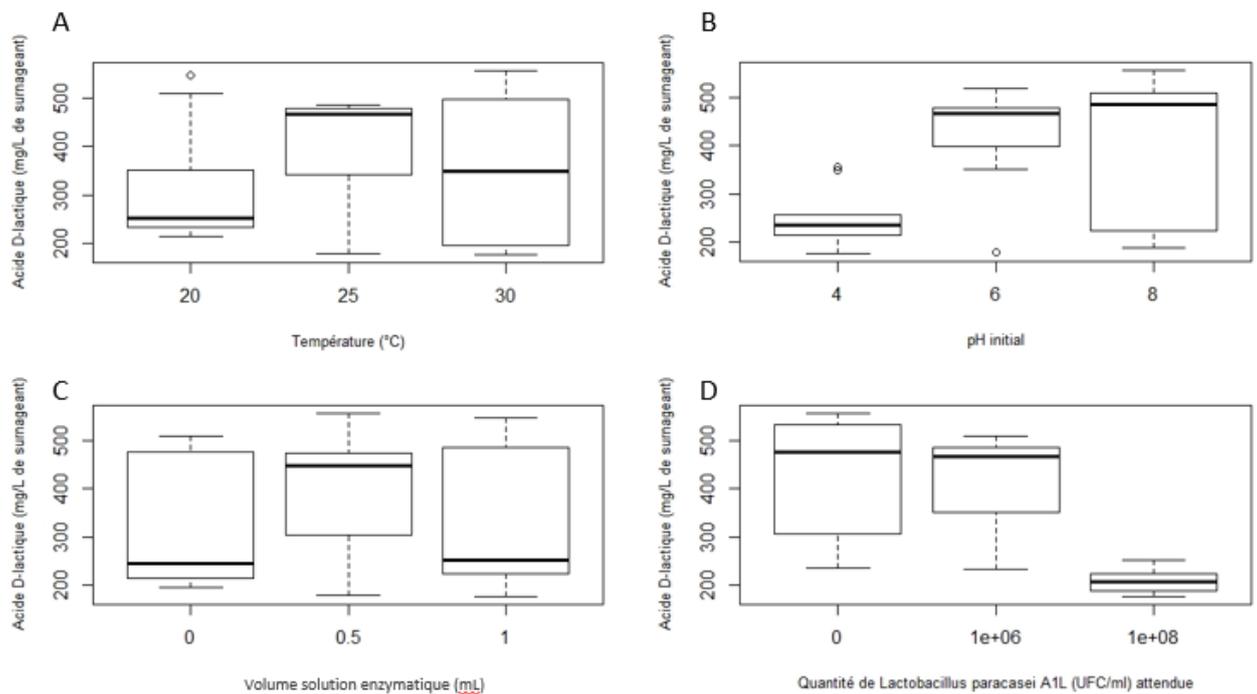


Figure 36 : Quantité d'acide D-lactique après deux jours de fermentation de pulpe de carottes, selon un plan d'expérience D-optimal, en fonction de la température d'incubation, du pH initial, du volume de solution enzymatique ajouté ((protéase (0,5 U/mL de solution) et une hémicellulose (1,5 U/mL de solution)) et de la quantité de *Lb. paracasei* A1L ensemencée.

La température de 25°C favorisait la production d'acide D-lactique (Figure 36, A). En effet, la valeur médiane produite pour cet acide est d'environ 465 mg/L. Pour l'ajout d'enzymes, le volume de solution enzymatique de 0,5 mL semble être le plus favorable à la production d'acide D-lactique (Figure 36, C). Toutefois, ces deux facteurs n'ont pas d'effet significatif. L'ajustement du pH au départ de la fermentation à des valeurs de 6 et 8 a permis d'obtenir des concentrations en acide D-lactique plus importantes par rapport aux fermentations ajustées à un pH acide de 4 (Figure 36, B, $p < 0,05$). Contrairement à ce qui a été observé pour l'acide L-lactique, les échantillons ensemencés à un taux de 10^8 UFC/mL de *Lb. paracasei* A1L présentent les quantités d'acide D-lactique les plus faibles de l'ordre de 200 mg/L ; alors que les essais menés en fermentation spontanée ou ensemencés à hauteur de 10^6 UFC/mL produisent des quantités de l'ordre de 470 mg/L ($p < 0,01$).

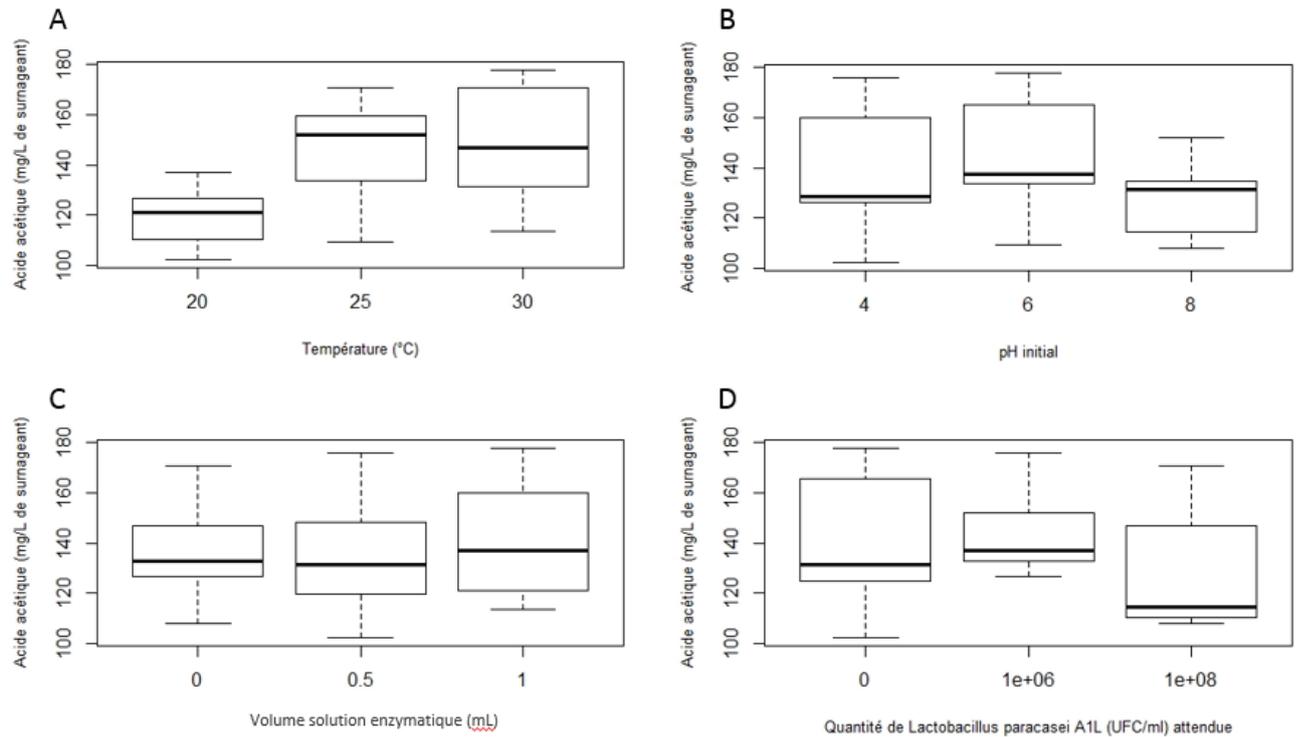


Figure 37 : Quantité d'acide acétique après deux jours de fermentation de pulpe de carottes, selon un plan d'expérience D-optimal, en fonction de la température d'incubation, du pH initial, du volume de solution enzymatique ajouté ((protéase (0,5 U/mL de solution) et une hémicellulose (1,5 U/mL de solution)) et de la quantité de *Lb. paracasei* A1Lensemencée.

Les quantités de protéase et d'hémicellulase ajoutées et le pH n'ont pas d'effet sur la production d'acide acétique (Figure 37, B et C). Les taux médians d'acide acétique obtenus sont de l'ordre de 130 mg/L pour l'ensemble de modalités testées. La température est le seul facteur ayant un effet significatif sur la production d'acide acétique ($p < 0,01$). Les modalités à 25 et 30°C sont plus favorables à la production d'acide acétique avec des quantités produites d'environ 150 mg/mL (Figure 37, A). A 20°C, celles-ci étaient de 120 mg/mL. Enfin, comme pour l'acide D-lactique, la synthèse d'acide acétique est plus importante en fermentation spontanée et pour une quantité de *Lb. paracasei* A1Lensemencée de 10^6 UFC/mL, bien que cette tendance soit non significative.

La mesure des quantités d'acides organiques et des paramètres physico-chimiques a permis d'observer une acidification des environnements de fermentation après deux jours d'incubation, pour l'ensemble des conditions testées. L'analyse indépendante des facteurs a permis de mettre en évidence qu'un pH de 8 et un ensemencement à 10^8 UFC/mL de *Lb. paracasei* A1L favorisaient la production d'acide L-lactique. De plus, une incubation à 30°C semble être la température d'incubation la plus optimale. Bien que les quantités d'acide acétique semblent évoluer au cours du temps, la dispersion des données entre les essais reste faible.

La souche de *Lb. paracasei* A1L, sélectionnée sur la base de sa synthèse privilégiée d'acide L-lactique, est capable de coloniser et d'utiliser le sous-produit de pulpe de carottes comme substrat. Comme pour ce qui avait été observé dans le chapitre 6.2.1.1., la voie homofermentaire, et particulièrement d'acide L-lactique, est favorisée. L'enjeu de la partie suivante sera de confirmer l'installation de la souche de *Lb. paracasei* A1L par dénombrement et de caractériser la diversité microbienne pouvant entrer en compétition avec cette souche.

6.3.1.3. Evolution de la biocénose

D'après les conclusions obtenues précédemment la souche de *Lb. paracasei* A1L semble capable de coloniser le sous-produit de pulpe de carottes et de l'utiliser comme substrat pour la production d'acide L-lactique. L'objectif de cette partie est de valider ces observations par le dénombrement de différentes flores microbiennes : flore mésophile totale et les *Lactobacillus* présumés, et l'étude des changements de diversité microbienne via l'analyse de profils REP-PCR.

6.3.1.3.1. Dynamique des flores microbiennes

La Figure 38 permet d'observer l'effet des différents facteurs d'incubation sur la croissance des *Lactobacillus*, en tenant compte de la différence des taux microbiens dénombrés après quatre jours et au départ de la fermentation.

Chapitre 6 : Optimisation de la production d'acide lactique à partir de la matrice modèle : la pulpe de carottes

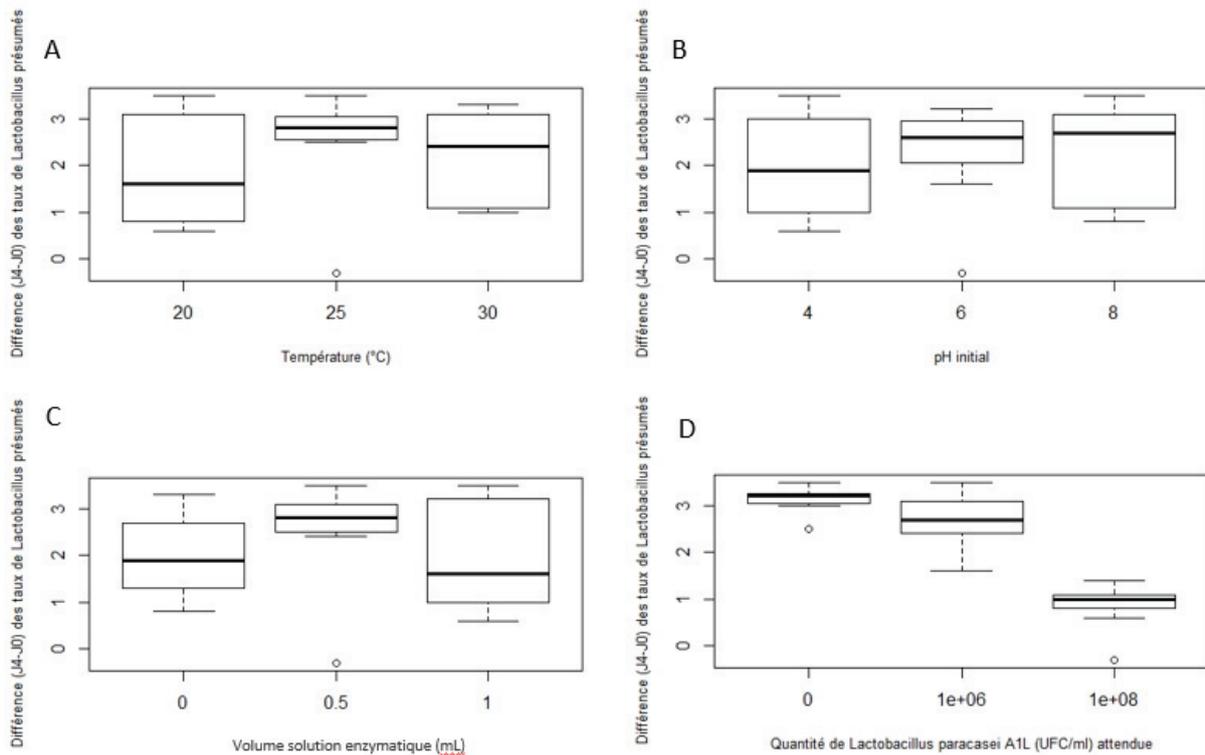


Figure 38 : Evolution de la différence (J4-J0) de *Lactobacillus* présumés, au cours de la fermentation de pulpe de carottes, selon un plan d'expérience D-optimal, en fonction de la température d'incubation, du pH initial, du volume de solution enzymatique ajouté ((protéase (0,5 U/mL de solution) et une hémicellulose (1,5 U/mL de solution)) et de la quantité de *Lb. paracasei* A1Lensemencée.

La croissance la plus importante est obtenue pour les essais nonensemencés par la souche de *Lb. paracasei* A1L, avec une augmentation d'environ 3 log d'UFC/mL (Figure 38, D). Un développement de cette flore, de l'ordre de 2,5 log d'UFC/mL, est également observé pour la pulpe de carottesensemencée à des taux de 10^6 UFC/mL de la souche productrice d'acide L-lactique. En revanche, pour les essaisensemencés au taux le plus élevé (10^8 UFC/mL), l'augmentation était plus faible avec 1 log d'UFC/mL. D'un point de vue des paramètres biochimiques, la température de croissance la plus favorable à la croissance des espèces de *Lactobacillus* du milieu semblait être 25°C , pour laquelle une hausse de 3 log d'UFC/mL a été obtenue (Figure 38, A). L'ajout de protéase et d'hémicellulase, à un volume de 0,5 mL, semble également favoriser la croissance de cette flore, pour le sous-produit de pulpe de carottes (Figure 38, C). Les pH neutres à basiques de 6 à 8, appliqués au départ de la fermentation, montrent une augmentation légèrement plus élevée des taux de *Lactobacillus*, avec des différences médianes de 2,5 log d'UFC/mL environ contre 2 log d'UFC/mL pour les essais ajustés à un pH de 4 (Figure 38, B).

Chapitre 6 : Optimisation de la production d'acide lactique à partir de la matrice modèle : la pulpe de carottes

Les résultats obtenus par dénombrement sur milieu PCA de la flore mésophile totale indiquaient des effets des facteurs d'incubation similaires à ceux observés pour les *Lactobacillus* (Figure 39).

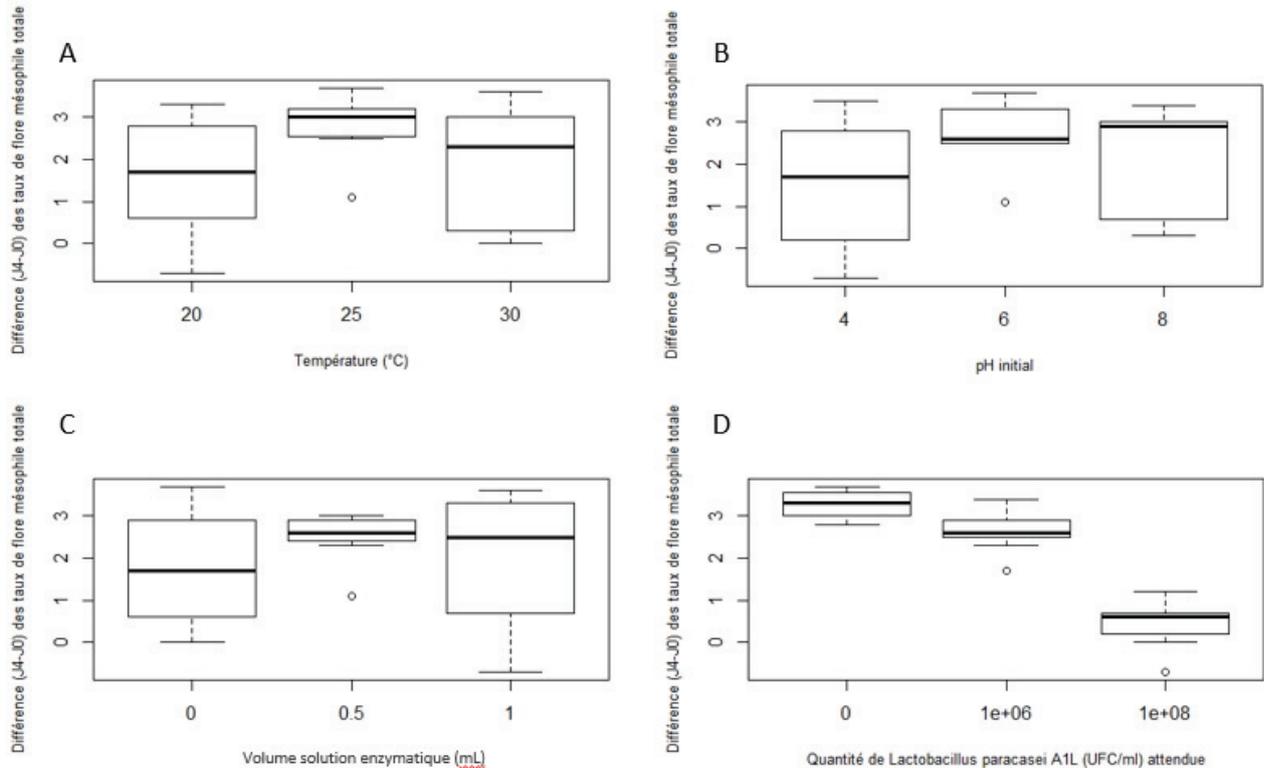


Figure 39 : Evolution de la différence (J4-J0) de la flore mésophile totale, au cours de la fermentation de pulpe de carottes, selon un plan d'expérience D-optimal, en fonction de la température d'incubation, du pH initial, du volume de solution enzymatique ajouté ((protéase (0,5 U/mL de solution) et une hémicellulose (1,5 U/mL de solution)) et de la quantité de *Lb. paracasei* A1Lensemencée.

Les conditions favorables au développement de la flore mésophile totale semblent être une température d'incubation de 25°C et un pH de 6 ou 8. L'ajout de protéase et d'hémicellulase favorise également la croissance des microorganismes : l'hydrolyse de ces substrats libère probablement des sucres fermentescibles et des facteurs de croissance (compte-tenu de l'exigence en apport azoté des bactéries lactiques). D'après les données brutes de dénombrement, les charges microbiennes obtenues sur les deux milieux étaient proches au début et en fin de fermentation. A J0, les minimum et maximum, pour les milieux MRS et PCA, étaient respectivement égaux à 5,2 et 8,7 log d'UFC/mL, et 5,1 et 9,4 log d'UFC/mL. Après fermentation, ils étaient de 7,8 et 9,4 log d'UFC/mL pour le milieu MRS, et 7,3 et 9,4 log d'UFC/mL pour le milieu PCA. Ces données laissent supposer que la flore lactique mésophile était majoritaire à la surface du sous-produit brut. De plus, la FLM autochtone ne semble pas s'être développée dans les essaisensemencés au taux de *Lb. paracasei* A1L le plus élevé (10⁸ UFC/mL). En revanche, à un taux plus faible de 10⁶ UFC/mL ou en l'absence d'ensemencement, la fermentation lactique spontanée a eu lieu.

6.3.1.3.2. Evolution de la diversité des *Lactobacillus* présumés en fonction des conditions d'incubation

Au départ de la fermentation les profils de REP-PCR, obtenus après le raclage des colonies à la surface du milieu MRS, montrent une homologie des profils dépendante du taux de *Lb. paracasei* A1L ensemencé.

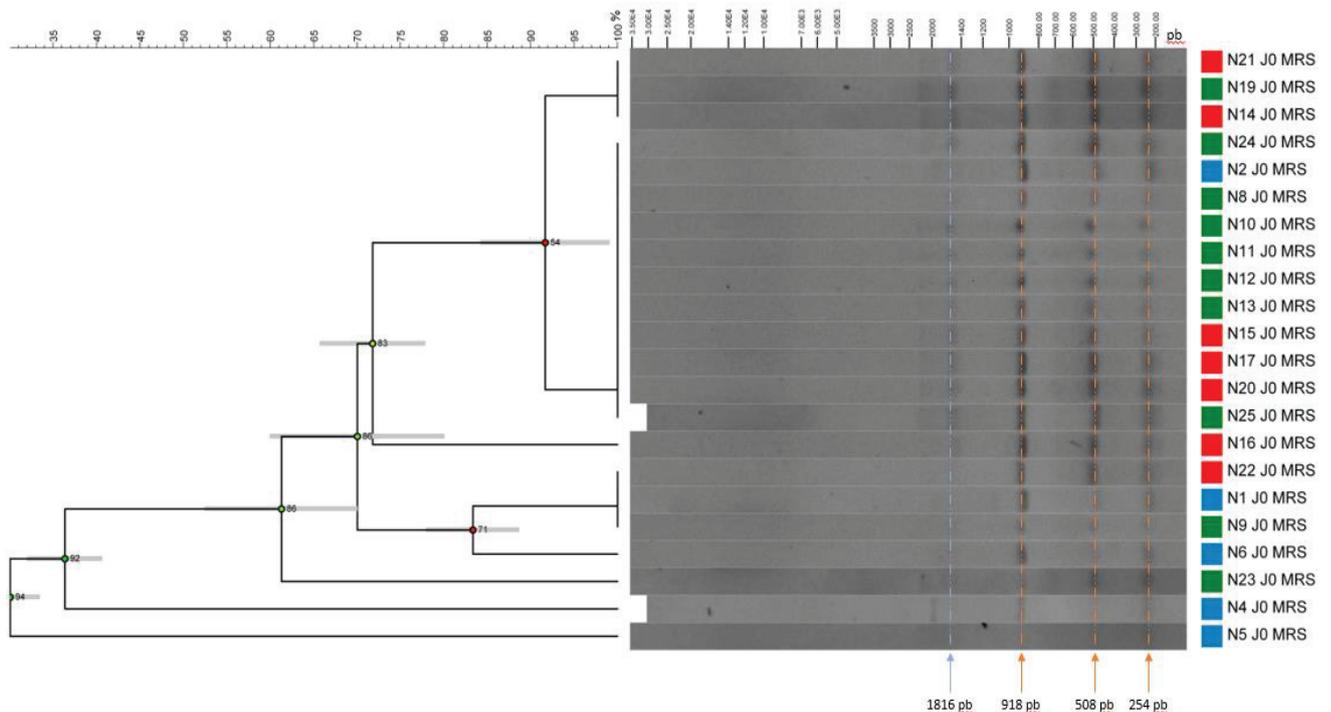


Figure 40 : Dendrogramme des profils de REP-PCR pour les colonies de la flore des *Lactobacillus* présumés (raclées sur milieu MRS), au départ de la fermentation de pulpe de carottes, selon le plan d'expérience D-optimal. Il repose sur le calcul des coefficients de Jaccard. Le taux de *Lb. paracasei* A1L ensemencé au départ est matérialisé par : bleu = absence d'ensemencement, vert = 10^6 UFC/mL, rouge = 10^8 UFC/mL.

En effet, pour l'ensemble des essais trois bandes communes sont observées à des tailles d'environ 250, 500 et 920 pb (Figure 40). Une bande supplémentaire à 1820 pb est présente, et plus ou moins intense pour les échantillons ensemencés avec la souche productrice d'acide L-lactique. Les essais ensemencés sont regroupés dans un cluster dont les profils présentent 71% d'homologie, et un coefficient de corrélation cophénétique fiable de 83. Ce coefficient, situé entre 0 et 100, permet d'évaluer la fidélité des clusters et déterminer si le regroupement des échantillons entre eux est fiable. Des profils (cinq répétitions), réalisés à partir de cultures pures indépendantes de *Lb. paracasei* A1L mettent en évidence quatre bandes dont les tailles sont identiques. Les bandes situées à 250, 500 et 920 pb pourraient donc être spécifiques du genre *Lactobacillus*, et la bande à 1816 pb spécifique à l'espèce *Lb. paracasei* ou à la souche A1L. Les profils des essais non ensemencés présentent seulement les trois bandes spécifiques au genre et sont regroupés dans un cluster à 30% d'homologie (coefficient de corrélation cophénétique = 94).

Après quatre jours de fermentation les trois bandes spécifiques au genre *Lactobacillus* étaient toujours présentes (Figure 41).

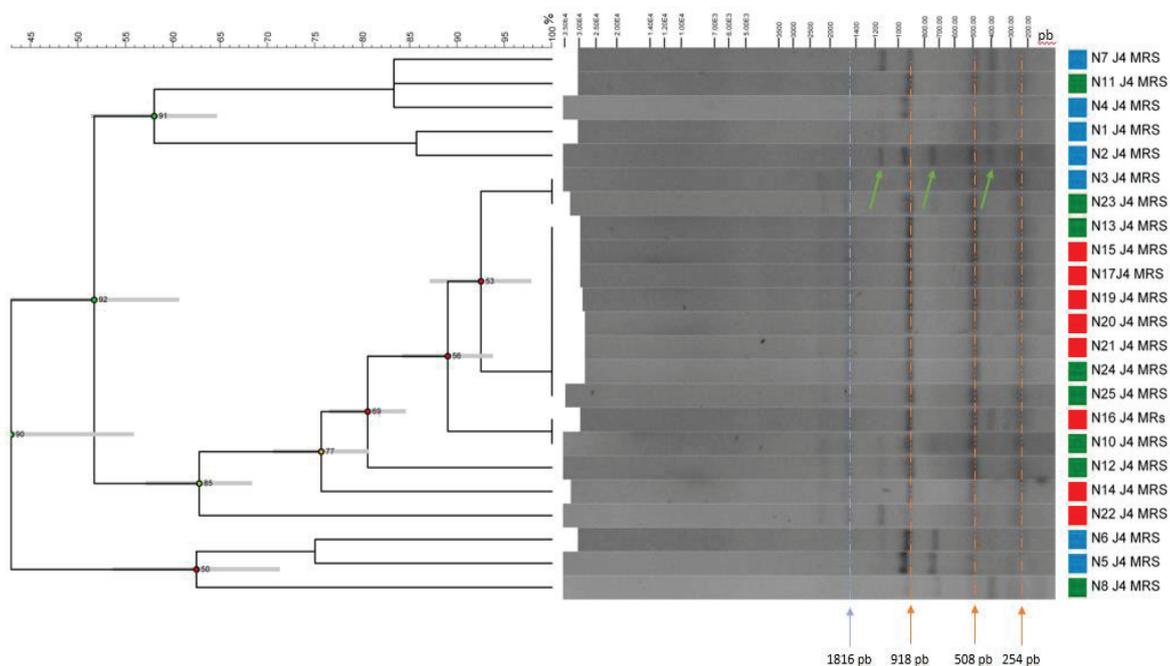


Figure 41 : Dendrogramme des profils de REP-PCR pour les colonies de la flore des *Lactobacillus* présumés (raclées sur milieu MRS), après quatre jours de fermentation de pulpe de carottes, selon le plan d'expérience D-optimal. Il repose sur le calcul des coefficients de Jaccard. Le taux de *Lb. paracasei* A1L ensemencé au départ est matérialisé par : bleu = absence d'ensemencement, vert = 10^6 UFC/mL, rouge = 10^8 UFC/mL. Les flèches vertes matérialisent les bandes spécifiques aux essais fermentés spontanément.

De plus, la bande spécifique à l'espèce *Lb. paracasei* a été identifiée dans l'ensemble des essais ensemencés par cette souche, et deux essais menés en fermentation spontanée : N1 et N2, pour lesquels des bandes ont été retrouvées respectivement à 1657 et 1790 pb. La majorité des essais ensemencés sont regroupés dans un même cluster dont le pourcentage d'homologie entre les pistes du gel est de 63%. Le coefficient de corrélation cophénétique associé à ce groupe est 85. Des bandes supplémentaires sont observés à des tailles de 409, 747 et 1147 pb, pour les échantillons placés en fermentation spontanée. Parmi ces échantillons, les trois bandes ne sont pas systématiquement présentes. Le pourcentage de similarité entre les profils de ces essais est de 58% et ils sont regroupés dans un cluster fiable dont le coefficient de corrélation cophénétique est de 91.

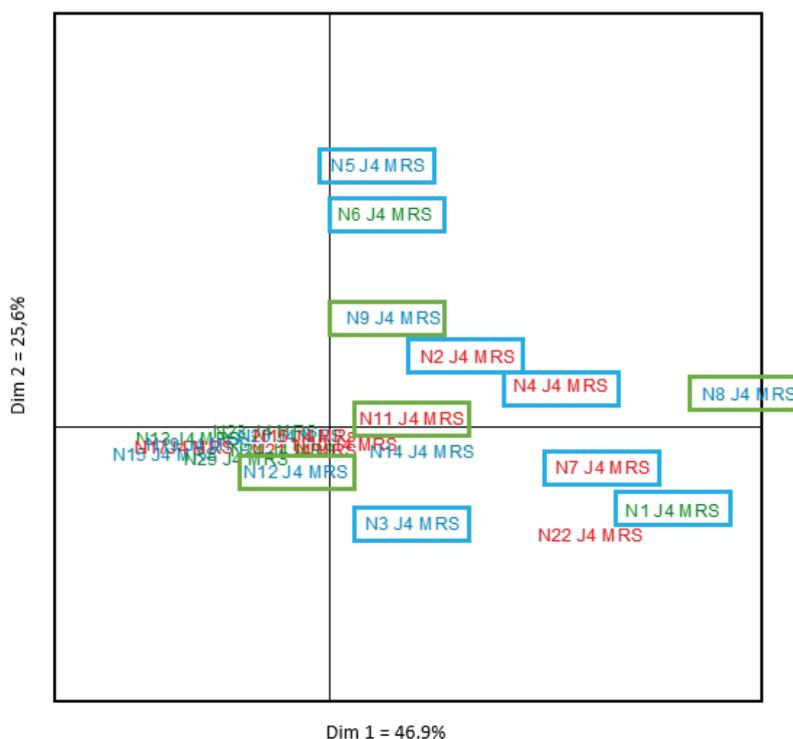


Figure 42 : Analyse par ACP des coordonnées des bandes du gel REP-PCR, des profils de *Lactobacillus* présumés, au départ de la fermentation. La couleur du texte fait référence à température d'incubation fixée : bleu = 20°C, vert = 25°C et rouge = 30°C. La couleur des encadrés correspond aux taux de *Lb. paracasei* A1L ensemencés : bleu = fermentation spontanée et vert = 10^6 UFC/mL.

Une analyse par ACP des profils REP-PCR permet de confirmer les observations des gels. Les sept essais fermentés de façon spontanée (N1 à N7) sont séparés du reste des échantillons selon les deux axes factoriels, dont « Dim 1 » explique 46,9% des différences observées et « Dim 2 » explique 25,16% (Figure 42, encadrés bleus). De plus, les échantillons incubés à 30°C semblent regroupés sur la base de cette analyse (Figure 42, texte en rouge). L'analyse des gels permet d'identifier la présence d'une bande commune d'une taille d'environ 409 pb. La visualisation des données selon les différents niveaux de pH et de quantité d'enzymes ajoutée ne montre pas de regroupement des essais sur la base de ces facteurs.

L'étude de la diversité, via l'analyse de profils de REP-PCR, montre que celle-ci évolue peu au cours du temps pour les essais ensemencés avec *Lb. paracasei* A1L. Cette souche est caractérisée par une bande d'ADN spécifique d'une taille de 1816 pb. Après quatre jours de fermentation, cette bande est détectée, mettant en avant une capacité de la souche à se développer et à utiliser le sous-produit de pulpe de carottes comme substrat pour sa croissance.

6.3.1.3.3. Evolution de la diversité de la flore mésophile totale en fonction des conditions d'incubation

Au départ de la fermentation, les trois bandes d'ADN spécifiques au genre *Lactobacillus*, et la bande caractéristique à la souche *Lb. paracasei* A1L, étaient retrouvées sur les profils obtenus après le raclage sur géloses PCA de la flore mésophile totale (Figure 43, flèches bleue et oranges).

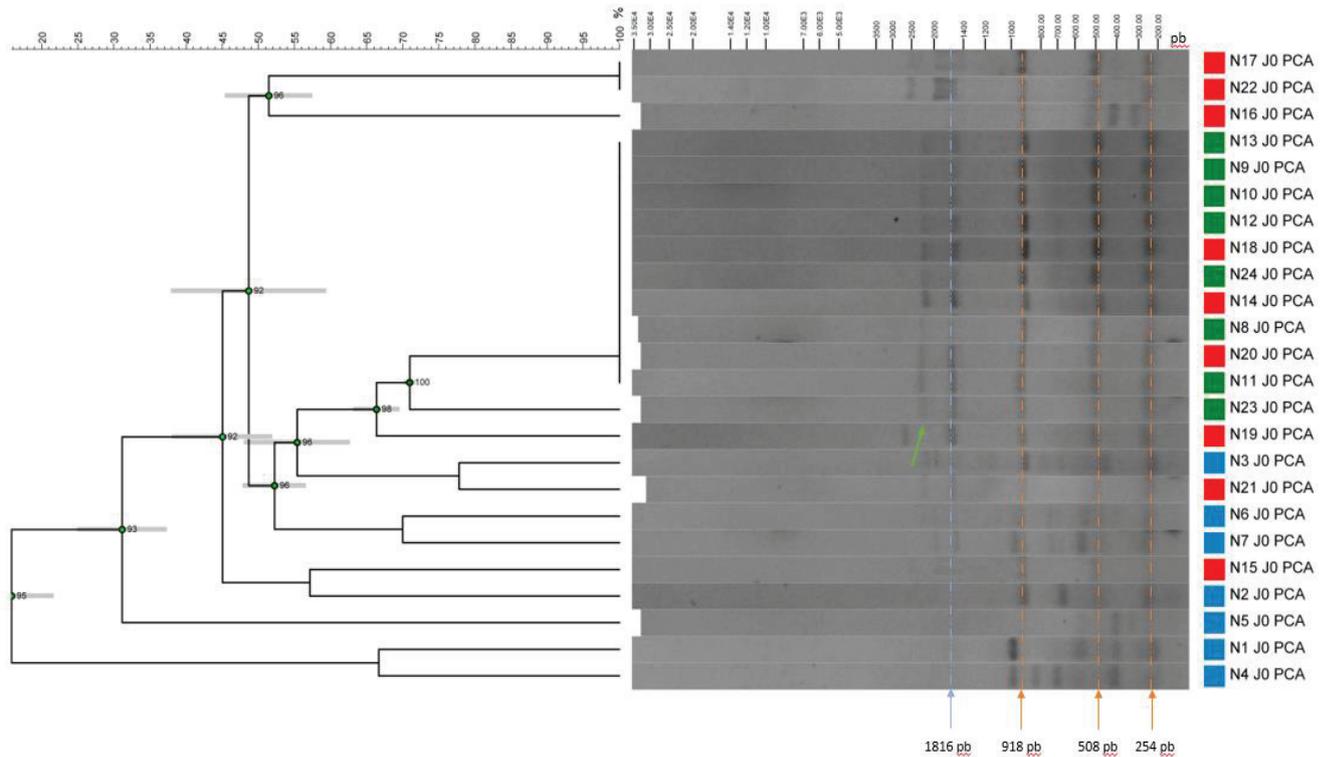


Figure 43 : Dendrogramme des profils de REP-PCR pour les colonies de la flore mésophile totale (raclées sur milieu PCA), au départ de la fermentation de pulpe de carottes, selon le plan d'expérience D-optimal. Il repose sur le calcul des coefficients de Jaccard. Le taux de *Lb. paracasei* A1L ensemencé au départ est matérialisé par : bleu = absence d'ensemencement, vert = 10^6 UFC/mL, rouge = 10^8 UFC/mL. Les flèches vertes matérialisent les bandes spécifiques.

Des bandes supplémentaires ont été observées, particulièrement pour les essais en fermentation spontanée. Les tailles étaient, par exemple, de 409, 705, 834 pb, pour l'échantillon N4. Les bandes présentes et absentes sont variables en fonction des conditions de culture appliquées. De plus, une bande d'environ 2200 pb est détectée pour la plupart des essais ensemencés avec la souche *Lb. paracasei* A1L. L'analyse par ACP (Dim 1 = 52,1% et Dim 2 = 13%) des coordonnées des bandes semble également distinguer les échantillons non ensemencés des autres essais. La qualité des clusters identifiés est bonne et appuie la fiabilité des résultats obtenus. En effet, le témoin de qualité des groupes, les coefficients de corrélation cophénétique, sont supérieurs à 90%.

Les profils de la flore mésophile totale montrent de plus grandes diversités dans le nombre et la taille des bandes d'ADN (Figure 44).

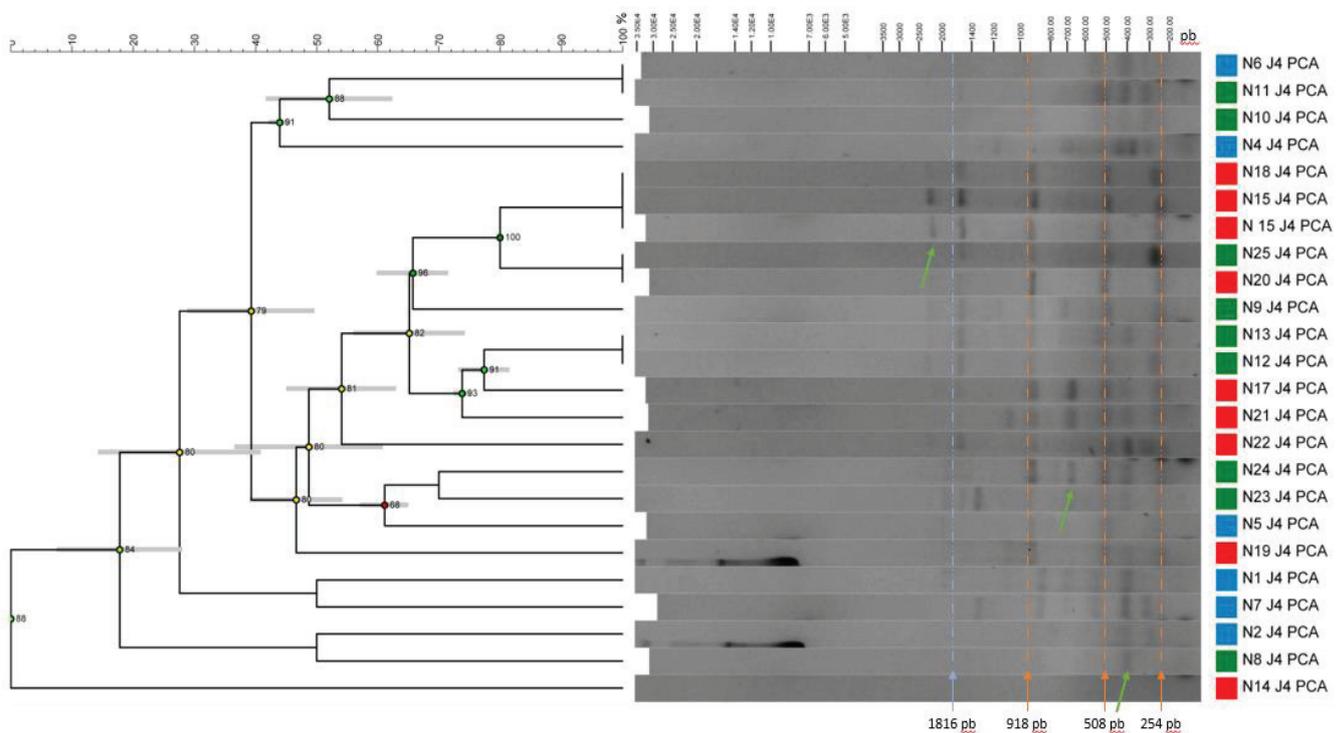


Figure 44 : Dendrogramme des profils de REP-PCR pour les colonies de la flore mésophile totale (raclées sur milieu PCA), après quatre jours de fermentation de pulpe de carottes, selon le plan d'expérience D-optimal. Il repose sur le calcul des coefficients de Jaccard. Le taux de *Lb. paracasei* A1L ensemencé au départ est matérialisé par : bleu = absence d'ensemencement, vert = 10^6 UFC/mL, rouge = 10^8 UFC/mL. Les flèches vertes matérialisent les bandes spécifiques.

Contrairement aux profils au départ de la fermentation, les trois bandes spécifiques du genre *Lactobacillus* ne sont pas présentes pour tous les essais, même ceux ensemencés à un taux élevé de *Lb. paracasei* A1L, et l'intensité des bandes a diminué par rapport à J0. *Lb. paracasei* A1L s'est donc installé malgré la présence d'autres flores mésophiles aérobie et la bande spécifique de cette souche est tout de même détectée pour les échantillons ensemencés à 10^8 UFC/mL. Pour la plupart des essais, une bande autour de 400 pb est visible. D'autres bandes plus spécifiques peuvent être retrouvées pour certains échantillons, comme la bande à 670 pb, identifiée pour les essais N17, N21, N23 et N24. Ils n'ont pas de modalité commune pour les facteurs considérés. L'ensemble des essais non ensemencés, et les échantillons : N8, N10, N14 et N23 (incubés à une température, en présence d'une quantité définie d'enzymes amylolytiques et protéolytiques et ajustés à des pH variables), semblent corrélés positivement au premier axe de l'ACP, réalisé sur les tailles des bandes des gels. Les autres essais sont d'avantage corrélés négativement à cet axe. Le premier et le second axe de cette ACP expliquent respectivement 39,4% et 15,5% des différences observées.

La dernière phase de la thèse s'est concentrée sur la production d'acide L-lactique à partir du sous-produit de pulpe de carottes. Une souche de *Lactobacillus* a été isolée directement à partir de la fermentation spontanée du produit. Les résultats laissent penser qu'elle est une bonne candidate pour la production d'acide L-lactique. Cette souche est capable de coloniser le sous-produit de pulpe de carottes et de l'utiliser comme substrat seul pour sa croissance. Cette espèce ne semble pas se développer de façon spontanée dans les conditions de culture testée. Le niveau d'ensemencement impacte directement la quantité d'acide L-lactique produite qui est en moyenne 2,5 fois plus importante pour les essais ensemencés à 10^8 UFC/mL que pour les essais ensemencés à 10^6 UFC/mL.

6.4. Discussion

Dans le but de valoriser la pulpe de carottes, sous-produit de l'industrie agroalimentaire, un plan d'expérience faisant varier quatre facteurs de culture a été construit. L'objectif était d'identifier les conditions de culture les plus favorables à la production d'acide L-lactique, en comparant la production par fermentation spontanée, et par l'ensemencement d'un candidat producteur de ce métabolite : *Lb. paracasei* A1L. La valeur ajoutée de ce composé repose sur son utilisation dans des secteurs divers : alimentaire, cosmétique, pharmaceutique ou encore la production de bioplastiques (Alves de Oliveira *et al.*, 2018). L'utilisation des déchets agricoles et des industries alimentaires apparaît comme une alternative à l'utilisation de substrats de synthèse et permet d'envisager une bio-production par les microorganismes eux-mêmes lors de la fermentation lactique (John *et al.*, 2007a). Les expériences menées devaient permettre de répondre aux questions suivantes :

- Quel candidat, parmi le genre *Lactobacillus*, est capable de produire de l'acide L-lactique préférentiellement, à partir de pulpe de carottes ?
- La souche de *Lb. paracasei* A1L sélectionnée est-elle capable de s'installer dans le milieu et de s'y développer ?
- Peut-elle utiliser la matrice végétale comme substrat pour la production d'acide L-lactique ?
- Les quantités obtenues dans un milieu à base de pulpe de carottes sont-elles satisfaisantes au regard des quantités produites en milieu de culture conventionnel (ex : bouillon MRS) ?

Le candidat pour la production d'acide L-lactique, à partir de pulpe de carotte, a été sélectionné directement à partir d'échantillons fermentés spontanément (Wang *et al.*, 2015). La flore lactique, et particulièrement le genre *Lactobacillus*, participent largement à la fermentation lactique des végétaux (Abdel-Rahman *et al.*, 2013; Alves de Oliveira *et al.*, 2018; Cizeikiene *et al.*, 2018). Une souche productrice d'acide L-lactique a donc directement été sélectionnée à partir d'échantillons de pulpe de carottes fermentée. L'ensemencement de carottes par des LAB autochtones ou allochtones, par Di Cagno *et al.* (2008), a montré une croissance plus importante des LAB lors de la fermentation par des souches issues directement du milieu. Dès le premier jour de fermentation, les expériences réalisées à partir de pulpe de carottes, montrent un pH plus faible de 3,8 pour les essais ensemencés à 10^8 UFC/mL de *Lb. paracasei* A1L. Les essais non ensemencés et à 10^6 UFC/mL avaient des pH moyens respectivement de 4,3 et 4,4. La capacité des souches à acidifier le milieu est un critère déterminant dans la sélection de candidat pour la fermentation de végétaux (Wouters *et al.*, 2013b). Plus un microorganisme sera capable d'acidifier rapidement le milieu, plus la croissance des autres flores sera ralentie. Dans le but de limiter les prétraitements, la souche de *Lactobacillus* sélectionnée pour la production d'acide lactique, a été ensemencée en présence des flores natives (Wang *et al.*, 2015). Ceci permet notamment de s'affranchir d'une étape de stérilisation des matrices végétales. En fin de fermentation de pulpe de carottes, les taux de LAB dénombrés étaient de l'ordre de $9 \log$ d'UFC/mL. Hormis l'intérêt technologique, cela limite l'altération biochimique des substrats microbiens. En revanche, les flores autochtones peuvent entrer en compétition avec la souche supplémentée, empêcher son installation dans l'environnement de culture et, *in fine*, limiter la production d'acide organique.

Les populations de flore mésophile totale et de la flore lactique étaient de l'ordre de 10^9 UFC/g en fin de fermentation pour les deux communautés. Les profils de REP-PCR réalisés à partir du milieu PCA mettent en évidence une diversité variable de la flore mésophile totale en fonction des conditions d'incubation. En effet, des bandes d'ADN spécifiques aux fermentations spontanées ont été identifiées. Bien que certaines bandes spécifiques à la souche *Lactobacillus paracasei* A1L soient retrouvées pour les essais ensemencés, elles ne sont pas systématiquement présentes et leur intensité varie en fonction des échantillons. Les différences observées sont révélatrices d'une diversité de flores microbiennes qui peuvent entrer en compétition avec la souche ajoutée lors de la colonisation de l'environnement végétal. Parmi elles, la flore lactique mésophile (dont les *Lactococcus* et les *Enterococcus*), la flore acétique, et les levures et les moisissures, ont été identifiées dans le chapitre 5 et plus largement dans la littérature. La présence des bandes spécifiques à *Lb. paracasei* A1L, pour les essais ensemencés, à partir de colonies issues du milieu MRS après quatre jours de fermentation, met en évidence l'implantation de cette souche. Pour les échantillons non ensemencés, des bandes

supplémentaires sont observées. Le séquençage de l'ADNr 16s des isolats sur milieu gélosé, pour la sélection du candidat producteur d'acide L-lactique, a permis d'identifier 17 espèces de *Lactobacillus* et une espèce du genre *Leuconostoc* (*Ln. kimchii*). Parmi les isolats du genre *Lactobacillus*, ceux appartenant aux groupes : *Lb. buchneri*, *Lb. perolens*, *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. coryniformis*, *Lb. vaccinostercus*, *Lb. koreensis* et *Lb. plantarum*, participent à la fermentation des végétaux et pourraient être à l'origine de la diversité observée par REP-PCR. Ces deux genres de LAB sont fréquemment retrouvés et identifiés lors de la fermentation de végétaux, tels que le concombre, le chou, l'olive ou le kimchii (Di Cagno *et al.*, 2008; Fan et Hansen, 2012; Wouters *et al.*, 2013b). A partir d'isolats, la sensibilité de la REP-PCR permet de former des clusters de souches d'une même espèce d'après une étude de Kesmen et Kacmaz (2011). Les souches considérées étaient des bactéries lactiques isolées à partir de kefir. Les groupes formés étaient similaires à ceux obtenus par séquençage de l'ARNr 16S. Toutefois, des espèces supplémentaires ont été identifiées par séquençage. Ceci s'explique par le fait que les milieux nutritifs gélosés utilisés n'ont pas permis la croissance de certaines espèces et leur identification par REP-PCR. Les résultats obtenus par la technique de DGGE ont montré une plus faible discrimination par rapport à celle obtenue par REP-PCR.

Dans le cas de la fermentation de pulpe de carottes et pour les conditions de culture testées, les isolats appartenaient majoritairement à *Lb. paracasei*. De plus, pour les essais ensemencés, les profils de REP-PCR (sur milieu MRS) montrent la bande spécifique à cette espèce. Les composés antimicrobiens qui pourraient être produits par les microflore présentes ne semblent pas empêcher le développement du candidat sélectionné. Parmi ces composés les bactériocines sont largement décrites dans la littérature et sont produites par les bactéries lactiques elles-mêmes (Alvarez-Sieiro *et al.*, 2016; Fan et Hansen, 2012). La bande d'ADN caractéristique de la souche ensemencée était identifiée sur les profils obtenus à partir de colonies du milieu PCA, pour les essais ensemencés au taux le plus élevé de 10^8 UFC/mL, laissant supposer sa capacité à se développer en présence d'oxygène. Parmi eux, la souche *Lb. paracasei* A1L a été retenue pour sa capacité à produire de l'acide lactique à partir de pulpe de carottes (et à partir du bouillon MRS), et particulièrement l'isomère (L). Ceci était un critère de sélection de la souche et a pu être confirmé lors des essais menés selon le plan d'expérience D-optimal. Les quantités d'acide D-lactique et d'acide acétique étaient moindres. Il aurait été intéressant dans ce contexte d'étudier plus spécifiquement le développement de *Lb. paracasei* A1L d'un point de vue spatial et quantitatif. Une modification du génome aurait également pu être envisagée afin d'optimiser d'avantage la production d'acide lactique. L'expression de la lactate déshydrogénase est particulièrement ciblée (Alves de Oliveira *et al.*, 2018). Par exemple, l'augmentation de l'opéron « lac » et du gène codant la L-lactate déshydrogénase, chez *Lb. casei*,

favorise la production d'acide lactique (Singh *et al.*, 2006). Ceci aurait impliqué de s'assurer que les mutations apportées étaient stables dans l'environnement considéré (Wang *et al.*, 2015).

Dépendamment de l'optimisation du métabolisme, il convient de s'intéresser aux conditions optimales de croissance du microorganisme ensemencé. Le pH et la température, testés dans cette étude, sont deux paramètres largement influents sur la croissance des bactéries lactiques (Cizeikiene *et al.*, 2018). L'étude de ces deux axes est un moyen d'identifier les freins et verrous pour l'installation du microorganisme dans son environnement et la production de métabolites, tels que l'acide L-lactique. De plus, fréquemment, et c'est aussi le cas dans cette étude, la sélection de microorganismes producteurs de métabolites est réalisée dans des milieux de culture standardisés et riches en substrats. Dans le cas de matrices brutes, telles que les sous-produits, les nutriments nécessaires à la croissance microbienne peuvent être inaccessibles. Contrairement aux conditions de culture appliquées dans le plan D-optimal, des essais de fermentation en milieu MRS, par *Lb. paracasei*, ont mis en évidence que la régulation du pH à 6,5 au cours du temps permettait de multiplier jusqu'à dix fois les quantités d'acide lactique produites (Moon *et al.*, 2012). Les végétaux peuvent également produire ou libérer des composés antimicrobiens limitant la croissance. Des tests exploratoires d'inhibition, réalisés à partir du surnageant de pulpe de carottes dans le cadre du projet, n'ont pas mis en évidence une inhibition de la souche de *Lb. paracasei* A1L.

Les résultats montrent que *Lactobacillus paracasei* A1L est capable d'utiliser la pulpe de carottes comme substrat pour la production d'acide L-lactique et de s'y développer. Cependant, des essais restent à mener pour optimiser d'avantage la production d'acide L-lactique. Des ajustements restent notamment à effectuer dans le protocole d'ensemencement de la souche productrice d'acide organique. Par exemple, un pourcentage fixe d'une culture liquide en milieu MRS, en phase exponentielle, pourrait être ensemencé (Chaisu *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015). D'après le modèle linéaire construit, la température, les taux de microorganismes ensemencés et le pH, ont un effet significatif sur la production d'acide L-lactique. Il serait donc intéressant de mener la fermentation de pulpe de carottes en fermenteur pilote, aux conditions les plus favorables à la production d'acide à 30°C et à un pH initial et régulé de 8, avec un ensemencement initial à 10^8 UFC/mL de *Lb. paracasei* A1L. Il serait également nécessaire de mener des essais utilisant différents types de fermentation, tels que le fed-batch ou la fermentation continue, en régulant le pH à une valeur de 8. L'apport plus ou moins continu de substrat est un facteur important dans l'orientation des métabolismes microbiens. Dépendamment des conditions testées, l'accumulation de co-produits selon les types de fermentation peut inhiber la croissance microbienne et la production de biomasse. De plus, la production de métabolites d'intérêt est directement impactée. L'enjeu dans l'étude de ces problématiques est d'identifier les conditions les plus favorables à la production de composés, qui sont souvent les plus

extrêmes et ne permettent pas d'envisager une application directe par les industriels (Alves de Oliveira *et al.*, 2018; López-Gómez *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2015). Les trois points à optimiser permettant de réduire les coûts sont donc : l'identification de sources carbonées différentes des sucres purs, de ne pas recourir au traitement thermique des matières premières, et l'extraction et la purification de l'acide lactique produit. De plus, les changements d'échelle n'ont pas été abordés dans ce travail et impactent largement les rendements de production de métabolites. La fermentation en milieu solide permet des taux de production du même ordre de grandeur que ceux obtenus pour une fermentation continue, dépendamment de la nature de la matrice et des conditions de culture. En première intention, cette méthode est adaptée à la nature physique brute et hétérogène des sous-produits végétaux. Les essais menés ici n'ont pas considéré la source d'azote, nécessaire à la production d'acide lactique. Afin d'éviter l'ajout d'extrait de levure ou de peptone de synthèse, l'utilisation d'hydrolysat de son de blé, pourrait être une alternative bio-sourcée et permettre de valoriser un second sous-produit à disposition dans ce projet (Alves de Oliveira *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2015). La suite du projet devra également s'intéresser à l'extraction et la purification de l'acide L-lactique. La problématique majeure dans l'objectif de valoriser des sous-produits, en ayant un impact écologique minimum, est d'identifier une méthode limitant l'utilisation de solvants et permettant une purification efficace de l'acide L-lactique produit dans un environnement biochimique complexe.

Tableau 8 : Conditions de fermentation les plus favorables à la production d'acide L-lactique

Température d'incubation	pH _i	Enzymes (protéase + hémicellulase)	Taux de <i>Lactobacillus paracasei</i> A1L
25/30°C	8	Absence d'effet	10 ⁸ UFC/ml

Les conditions de fermentation les plus favorables à la production d'acide L-lactique, d'après les niveaux testés sont répertoriées dans le Tableau 8. Les variables de température, de pH et du taux d'ensemencement ont un effet sur la quantité d'acide organique produite. Un ensemencement à 10⁸ UFC/ml d'une souche autochtone de *Lactobacillus paracasei* A1L permet notamment de multiplier par 2,5 la quantité d'acide L-lactique produite par rapport aux essais ensemencés à 10⁶ UFC/ml.

Chapitre 7

Discussion générale

7. Discussion générale

7.1. Discussion des axes et questions de recherche

Ce projet de thèse s’est inscrit dans une problématique globale de valorisation des sous-produits issus de l’industrie agroalimentaire. La voie de la bioconversion par voie microbienne a été retenue dans le but de produire des composés d’intérêt à partir de ces sous-produits. L’un des objectifs était également d’utiliser les sous-produits bruts et de simplifier les procédés de production. L’ensemble de ce travail s’est organisé en deux axes (ou étapes) :

- **(i)** la détermination des caractéristiques biochimiques et microbiologiques des cinq sous-produits végétaux bruts dans le but d’avoir une vision d’ensemble des points communs et des différences entre les matrices (Axe 1)
- **(ii)** l’évaluation de l’effet des conditions d’incubation sur l’évolution des écosystèmes microbiens au cours de la fermentation spontanée des cinq sous-produits (Axe 1)
- **(iii)** la sélection, la caractérisation et l’ensemencement d’une souche de bactérie lactique *Lb. paracasei* A1L, pour la production d’acide L-lactique, à partir de pulpe de carottes (matrice fermentescible sélectionnée en accord avec les partenaires industriels du projet ValPro dans le cadre duquel se sont inscrits ces travaux de thèse) (Axe 2)

Les principales réponses biochimiques et microbiologiques obtenues au cours de ce projet sont répertoriées dans le Tableau 9 et le Tableau 10 et vont être discutées dans les parties suivantes.

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des variations des réponses biochimiques observées pour l’ensemble des essais. Légende : ATT = Acidité Titrable Totale (exprimée en gramme équivalents acide lactique/L de surnageant), J+n = nombre de jours après fermentation, AA = Acide acétique, ALL = Acide L-lactique et ADL = Acide D-lactique

Réponse mesurée	Pulpe de carottes	Epluchures de salades	Peau de pommes	Levain de germe de blé	Son de blé
Aw	>0,950				0,8
Matière sèche (g/100 g)	Environ 7,5 %		Environ 35 %		80
pH initial	5,6-6,2	6,9-7,5	3,9-4	3,4-3,8	6,5-6,7
ATT initiale	0,7 g/L	0,8 g/L	3 g/L	14,5 g/L	2 g/L
Acidité (pH et ATT)	Maximale à J+1	Constante dans le temps		Maximale à J+1	

Tableau 10 : Tableau récapitulatif des variations des réponses microbiologiques observées au cours de l'ensemble du projet. Légende : LAB = bactéries lactiques, FA = flore acétique et FLM = Flore lactique mésophile

Réponse mesurée	Pulpe de carottes	Epluchures de salades	Peau de pommes	Levain de germe de blé	Son de blé
Flores microbiennes natives	Profil 1 LAB, FA, <i>Enterobacteriaceae</i> , Eucaryotes	Profil 2 FA, <i>Enterobacteriaceae</i> , Eucaryotes, FLM, Enterococcus. Absence des <i>Lactobacillus</i>	Profil 1	Profil 3 Peu de flores dénombrées : <i>Enterococcus</i> présumés	Profil 1
Dynamique flores	Acidification corrélée aux <i>Enterobacteriaceae</i> et aux <i>Lactobacillus</i>	Alcalinisation corrélée à la croissance des <i>Lactobacillus</i> et FA	Acidification corrélée aux <i>Lactobacillus</i> et FA	Absence des <i>Lactobacillus</i> et <i>Enterobacteriaceae</i>	Croissance de FA et des eucaryotes après ajout d'eau
J0 : Regroupement des profils homologues selon la nature du sous-produit					
J+9 : Regroupement des profils de <i>Lactobacillus</i> présumés selon la nature du sous-produit					
Homologie des profils entre les flores présumées : FLM, <i>Enterococcus</i> et <i>Lactobacillus</i>					
REP-PCR	Bandes spécifiques <i>Lactobacillus</i> : 250pb et 950 pb, 1300 pb et J+9 : 700 pb		Bande spécifique <i>Lactobacillus</i> 420 pb	Bande spécifique <i>Lactobacillus</i> 950 pb	
	Bande spécifique <i>Lb. paracasei</i> A1L : 1820 pb				

7.1.1. Capacité fermentescible et variabilité des cinq sous-produits végétaux

Les sous-produits utilisés pour réaliser l'ensemble des essais pouvaient provenir de lots de production industrielle différents ce qui a pu induire une certaine variabilité qui se doit d'être considérée. En effet, et particulièrement pour les sous-produits riches en eau (la pulpe de carottes, les épluchures de salades et la peau de pommes, Tableau 9), les essais devaient être réalisés rapidement après réception des matières premières afin de limiter l'altération des produits et l'initiation précoce de la fermentation spontanée. Au départ des fermentations, les différences de pH les plus élevées ont été observées pour la pulpe de carottes et les épluchures de salades, qui sont les deux matrices aux pourcentages de matière sèche les plus faibles et aux pH peu acides, deux critères qui favorisent un développement microbien rapide sur des tissus végétaux coupés voire même broyés. Pour ces deux

sous-produits, la différence entre les lots récupérés pour les essais des chapitres 4 et 5 étaient de l'ordre de 0,6 unité pH.

Les réponses biochimiques mesurées ainsi que les flores microbiennes présentes au départ de la fermentation et leur évolution ont différé de celle des matrices moins riches en eau dont les teneurs en extrait sec étaient les plus élevées : le levain de germe de blé et le son de blé. Les dénombrements sur milieux gélosés indiquent une quantité plus faible de microorganismes pour le levain de germe de blé brut, fermenté au préalable (Tableau 10).

A la fin de l'étude préliminaire, le choix d'un sous-produit modèle était nécessaire pour répondre aux objectifs du projet et mettre au point une démarche de valorisation via la production de molécules à valeur ajoutée. Le sous-produit de pulpe de carottes a alors été retenu pour la suite des expérimentations sur la base de mesures physico-chimiques, biologiques et des données de la littérature. Cependant, les données indiquent que les sous-produits céréaliers notamment, sont riches en substrats fermentescibles (glucides et protéines). Une approche différente aurait pu être mise en place à ce stade afin de déterminer plus précisément les taux de glucides, protéines et lipides des sous-produits à disposition et les comparer aux données de la littérature. Une vision plus fine des substrats à disposition des microorganismes aurait également permis de préciser les métabolites d'intérêt pouvant être produits. L'utilisation de la métabolomique peut être adaptée à ce type d'analyse.

7.1.2. Fermentation spontanée des cinq sous-produits végétaux

Une fermentation lactique spontanée a été observée pour l'ensemble des cinq sous-produits considérés dans nos conditions de fermentation (températures comprises entre 20°C et 37°C). Cette observation est en accord avec les données de la littérature où d'autres auteurs ont déjà rapporté la croissance spontanée des bactéries lactiques à partir de carotte (Wouters *et al.*, 2013a), de salade (Caponigro *et al.*, 2010), de son et de levain de germe de blé (Casado *et al.*, 2017; Gänzle *et al.*, 2007; Manini *et al.*, 2016; Scheirlinck *et al.*, 2007). L'acidification des substrats végétaux, dès les premiers jours d'incubation, a également été rapporté par Wouters *et al.* (2013a, 2013b). Les études qui souhaitent valoriser les sous-produits de peau de pommes, et de peaux de fruits, s'intéressent principalement à l'optimisation de l'extraction de composés tels que la pectine et les composés phénoliques pour leurs propriétés antioxydantes notamment (Cho *et al.*, 2019; Güzel et Akpınar, 2019; Massini *et al.*, 2013).

Les quantités d'acides organiques produites pour le sous-produit modèle de pulpe de carotte, indiquaient une quantité moyenne plus importante d'acide acétique, en fermentation spontanée. Ceci signifie que dans ces conditions un métabolisme au moins en partie hétérofermentaire des bactéries lactiques a été observé. Il serait également intéressant de mesurer la quantité d'éthanol produite au

cours de ce processus, sa production pouvant résulter de ce métabolisme hétérofermentaire mais aussi de celui des levures présentes. La présence de flores microbiennes lactiques et l'acidification observées ont justifié l'orientation du projet vers la production d'acide L-lactique, à partir de pulpe de carottes. La quantité maximale d'acide L-lactique produite étant faible en fermentation spontanée (0,292 g/L), la suite des essais a porté sur la sélection et l'ensemencement d'une souche de *Lactobacillus* productrice d'acide L-lactique. Les quantités obtenues et les améliorations à apporter sont discutées dans la partie suivante.

Concernant les autres sous-produits végétaux, pour le son de blé, en l'absence d'ajout d'eau, les communautés microbiennes n'évoluaient pas au cours du temps. Cependant, après l'ajustement des conditions de culture, la fermentation a été initiée. Bien que des spécificités soient présentes pour chaque matrice, la fermentation spontanée des végétaux montre la croissance des flores lactiques, de la flore acétique et des microorganismes eucaryotes (levures et moisissures). L'acidification des écosystèmes observée précédemment a pu être corrélée à la croissance de la flore lactique pour la pulpe de carottes et la peau de pommes. Du point de vue de la biodiversité bactérienne, les profils de REP-PCR étaient spécifiques à chaque flore microbienne et à chaque sous-produit brut. Globalement, une répartition homogène des flores microbiennes pour un même lot de sous-produit a été observée. La comparaison des profils entre eux montre également des bandes communes pour les flores présumées être la Flore Lactique Mésophile, les *Enterococcus* et les *Lactobacillus*. Ceci indique que certaines espèces sont capables de se développer à la surface des trois milieux gélosés utilisés pour leur dénombrement, les milieux : M17, BEA et MRS. Gemelas *et al.* (2013), ont observé la croissance des genres *Lactococcus* (ex : *L. lactis*), *Leuconostoc* (ex : *Ln. mesenteroides*), *Enterococcus* (ex : *E. faecium*), *Lactobacillus* (ex : *Lb. plantarum* et *Lb. paracasei*) et *Streptococcus* (ex : *St. thermophilus*) à la surface du milieu M17. Les souches testées étaient des isolats obtenus à partir de lait cru ou des souches de référence. Les résultats montraient également la croissance d'*Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* et *Staphylococcus aureus*. Ortolani *et al.* (2007), rapportent la faible sélectivité du milieu MRS et la croissance de la plupart des espèces citées précédemment, exceptées *Lb. plantarum* et *Ln. mesenteroides* qui n'ont pas été testées. Pour le milieu BEA, la croissance des *Enterococcus* était favorisée et ceci se traduit par des colonies d'une taille plus importante à celles observées pour *Lb. plantarum* par exemple (Weiss *et al.*, 2005). *Lb. plantarum* est également capable de se développer sur le milieu BEA et hydrolyser l'esculine du milieu. Enfin, les REP-PCR réalisées sur l'ensemble des sous-produits montrent des bandes spécifiques à certaines flores présumées et communes entre différentes matrices. Par exemple, des bandes d'une taille de 950 pb ont pu être identifiées lors des essais menés à partir de pulpe de carottes mais aussi lors de ceux réalisés avec le levain de germe de blé.

Comme évoqué dans la partie précédente, les méthodes analytiques utilisées ont permis de caractériser les écosystèmes microbiens de façon globale. Ce travail met également en lumière une hétérogénéité des sous-produits, du point de vue des facteurs biotiques et abiotiques. Les fermentations spontanées pourraient être un moyen de stabiliser ces écosystèmes complexes avant une valorisation via la production de molécules d'intérêt par exemple. Au-delà de la caractérisation des produits, l'identification des communautés microbiennes et la mesure des métabolites produits au cours de la fermentation spontanée permettrait d'observer les interactions qui régissent les écosystèmes. Le criblage des composés d'intérêt serait alors plus exhaustif. Ce travail de thèse pourrait par exemple être complété par la recherche de composés anti-microbiens tels que les bactériocines ou encore de composés biosurfactants. Une autre piste pourrait également envisager de stabiliser les sous-produits par fermentation spontanée et de les utiliser ensuite comme probiotiques pour les animaux. Il serait alors nécessaire de s'assurer de l'innocuité des sous-produits fermentés, et d'évaluer l'apport nutritionnel et sanitaire d'un tel produit.

7.1.3. Production d'acide L-lactique par fermentation et ensemencement d'une souche de *Lactobacillus paracasei*

Au début du projet, les expériences de fermentation spontanée avaient pour objectif d'étudier les sous-produits bruts. La mise au point d'une démarche générale de valorisation a été privilégiée à la caractérisation plus fine des sous-produits végétaux à disposition. En accord avec les industriels, les résultats obtenus ont orienté la suite du travail vers la production d'une molécule modèle : l'acide L-lactique. Les essais de fermentation spontanée, menés à partir de la matrice modèle, la pulpe de carottes, ont permis d'obtenir une quantité maximale d'acide L-lactique produite de 0,292 g/L de surnageant. La faible quantité obtenue a justifié l'isolement et la sélection d'un *Lactobacillus* producteur spécifique d'acide L-lactique. D'après la littérature, les quantités produites en milieu riche (ex : MRS) ou à partir de végétaux bruts peuvent varier du mg/L au g/L selon les conditions de culture. Par exemple, Ozcelik *et al.* (2016) ont mesuré la production d'acide lactique de plusieurs souches de bactéries lactiques (des genres : *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Pediococcus*), à partir de MRS, et obtenu une quantité moyenne d'environ 440 mg/L. En parallèle, ils mentionnent l'étude de Panesar *et al.* (2010) ayant produit plus de 33 g/L d'acide lactique à partir de petit lait. A partir de substrats végétaux, des essais de sélection et de caractérisation de souches lactiques ont mis en évidence des quantités de l'ordre de 42 mM d'acide lactique (soit environ 4 g/L) produit à partir de carottes (Di Cagno *et al.*, 2008), ou encore environ 30 mg/g de son de blé fermenté selon les souches testées (Prückler *et al.*, 2015b). En ce qui concerne la quantité d'acide L-lactique produite, celle-ci était plus élevée pour les essais ensemencés avec la souche de *Lb. paracasei* A1L, avec une quantité optimale environ trois fois plus importante (0,974 g/L de surnageant). Toutefois, il

est important de noter que ces deux quantités ont été obtenues à partir du même substrat, de la pulpe de carottes non stérilisée, mais que les paramètres d'incubation testés étaient différents. En fermentation spontanée, la température était de 24°C, et de 20°C pour l'essai ensemencé avec *Lb. paracasei* A1L. Pour ce dernier, le pH a également été ajusté à une valeur de 8 en début de fermentation et n'a pas été contrôlé. En fermentation spontanée, le pH initial de 4 environ était acide et pouvait limiter la croissance des bactéries lactiques et la production d'acide lactique (John *et al.*, 2007a). D'après les résultats obtenus, il sera nécessaire pour la suite du projet de maintenir le pH proche de la neutralité, au cours de la fermentation. Plusieurs études se sont intéressées à l'influence du pH sur la production d'acide lactique (Idris et Suzana, 2006; John *et al.*, 2006; Moon *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2016). Elles tendent à montrer qu'un pH d'environ 6-6,5 est optimal pour la production de cet acide organique, pour des substrats plus ou moins riches : du MRS et des déchets organiques (féculents, végétaux, viande et céréales), et plus ou moins supplémentés (glucose, azote et extrait de levure). De plus, ceci a été observé pour des pH contrôlés ou non au cours de la fermentation, et tamponnés ou non au départ.

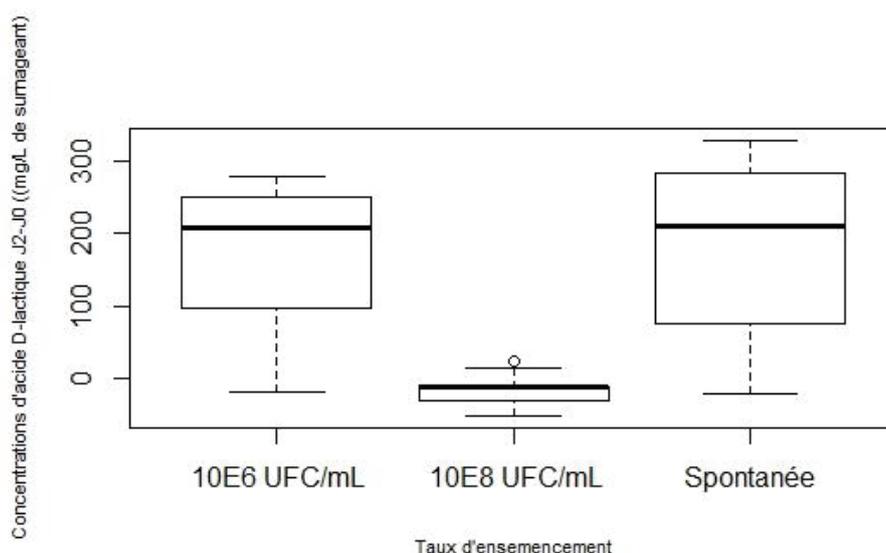


Figure 45 : Boxplots des concentrations de l'acide D-lactique J2-J0 (mg/L de surnageant) en fonction du taux de *Lactobacillus paracasei* A1L ensemencé. Les effectifs en fermentation spontanée, ensemencée à 10^6 et 10^8 UFC/mL sont respectivement de 7, 9 et 9 échantillons.

Au cours de ce travail, la production spécifique d'acide L-lactique était recherchée. Les résultats du plan d'optimisation ont permis d'analyser trois niveaux d'ensemencement : la fermentation spontanée, et la pulpe de carottes ensemencée en *Lb. paracasei* A1L à des taux de 10^6 et 10^8 UFC/mL. En fermentation spontanée et à un taux de 10^6 UFC/mL, l'isomère d'acide D-lactique était produit à une concentration d'environ 200 mg/L (Figure 45). Pour les essais ensemencés à 10^8 UFC/mL, la concentration moyenne d'acide D-lactique, pour J2-J0, était négative (= -14 mg d'acide D-lactique/L).

Ceci s'explique par des concentrations d'acide D-lactique plus faibles après deux jours de fermentation que celles mesurées à J0. L'acide D-lactique a donc été consommé par les microorganismes du milieu. Au-delà des concentrations brutes obtenues, les rapports d'acide D-lactique par rapport à la quantité totale d'acide lactique total (somme des formes D et L), indiquent que l'acide D-lactique représentait environ 40% de l'acide lactique total pour les essais en fermentation spontanée et fermentés à un taux de 10^6 UFC/mL de *Lb. paracasei* A1L. Pour les essaisensemencés à 10^8 UFC/mL, la totalité de l'acide lactique était sous forme (L). Les données ont été obtenues par soustraction des quantités après deux jours de fermentation à celles présentes au départ. Ceci permet de s'affranchir des quantités d'acide organique présentes au départ de la fermentation et qui auraient pu être produites dans le cas d'une fermentation spontanée lors du transport ou du stockage des sous-produits. La variabilité entre les échantillons, liée à une production préalable non homogène au sein de la matrice, est également ajustée. Ces rapports négatifs mettent en évidence que l'acide D-lactique n'a pas été produit mais consommé au cours de la fermentation. Ces observations confirment que l'ensemencement au plus haut taux microbien de *Lactobacillus paracasei* A1L testé oriente les métabolismes microbiens vers la production spécifique d'acide L-lactique. La souche sélectionnée est donc capable de favoriser la production d'acide L-lactique, bien que les quantités produites restent faibles entre 0,092 g/L et 0,974 g/L selon les conditions de culture. Il est indispensable pour la suite des essais d'approfondir l'étude des bilans matières en déterminant les rendements (g d'acide lactique produit/g de substrat consommé) et les productivités (g d'acide lactique produit/L/h), associées aux concentrations (g d'acide lactique produit/L). Pour cela, il sera nécessaire de mesurer les quantités de substrats consommées au cours de la fermentation, dont les sucres. Par exemple, des fermentations de différents sous-produits alimentaires (ex : marc de pommes, peau de mangue, paille de blé, déchets ménagers...), menées en batch, ont permis d'obtenir des concentrations finales en acide lactique allant de 8 à 92 g/L, ce qui est au minimum 10 fois plus important que la quantité maximale obtenue au cours de cette thèse (Abdel-Rahman *et al.*, 2013).

Les études qui s'intéressent à la production de métabolites par l'ajout d'un microorganisme au milieu utilisent deux voies : la sélection d'un microorganisme autochtone directement à partir du milieu ou l'utilisation d'une souche de référence allochtone capable de produire le métabolite d'intérêt. Pour ce travail de thèse, le screening d'une souche directement issue de pulpe de carottes a été privilégié. Considérant que la composition des sous-produits végétaux était différente, l'hypothèse était qu'un microorganisme issu du milieu serait adapté à la fermentation et capable de se développer aux conditions environnementales spécifiques (ex : la disponibilité des substrats, le pH, la température...). La présence des bactéries lactiques de façon commensale aux végétaux et leur utilisation pour la fermentation lactique (spontanée ou non) de tels produits sont largement

mentionnées dans la littérature et ont orienté la sélection d'une souche du genre *Lactobacillus* (Di Cagno *et al.*, 2013; Gänzle, 2015b; Yu *et al.*, 2019). Des études se sont intéressées aux avantages et inconvénients respectifs d'ensemencer des souches autochtones ou allochtones pour la fermentation de végétaux. Les souches allochtones composent par définition les microbiotes végétaux, et peuvent donc plus ou moins dominer l'écosystème et être présentes à des taux constants (Di Cagno *et al.*, 2013). En effet, les différentes flores natives sont sensibles aux conditions environnementales telles que les conditions de récolte, la température, la production de composés antimicrobiens, la présence de flores antagonistes ou encore la disponibilité en substrats (Aponte *et al.*, 2012; Di Cagno *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2019). La capacité des LAB à produire des acides organiques et des composés antimicrobiens, adaptés à l'inhibition des flores antagonistes des produits bruts, leur confère un avantage pour la colonisation de l'environnement. De plus, des études comparant des souches autochtones et allochtones ont montré une acidification plus importante pour les microorganismes natifs (Di Cagno *et al.*, 2013). L'ajout de bactéries autochtones en excès permet également de limiter la croissance des autres flores dont les levures. L'ensemencement en début de fermentation permet, en comparaison à la fermentation spontanée, d'initier et de favoriser la fermentation. Lors du screening de plusieurs souches candidates pour la production d'un métabolite, les critères technologiques pouvant être pris en compte sont : le taux de croissance, les profils d'acidification, la résistance aux faibles pH, et à de faibles températures. Un exemple de fermentation d'olives a mis en avant cette acidification plus rapide par des souches autochtones (Aponte *et al.*, 2012). Yu *et al.* (2019), ont également répertorié plusieurs études observant une variation de l'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la croissance, et l'inhibition des gènes de réponse aux stress, pour des souches réensemencées dans leur substrat initial.

Des exemples de fermentation menées avec des souches allochtones, comme les starters commerciaux, montrent une capacité des microorganismes à fermenter le milieu et dominer les flores natives des produits bruts (Di Cagno *et al.*, 2013). Cependant, il apparaît que ces souches ne tiennent pas compte, de fait, des conditions d'acidification propres au végétal et du développement des flores natives, elles seraient donc moins bien adaptées aux propriétés fonctionnelles des végétaux, seraient moins capables d'adapter leur métabolisme, et ne tiendraient pas compte des flores déjà présentes. La fermentation serait donc possible mais pas optimale. Wouters *et al.* (2013b), ont par exemple observé une acidification de carottes, chou-fleur et tomates, plus importante après deux jours de fermentation et l'ajout d'une souche isolée de poireaux, par rapport à une fermentation spontanée. Les concentrations d'acide lactique obtenues en fin de fermentation étaient quant à elles identiques. Un autre exemple, comparant l'acidification et la croissance de souches autochtones et allochtones (isolées d'olives), lors de la fermentation de jus végétaux (carottes, haricots verts et courges), a montré

que celles-ci étaient plus lentes pour les souches allochtones (Di Cagno *et al.*, 2008). Enfin, Gardner *et al.* (2001), ont montré que des souches isolées de produits carnés étaient capables de fermenter des végétaux et acidifier le milieu après trois jours d'incubation (carotte, chou, betterave et oignons).

Dans le cadre du projet, la souche *Lb. paracasei* A1L a montré une capacité à produire spécifiquement de l'acide L-lactique. A titre de comparaison, des essais d'optimisation de la production d'acide lactique devraient être réalisés à partir de tous les sous-produits, dans des conditions de fermentation optimisées à partir des résultats obtenus pour la pulpe de carottes. Il faudrait tester l'ensemencement de la souche, en parallèle de la sélection de souches adaptées à chaque matrice.

Les résultats obtenus pour la pulpe de carottes permettent de discuter le plan d'expérience suivi et de proposer des axes d'amélioration pour de futures expériences. Le contrôle de la température et de la quantité d'enzyme ajoutée a été maîtrisé au cours des essais réalisés sur la pulpe de carottes. Les niveaux fixés ont permis d'observer des différences sur la production d'acides organiques. Ils pourront être appliqués sur l'ensemble des sous-produits végétaux pour comparer leurs effets. Les paramètres de pH et d'ensemencement doivent être optimisés. La méthode utilisée pour l'ensemencement de *Lb. paracasei* A1L n'a pas permis d'atteindre les niveaux souhaités. Le traitement statistique des données selon un plan d'expérience D-optimal n'a donc pas pu être réalisée, et il n'a pas été possible de déterminer les conditions optimales de production d'acide L-lactique. L'estimation à partir d'un nombre de colonies sur géloses et le raclage des colonies pour constituer l'inoculum semblent peu appropriés à une application industrielle. L'ensemencement par un volume de culture en bouillon, dont la densité optique serait standardisée, permettrait de faciliter le traitement de ce paramètre (John *et al.*, 2006). Vis-à-vis des paramètres testés, les résultats indiquent qu'une régulation du pH à une valeur proche de la neutralité devrait être effectuée. Les niveaux testés pourraient être différents tels que des valeurs de pH de 6, 7 et 8, afin d'optimiser plus finement cette condition. Cependant, le plan d'expérience D-optimal testé comporte 25 essais. Le contrôle du pH nécessiterait de réaliser les expériences dans des fermenteurs pilote, et non en erlenmeyer. La gestion des essais serait alors plus lourde en temps et en moyens investis. Les essais préliminaires et de fermentation spontanée ont mis en évidence qu'une hydratation du sous-produit de son de blé était indispensable. La méthode de construction du plan d'expérience pour la fermentation spontanée de toutes les matrices n'a pas permis d'identifier la condition optimale d'hydratation du son de blé (chapitre 5). Les essais futurs devront donc tester différents niveaux d'eau ajoutée, afin d'aboutir à des conclusions plus robustes pour cette matrice.

Enfin, la mesure exacte des quantités de substrats consommées, notamment les sucres qui sont utilisés pour la production d'acide lactique, permettrait d'approfondir l'étude des bilans matières.

Au terme de l'étude, la quantité maximale d'acide L-lactique produite était de 0,44 g d'acide lactique/100 g de carottes, soit 6,5 g de glucides d'après les données de la littérature. Le rendement est donc inférieur à 10% (10 g d'acide L-lactique/100 g de glucides). En comparaison, les quantités théoriques d'acide lactique produites à partir d'un milieu riche, le MRS, sont de 91 g d'acide L-lactique/100 g de glucose. D'après les données de ce travail, la productivité maximale obtenue était de 0,032 g d'acide L-lactique/L/h. Moon *et al.* (2012), ont obtenu à partir de MRS une productivité maximale de 4 g d'acide L-lactique /L/h. Il est nécessaire de rappeler que des quantités plus importantes d'acide organique peuvent être produites à partir d'un substrat riche (riche en glucose par exemple) et avec un microorganisme producteur ajouté en excès, sans entrer en compétition avec les autres flores présentes dans le milieu.

Chapitre 7 : Discussion générale

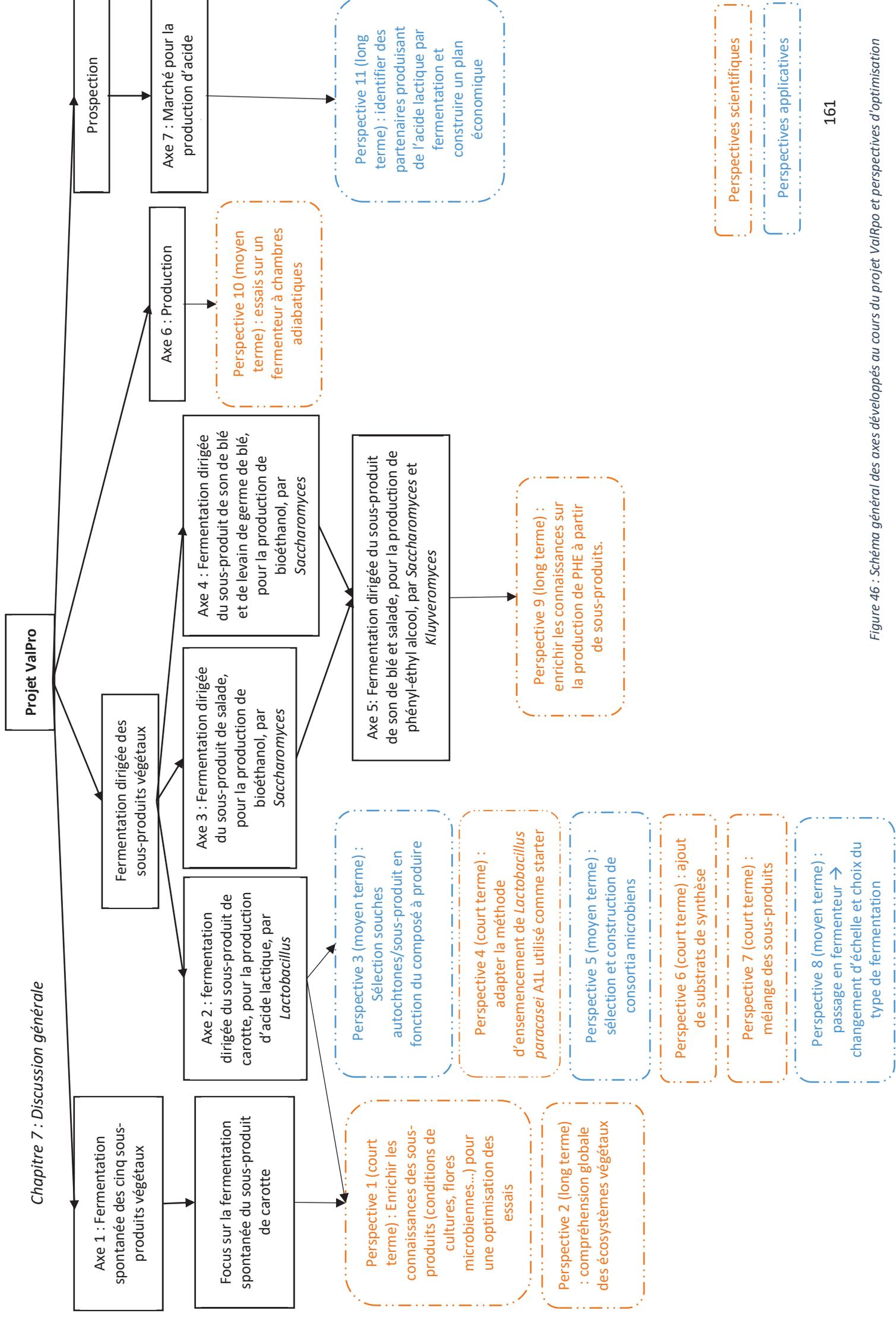


Figure 46 : Schéma général des axes développés au cours du projet ValPro et perspectives d'optimisation

7.1.4. Projets annexes développés au cours du projet ValPro

Les essais dont les résultats ont été présentés dans ce manuscrit ont permis d'enrichir les données liées à la fermentation spécifique de la pulpe de carottes (Figure 46). Les expériences réalisées sur les quatre autres sous-produits : les épluchures de salades, le levain de germe de blé, le son de blé et la peau de pommes, ont également mis en évidence une fermentation par les flores microbiennes natives, après 24h d'incubation, et ont permis d'enrichir les connaissances spécifiques à ces matrices. Ceci se traduisait par une diminution du pH et une augmentation de l'acidité titrable. L'originalité du projet était de partir de sous-produits bruts. Le nombre de matrices à considérer a limité la mise en place des essais de façon identique pour les cinq sous-produits et la répétition des expériences. Des projets annexes ont donc été entrepris afin d'explorer des voies de valorisation spécifiques à chaque sous-produit et d'apporter des éléments de réponse aux industriels sur les pistes intéressantes à poursuivre au-delà du projet ValPro.

A partir du sous-produit modèle de pulpe de carottes, un fermenteur avec des chambres adiabatiques a été prototypé pour réaliser des essais de fermentation et récupérer, au cours du temps, l'énergie et la chaleur émise. Les premières expériences sont en cours de réalisation et constituent une voie de valorisation à approfondir (Figure 46).

Enfin pour le sous-produit modèle, une étude prospective est actuellement menée par ISARA-conseil dans le but d'identifier le marché de l'acide lactique et ses spécificités. Au-delà de la démarche scientifique menée pour optimiser sa production, l'objectif est d'apporter des éléments concrets de marché aux industriels partenaires pour qu'ils puissent adapter leur stratégie de développement. Les premières observations de cette étude dégagent, comme la littérature scientifique, cinq marchés potentiels : la cosmétologie, la production de produits d'entretien, le médical, la production de bioplastiques et l'agro-alimentaire. En complément d'une enquête auprès des acteurs du marché, la production d'acide lactique à partir de sous-produits végétaux répond à une demande de produire des composés de façon plus responsable. Parmi les secteurs identifiés, ceux de la cosmétique, de l'entretien et des bioplastiques semblent les plus adaptés à une production de métabolites d'intérêt à partir de sous-produits. Les secteurs du médical et de l'agroalimentaire répondent à des normes et exigences plus strictes. Ces données permettent de caractériser l'environnement biotechnologique dans lequel s'inscrivent ces travaux de thèse.

La production de bioéthanol a été entreprise à partir d'épluchures de salades et de matrices céréalières, par ensemencement de *Saccharomyces cerevisiae*. Pour les épluchures de salades, les paramètres suivants ont été testés : ajout de glucose et peptone, et ajout d'eau. Les fermentations ont été menées à 30°C. Une acidification des milieux a été observée pour les échantillons ensemencés avec

les substrats carbonés ajoutés. La quantité finale d'éthanol obtenue était égale à 4,3 g/L pour des épiluchures de salades fermentées seules, pendant 48h. A titre de comparaison, des essais réalisés à partir de sous-produits de salades, oignons, épinards et carottes, en digestion anaérobie, ont permis de produire une quantité maximale de 5 g/L d'éthanol après cinq jours de fermentation (Bolaji et Dionisi, 2017). Au cours de cette fermentation en batch, le produit majoritaire était l'acétate (25 g/L produit après 20 jours fermentation). Plazzotta *et al.* (2018a, 2018b, 2017; 2018c), s'intéressent particulièrement à la valorisation des sous-produits de salades. A travers diverses études, ils rappellent que ces sous-produits représentent en moyenne 50% des déchets du marché alimentaire de produits frais et découpés (Plazzotta *et al.*, 2018a). D'après leurs données, les sous-produits constituent jusqu'à 40% des produits bruts, en fonction des variétés de salades. La voie la plus intéressante à partir de salades semble être l'extraction de composés d'intérêt tels que des composés antioxydants, des composés gélifiants ou des colorants. La faible teneur en glucides de ces végétaux implique systématiquement une co-digestion par l'ajout de différents sous-produits pour la production de biogaz (Plazzotta *et al.*, 2017). Les auteurs ont également étudié la possibilité d'utiliser de la farine de sous-produits de salades pour fabriquer du pain. Leurs résultats ont montré que les qualités organoleptiques et technologiques étaient satisfaisantes. Des essais restent à mener afin de limiter la présence et le développement de flores microbiennes d'altération et pathogènes dans ces produits riches en eau, et d'assurer leur qualité sanitaire (Plazzotta *et al.*, 2018b).

Les produits céréaliers ont également été utilisés pour la production de bioéthanol. Des enzymes (hémicellulase, protéase et amylase), du glucose et des peptones ont été ajoutés ou non aux essais de fermentation. Les résultats ont montré le développement des flores microbiennes natives des substrats, malgré l'ensemencement par des micro-organismes exogènes. L'ajout de protéase a eu pour effet de libérer des peptides et des acides aminés libres à partir des substrats. Il n'y a pas eu, dans les conditions testées, de production d'éthanol. En parallèle, une analyse par SPME des composés volatils produits a mis en évidence la production de phényl-éthyl alcool (PEA). Ce composé est utilisé dans l'industrie cosmétique pour son arôme de rose. Cette piste a donc été approfondie. Des essais ont été menés par ensemencement de deux levures : *S. cerevisiae*, et *Kluyveromyces marxianus*. Les conclusions de cette étude étaient que *K. marxianus* semblait favoriser la production de phényl-éthyl alcool. Cependant, ces observations ont été réalisées sur les spectres SPME qui indiquent une présence qualitative et non quantitative des composés identifiés. Pour *S. cerevisiae*, le composé n'était pas identifié par spectrométrie de masse sur les spectres. Si la suite du projet ValPro s'orientait vers la production de ce composé, des méthodes devront être mises au point pour quantifier la production au cours de la fermentation. D'un point de vue métabolique, les voies de production du PEA ont été étudiées chez *Escherichia coli* et *Saccharomyces cerevisiae* (Guo *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2014). Ajoutée

au milieu, la L-phénylalanine est un précurseur pour la production de PEA. En effet, le PEA est produit par la voie de catabolisme de cet acide aminé (voie d'Ehrlich) en trois étapes : la transamination de la L-phénylalanine, la décarboxylation du phényl-pyruvate et la réduction du phényl-acétaldéhyde.

Après trois ans de projet, il semble nécessaire de faire le bilan avec les industriels afin de construire la suite du projet ValPro. Comme évoqué précédemment, le nombre de sous-produits est important et impose de réduire le nombre d'essais réalisés ou de se concentrer sur une voie unique de valorisation parmi la production d'acide lactique, la production d'énergie, la production de bioéthanol ou de phényl-éthyl alcool. En effet, dans le temps imparti, certains sous-produits dont les peaux de pommes et les épluchures de salades ont été peu étudiés. L'intérêt serait également de répondre aux besoins spécifiques de chaque industriel qui sont directement liés à la singularité de leurs sous-produits. D'après les premiers retours, la poursuite de l'étude prospective de l'acide lactique devrait être approfondie. Les essais sur le fermenteur pilote avec chambres adiabatiques devraient également se poursuivre.

Tableau 11 : Estimation des bénéfices de vente d'acide lactique et de phényl-éthyl alcool à partir de substrats végétaux et de MRS

		Concentration en glucose (g de glucose/kg de produit)	Production d'acide lactique à partir de glucose (g/L) (*)	Production de phényl-éthyl alcool (g/L) (**)	Valorisation/Prix de vente (ND : non disponible)	Estimation des bénéfices de vente du produit final (US\$/kg de produit) (***)	Références
Substrats	Carotte crue	11 g/kg	0,9 g d'acide lactique/g de glucose	0,9 g de phényl-éthyl alcool/2 g de glucose (données non disponibles à partir de substrats végétaux)	Alimentation animale/ND	AL : 0,015 PEA : 0,025	(Anses, 2017; Fabre <i>et al.</i> , 1998, 1998; Filip <i>et al.</i> , 2016; Hua <i>et Xu</i> , 2011; Pleissner <i>et al.</i> , 2016)
	Salade crue	8,3 g/kg de sucres				AL : 0,011 PEA : 0,019	
	Peau de pommes	10 g/kg				AL : 0,013 PEA : 0,022	
	Son de blé	5 g/kg				AL : $6,7 \cdot 10^{-3}$ PEA : 0,011	
	Germe de blé	< 2 g/kg				AL : $2,7 \cdot 10^{-3}$ PEA : $4,5 \cdot 10^{-3}$	
	MRS	20 g/L	1 g d'acide lactique/g de glucose comme seule source carbone	226 US\$/kg	AL : 0,03 PEA : 0,045		

(*) Le prix de vente de l'acide lactique à 88% de pureté est d'environ 1,5 US \$/kg (Venus *et al.*, 2018)

(**) Le prix de vente du phényl-éthyl alcool, obtenu à partir de benzène et styrène, est d'environ 5 US\$/kg (Hua *et Xu*, 2011)

(***) Prix de vente du produit final (US\$/kg de substrat) = concentration en glucose x production du produit final x prix de vente du produit final/1000

Le Tableau 11 permet d'estimer très grossièrement les bénéfices qui pourraient être effectués par la production d'acide lactique et de phényl-éthyl alcool, qui ont été les deux composés les plus étudiés dans la globalité du projet ValPro. Le phényl-éthyl alcool, obtenu par synthèse chimique, a un prix de vente plus élevé que l'acide lactique (5 US\$/kg contre 1,5 US\$/kg). Le prix du PHE est d'autant plus élevé lorsqu'il est extrait d'huiles essentielles de fleurs où le prix de vente est de 1000 US\$/kg. Les estimations proposées ont été calculées sur la base des quantités théoriques pouvant être produites à partir du glucose, lorsque les rendements sont maximaux. La conversion plus faible de glucose en acide lactique à partir des sous-produits végétaux s'explique par le fait que les produits contiennent plusieurs sucres et que les rendements ne seront jamais de 100% à partir de matrices complexes (Pleissner *et al.*, 2016). Pour les carottes crues, la salade crue et la peau de pommes, les rendements seraient deux fois plus faibles que ceux obtenus à partir d'un milieu nutritif : le bouillon MRS. Les produits de blé, faibles en glucose, semblent les moins rentables sur la base de ce critère. Pour aller plus loin il est indispensable de considérer les coûts engendrés par l'achat de matériel, d'apport de substrats (extrait de levure, peptones...), les dépenses énergétiques, mais également les propriétés des microorganismes producteurs (taux de conversion, caractère homo- ou hétéro-fermentaire...) ou les rendements d'extraction. Une étude économique plus poussée, comparant différents modèles, propose un système théoriquement rentable pour la production d'acide lactique (Kwan *et al.*, 2018). Les scénarii étudiés prennent en compte l'ensemble des critères précédemment cités. Des essais pourraient être menés sur la base de ces recommandations afin de tester et de valider le modèle le plus rentable. Globalement, les principales étapes sont : un pré-traitement mécanique des matières premières, une hydrolyse par des moisissures du genre *Aspergillus* et la production d'acide lactique par *Lb. sakei*, par fermentation. Des pistes rentables d'optimisation de la production de l'acide lactique, sur lesquelles peuvent s'appuyer les travaux de recherche, sont d'ores et déjà développées (Kwan *et al.*, 2018; Pleissner *et al.*, 2016; Rodrigues *et al.*, 2017; Venus *et al.*, 2018). La purification de l'acide lactique est une étape clé dans le processus de production et définit la qualité du produit final (Abdel-Rahman *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2017). Plusieurs techniques peuvent être utilisées : la précipitation acide, la dialyse, l'extraction par solvant, l'osmose inverse, ou encore la distillation. La précipitation acide est utilisée mais est coûteuse et génère d'autres types de déchets, du plâtre, qui devient alors un nouveau produit à recycler. Thang *et al.* (2008), ont étudié la technique de

chromatographie à l'aide d'une résine polymère neutre pour l'extraction de l'acide lactique à partir d'un produit hétérogène et plus complexe qu'un bouillon de culture : le jus d'ensilage d'herbe. Les résultats ont montré que l'acide lactique extrait n'était pas pur et qu'il était contaminé par d'autres acides organiques et des acides aminés. L'optimisation de la production de PHE est encore peu étudiée à partir de sous-produits végétaux et pourrait être investie (Adler *et al.*, 2011; Fabre *et al.*, 1998; Hua et Xu, 2011; T.-Y. Kim *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2011). Une extraction liquide-liquide peut être réalisée afin de récupérer le PEA produit au cours de la fermentation (Etschmann *et al.*, 2003). Les solvants : myristate d'isopropyle, l'alcool oléylique et le miglyol sont trois solvants qui peuvent être utilisés sans inhiber la croissance des levures. Stark *et al.* (2002) ont testé l'extraction du PEA par l'acide oléique. Ils mentionnent également que l'extraction peut être suivie d'une distillation sous vide au point d'ébullition du solvant à 280°C, à pression ambiante. Contrairement à l'étude citée précédemment, l'acide oléique inhibe la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* et diminue la production de PEA.

7.2. Limites et perspectives du projet

L'utilisation des sous-produits seuls, et l'ajustement de certains paramètres des plans d'expériences révèlent des limites aux méthodes utilisées et doivent être optimisées. Les paragraphes suivants proposent des perspectives de développement, scientifiques ou applicatives, et réalisables à plus ou moins court terme, en lien avec les observations qui ont été effectuées au cours du projet. La Figure 46 schématise l'ensemble de ces réflexions. Les perspectives présentées s'articulent autour de trois points :

- (i) : l'optimisation des sources nutritives par addition de substrats ou mélange de sous-produits
- (ii) : la discussion des genres microbiens sélectionnés pour valoriser les sous-produits végétaux et l'optimisation des métabolismes associés
- (iii) : les limites d'application à l'échelle industrielle

Le premier point (i) est complémentaire du travail effectué jusqu'à présent et devrait permettre d'augmenter les rendements de production de l'acide L-lactique à court terme. Le développement du second point (ii) est nécessaire mais peut être long à mettre en place. En effet, la sélection de souches microbiennes implique d'assurer la production de métabolites dans des quantités suffisantes et intéressantes pour une application viable, mais également de caractériser les interactions entre les microorganismes pour qu'ils puissent se développer au sein d'un même écosystème. Enfin, le troisième point (iii) abordé rappelle que les essais menés en laboratoire, dans de faibles volumes (erlenmeyer), doivent de nouveau être optimisés lors du passage en fermenteur pilote

et industriel. De plus, les paramètres de culture peuvent être plus ou moins contrôlés (ex : pH), et modifier les interactions mêmes entre les flores microbiennes et le biotope.

7.2.1. L'utilisation de substrats/sous-produits bruts

En accord avec les partenaires industriels, les différents sous-produits à disposition ont été traités indépendamment les uns des autres. En pratique, cela permet à chaque industriel d'envisager une valorisation spécifique à la nature de son sous-produit et de déterminer les voies qu'il souhaite développer. Dans le cadre du projet ValPro et du temps imparti correspondant, cela a conduit à sélectionner une matrice modèle pour les essais menés pour la thèse et à traiter les autres sous-produits à travers des études annexes.

7.2.1.1. Mélange de sous-produits

La diversité des substrats carbonés, et particulièrement des sucres, peut favoriser la fermentation (Wang *et al.*, 2015). Wouters *et al.* (2013a), ont obtenu des taux variables d'acides organiques et d'éthanol produits en fonction des végétaux fermentés. En fin de fermentation, la quantité la plus faible d'acide lactique produite était de 20 mmol/L (soit 1,8 g/L) pour du chou et de la betterave, contre 126 mmol/L (soit 11,5 g/L) pour du concombre et des prunes. L'azote disponible est également un paramètre limitant des métabolismes microbiens, notamment pour la production d'acide lactique. En effet, les bactéries lactiques sont auxotrophes pour au moins sept acides aminés : acide glutamique, isoleucine, leucine, méthionine, phénylalanine, tryptophane et valine (Christiansen *et al.*, 2008; Deguchi et Morishita, 1992; Morishita *et al.*, 1981). Les études référencées s'appuient sur l'identification des auxotrophies des espèces : *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus casei*. Le nombre et la nature des auxotrophies est variable selon les espèces et peut aller jusqu'à 14. Ces carences justifient la nécessité d'estimer la quantité d'azote sous différentes formes dans les sous-produits végétaux, par mesure des teneurs en azote total, soluble dans l'eau ou encore dans l'acide phosphotungstique. Les sources d'azote ajoutées dans les milieux de culture de micro-organismes conventionnels, par exemple les polypeptones (10 g/L), les extraits de viande (10 g/L) et les extraits de levures (5 g/L) dans le milieu MRS, pour optimiser la croissance microbienne et/ou les productions de métabolites représentent des coûts non négligeables. A titre de comparaison, les quantités de matières azotées totales (N x 6,25) des sous-produits étaient plus faibles et comprises entre 1,40 g/100 g et 17,50 g/100 g de produit. La supplémentation de sous-produits pauvres en azote avec des sous-produits plus riches en azote, tels que ceux à base de blé pourrait ainsi être une voie plus économique. Le recours à des ressources renouvelables, pour pallier les carences ou auxotrophies nutritives des flores microbiennes,

correspondrait à une démarche de valorisation industrielle de certains sous-produits qui tendrait à être à la fois plus écologique et plus rentable.

Afin de faciliter l'accès aux nutriments nécessaires à la croissance des microorganismes et à la production d'acide lactique, des prétraitements peuvent être effectués : physique, physico-chimiques, chimiques et biologiques (Wang *et al.*, 2015). Au cours de la thèse, le broyage, l'ajout d'enzymes et de microorganismes ont été étudiés au travers de deux plans d'expérience. Dans les conditions testées, seul l'ajout de microorganismes a eu un effet sur la production d'acide L-lactique. Il pourrait être envisagé de recourir à un prétraitement au préalable de tout autre condition testée et de l'ajout d'enzyme ou de microorganismes. Les prétraitements physiques (ex : broyage, irradiation) permettent de ne pas utiliser de produits chimiques, tels que les acides forts, et ainsi de réduire la formation de nouveaux déchets et les coûts liés à leur ajout.

7.2.1.2. Ajout de substrats de synthèse

Les sources en substrats carbonés doivent être suffisantes pour permettre la fermentation lactique. La nature des sucres à disposition des microorganismes est notamment un critère déterminant avec une consommation du glucose qui est privilégiée par les bactéries lactiques (Wang *et al.*, 2015). L'ajout de glucose en même temps que l'ensemencement par une flore lactique est un moyen de favoriser la fermentation lactique, et de limiter en parallèle le développement des levures (Wouters *et al.*, 2013b).

Le ratio des ressources carbonées et azotées est déterminant pour la production d'acide lactique (Hujanen et Linko, 1996; John *et al.*, 2007a; Wang *et al.*, 2015). Différentes sources exogènes d'azote peuvent être ajoutées pour compléter le milieu et les sous-produits les plus pauvres en azote : des peptones, des extraits de levures ou de viandes. L'ajout d'hydrolysats de son de blé est également une voie envisagée. Les hydrolysats obtenus à partir de matières organiques sont moins onéreux et permettent de réduire les coûts (John *et al.*, 2007a). Wang *et al.* (2015) font également référence à une étude pour laquelle la production d'acide lactique était favorisée par l'ajout de sulfate de sodium, d'acétate de sodium, de K_2HPO_4 , de $MnSO_4$ et $FeSO_4$. La littérature met également en avant que la production d'acide lactique peut être optimisée en limitant l'ajout d'extrait de levures, mais en augmentant la source de phosphore inorganique (Venus *et al.*, 2018).

7.2.2. Capacité d'un microorganisme à produire des composés d'intérêt à partir de végétaux bruts

D'un point de vue microbiologique, l'analyse de la littérature démontre que la nature et la dynamique des flores microbiennes dominantes présentent de fortes similitudes quels que soient les

végétaux fermentés, avec la présence majoritaire des bactéries lactiques, et ce même si leur composition biochimique présente des différences (Chen *et al.*, 2017; Rizo *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2019). Les bactéries lactiques sont systématiquement identifiées et sont notamment impliquées dans la conservation des produits alimentaires (Zagorec et Christieans, 2013). Ceci explique l'intérêt pour l'Homme d'étudier et de caractériser ces microorganismes. Pour divers végétaux (kimchi, choucroute, grains de café, jus de carottes), le genre *Leuconostoc* est identifié au cours des premiers jours de fermentation (Chen *et al.*, 2017; Di Cagno *et al.*, 2013; Rizo *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2019). Les genres lactiques *Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Weissella* interviennent ensuite. La tolérance de *Lactobacillus* pour des pH acides lui permet de se développer. L'analyse par métagénomique de végétaux fermentés (bambou, chou, haricots, fèves de cacao et pastèque) a mis en évidence que le genre *Lactobacillus*, et particulièrement *Lb. plantarum*, était majoritaire (Peng *et al.*, 2018; Rizo *et al.*, 2020). Le microbiote des végétaux bruts est également constitué des levures (ex : *Cryptococcus*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Pichia*) et de bactéries aérobies (ex : *Pseudomonas*, entérobactéries et bactéries corynéformes) (Di Cagno *et al.*, 2013). Les bactéries à Gram négatif seront inhibées dans les premiers jours de fermentation par acidification du milieu. Au même titre que les activités métaboliques pourraient être complémentées par l'ensemencement de plusieurs souches microbiennes, l'apport en substrats divers peut impacter la production de métabolites.

7.2.2.1. Screening de microorganismes issus des microbiotes digestifs des animaux

Comme les résultats obtenus dans le cadre de ce travail et les données de la littérature l'indiquent, le biotope des végétaux est une source de microorganismes pouvant être utilisés à des fins technologiques pour la production de métabolites d'intérêt. Les bactéries lactiques sont souvent identifiées comme telles, et sont largement utilisées pour la conservation des produits alimentaires via les processus de fermentation (Peng *et al.*, 2018). L'étude des écosystèmes par le prisme des microbiotes a également permis d'enrichir les connaissances sur les réseaux trophiques et métaboliques mis en place. Les connaissances sur la composition et le fonctionnement des microbiotes herbivores pourraient s'avérer intéressantes pour la sélection de microorganismes capables de dégrader efficacement les tissus végétaux et/ou de produire des métabolites d'intérêt. A titre d'exemple, les études dans ce domaine se sont multipliées ces dernières années et ont montré que le microbiote digestif des animaux herbivores était composé de microorganismes anaérobies (Fonty *et al.*, 2019). De plus, leur équipement enzymatique permet une digestion efficace et une fermentation des végétaux qu'ils consomment. Deux communautés microbiennes ont été identifiées : les espèces hydrolytiques et les espèces fermentatives (Bernalier-Donadille, 2010; Duncan *et al.*, 2003). D'un point de vue métabolique, les microorganismes hydrolytiques sont les premiers à intervenir. Les bactéries

fibrolytiques : *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, ou encore *R. flavefaciens*, ont pour rôle de dégrader la cellulose et de libérer des sucres solubles fermentescibles dans l'environnement extérieur. Des champignons de la classe des « *Chytridiomycetes* » caractérisent également la flore digestive. Ils dégradent les végétaux par action mécanique. Parmi les espèces identifiées, *Bacteroides*, *Roseburia* et *Ruminococcus*, ont pu être cultivées en fermenteurs. L'exploitation des micro-organismes endogènes des matrices végétales est une autre voie prometteuse, même si elle peut parfois imposer des conditions anaérobies strictes, difficiles à reproduire dans un contexte de bioconversion industrielle de déchets ou co-produits. En effet, la mise en culture de ces souches reste souvent un frein dans leur utilisation et doit être approfondie. Enfin, plusieurs métabolites intermédiaires sont produits à partir des sucres libérés lors de la dégradation cellulaire dont les acides organiques : butyrique, acétique, propionique, succinique et lactique. Les bactéries lactiques, notamment les genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*, sont dans cet environnement associées à la production d'acide lactique. Des acides gras volatils et des gaz (H_2 et CO_2) sont également synthétisés lors de la phase fermentaire.

7.2.2.2. Constitution de consortia microbiens aux activités complémentaires

Les éléments de discussion apportés se concentrent principalement sur la production d'acide lactique, car une grande partie du travail a été consacrée à optimiser sa production, mais il est important de garder à l'esprit que les microorganismes sélectionnés dépendent des métabolites à produire (Panda *et al.*, 2016). Les bactéries lactiques sont identifiées dans la littérature pour la production d'acide lactique, mais d'autres acides comme l'acide citrique peuvent être produits par des moisissures telles que *Yarrowia lipolytica*. Les phénomènes de compétition entre les flores et en leur sein devront être considérées si la matrice n'est pas préalablement stérilisée (Ivey *et al.*, 2013). En effet, les interactions entre les microorganismes des végétaux peuvent être négatives (parasitisme, amensalisme, compétition pour un substrat) ou positives (mutualisme, synergisme) et avoir un effet direct sur la fermentation des végétaux.

L'ensemencement par un cocktail microbien, de genres microbiens divers, présente donc deux avantages : pallier à l'élimination d'une espèce par les bactériophages et compléter les activités métaboliques lors de la fermentation (Panda *et al.*, 2016). Cizeikiene *et al.* (2018), ont isolé des *Lactobacillus* capables de produire de l'acide lactique à partir de paille de blé et ont formé des consortia à partir de ces souches. Leurs expériences ont montré une synergie dans la production d'acide L-lactique avec des quantités plus élevées pour un consortium constitué de deux souches de *Lb. delbrueckii*, en comparaison aux souches seules. Les auteurs avancent que l'utilisation de consortia

microbiens pourrait limiter l'ajout de substrats et réduire les coûts. Aucune souche microbienne n'est capable à elle seule de consommer l'ensemble des sucres à disposition (Eş *et al.*, 2018). Par exemple, la fermentation d'un substrat de maïs a montré que l'ajout de *Lb. plantarum* dans un premier temps, puis de *Lb. brevis* augmentait la production d'acide lactique (Zhang et Vadlani, 2015). Ces deux espèces consommaient respectivement le glucose et le xylose en priorité. Petrova et Petrov (2012), ont isolé une souche amylolytique de *Lb. paracasei*, capable d'utiliser l'amidon comme source de carbone et produire une quantité maximale d'acide lactique de 40 g/L de substrat et une conversion de 93%, avec une productivité de 1,3 g/L/h.

L'effet Jameson a été décrit pour expliquer l'inhibition des flores pathogènes par les flores natives protectrices dans les produits destinés à l'alimentation (Ivey *et al.*, 2013; Zagorec et Christieans, 2013). Il traduit l'arrêt de la croissance des flores pathogènes et d'altération lorsque la flore dominante atteint sa phase stationnaire de croissance. Les scientifiques expliquent cet effet par l'épuisement des ressources nutritives des écosystèmes. Des effets antagonistes entre les différentes souches d'un consortium peuvent également être liés à la production de composés antimicrobiens dont les bactériocines (Gardner *et al.*, 2001). Ces phénomènes peuvent relever de l'amensalisme lorsque la production de bactériocines affecte la croissance d'autres flores du milieu. Les tests d'inhibition sur géloses nutritives, par formation de halos d'inhibition, sont faciles et rapides à mettre en place. L'inhibition des flores microbiennes par les bactériophages se traduit par un parasitisme, car le développement du phage et son action nécessitent la présence d'une bactérie cible (Ivey *et al.*, 2013; Zagorec et Christieans, 2013).

7.2.3. Limites d'application à échelle industrielle

7.2.3.1. Caractérisation des interactions microbiennes et métaboliques

La quantité et la diversité des informations récoltées à travers la métagénomique, la métatranscriptomique et la métabolomique permettent de comprendre plus finement les interactions mises en jeu entre le biotope et la biocénose (Rizo *et al.*, 2020). Des travaux, menés par Peng *et al.* (2018), ont montré que les bactéries du genre *Lactobacillus* étaient à l'origine du fonctionnement des voies métaboliques lors de la fermentation de végétaux. Le réseau global et les interactions mises en jeu ont pu être caractérisées plus finement. Par exemple, *Lactobacillus fermentum* semblait favoriser la production d'acide lactique dans les conditions testées. Ivey *et al.* (2013) rapportent que les interactions microbiennes, négatives ou positives, mises en jeu dans les écosystèmes microbiens souvent complexes des aliments fermentés régissent la succession des différentes communautés dans l'écosystème. De plus, ils rappellent que les bactériophages jouent un rôle important dans la régulation de la croissance microbienne. Dans le cas de la valorisation de sous-produits végétaux menée dans

cette étude, il serait important de considérer cet aspect. En effet, l'ensemencement d'une souche pure en fermenteur permet d'optimiser la production d'un métabolite d'intérêt mais implique également une colonisation de l'environnement par cette souche, potentiellement plus sensible à une attaque phagique. Naturellement, différentes communautés microbiennes interagissent entre elles, notamment au sein des biofilms mais aussi de micro-colonies via la synthèse de molécules signal. Leur production peut avoir des effets sur la croissance et la régulation des taux cellulaires mais également sur la synthèse des métabolites intermédiaires (Chen, 2006; Ivey *et al.*, 2013). A titre d'exemple, la production de tryptophol et de phényl-éthyl alcool par *Saccharomyces cerevisiae*, est régulée par la densité cellulaire et le taux d'azote du milieu, ces mécanismes impactant eux-mêmes la morphologie des cellules. Dans le cadre de la problématique de valorisation des sous-produits, la production de phényl-éthyl alcool est un des axes développés au cours du projet ValPro, car il peut être utilisé pour ses propriétés sensorielles (arôme de rose) ou encore antimicrobiennes dans les parfums, les savons ou encore les cigarettes. Connaître les mécanismes de régulation associés à la production de cette molécule permet d'établir les conditions de culture les plus favorables à sa synthèse, et de développer des souches plus performantes.

Au départ du projet ValPro, le parti pris a été de mener des fermentations spontanées, à partir des sous-produits bruts d'origine végétale et de considérer sans *a priori* la production de métabolites ayant des natures diverses (acides organiques, peptides, vitamines, acides nucléiques, sucres, acides gras ou encore les composés phénoliques) (Rizo *et al.*, 2020). Toutefois, compte tenu des moyens analytiques à notre disposition, la recherche des métabolites n'a pas pu être réalisée de façon exhaustive. Le recours à la métabolomique pourrait être utilisé afin d'avoir une vue globale des molécules synthétisées. En effet, en plus de l'intérêt écologique à réutiliser un sous-produit comme substrat pour la production de métabolites, un intérêt industriel existe pour produire des molécules avec une valeur ajoutée telles que les acides organiques ou les composés aromatiques (Abu Yazid *et al.*, 2017). L'approche de métabolomique « non ciblée » permet d'obtenir des profils qui peuvent être comparés en fonction des conditions de culture appliquées par exemple. A l'heure actuelle, cette technologie permet d'étudier les profils organoleptiques des végétaux fermentés (Wu et Zhao, 2019). En pratique, elle repose sur l'analyse de la composition chimique des molécules présentes par chromatographie (liquide ou gazeuse) couplée à la spectrométrie de masse ou encore par résonance magnétique nucléaire (Chen *et al.*, 2017). Bien qu'elles détectent un plus grand nombre de molécules différentes, par rapport à la quantification par kits enzymatiques par exemple, la nature des molécules détectées reste dépendante de la méthode utilisée (Singh *et al.*, 2017). Plus les variables de culture testées et le nombre de modalités appliquées seront nombreuses, comme c'est le cas pour les plans d'expérience, plus le nombre d'écosystèmes différents à analyser sera important. En fonction du nombre de points

considérés dans le temps, les analyses peuvent représenter des coûts en temps et financiers non négligeables.

7.2.3.2. Changement d'échelle et spécificités des types de fermentation

L'impact du changement d'échelle sur la production des métabolites et leur extraction n'ont pas été abordés dans ce travail. Cependant, ce sont deux questions qui doivent être considérées avant d'envisager toute mise en place d'unité de valorisation à l'échelle industrielle (Lonsane *et al.*, 1992). Les technologies d'extraction mises en place à l'heure actuelle utilisent fréquemment des solvants pour l'extraction de composés d'intérêt, dépendant de la nature de la molécule à extraire. De plus, l'extraction représente des coûts non négligeables dans les processus de valorisation (Abu Yazid *et al.*, 2017). L'emploi de systèmes intégrés favorisant à la fois la production et la purification des métabolites produits tels que des bioréacteurs à membrane est dans ce contexte une option qu'il faudra considérer.

Pour terminer cette discussion, la perspective de poursuivre ces travaux de recherche à des fins applicatives implique d'adapter le choix du mode de fermentation qui sera utilisé lors des essais en pilote, puis en fermenteur industriel. Cinq types de fermentation sont possibles : la culture discontinue (batch), le semi-continu, le fed batch, la culture continue et continue avec recyclage de la biomasse (Abdel-Rahman *et al.*, 2013; Eş *et al.*, 2018; López-Gómez *et al.*, 2018). Ces types de fermentation supposent que les conditions physico-chimiques, notamment l'hydratation, des sous-produits permettent une culture en fermenteur. La principale limite du mode discontinu est l'accumulation de composés qui peuvent inhiber la croissance microbienne. Ceci peut être le cas de l'acide lactique (López-Gómez *et al.*, 2018). Le fed-batch permet un développement important de la biomasse par l'apport du substrat de façon graduelle. Pour le mode continu, l'apport constant du substrat permet de réguler la croissance microbienne. Il est préféré aux autres modes de fermentation pour la production d'acide lactique (Abdel-Rahman *et al.*, 2013; López-Gómez *et al.*, 2018). La productivité d'acide lactique en fermentation continue avec recyclage de la biomasse produite peut être multipliée par deux par rapport à une fermentation continue. Le mode batch favorise la production de quantités élevées de métabolites, tandis que la culture continue augmente la productivité (g/L/h). L'aération, la pression, la température, l'agitation et le pH, sont des paramètres qui peuvent être contrôlés en fermenteur contrairement aux essais réalisés en erlenmeyer. La production des métabolites primaires (comme les acides organiques) est réalisée par des microorganismes en division pendant la phase exponentielle de croissance. La production des métabolites secondaires a lieu en phase stationnaire, quand la disponibilité en substrats est limitée. La fermentation en fed-batch et en continue permettent respectivement de limiter les inhibitions liées aux substrats, et à la production de métabolites finaux (Abdel-Rahman *et al.*, 2013). Pour un même

produit, le topinambour, des fermentations en batch et en fed-batch, ont montré des productivités respectives de 1 g d'acide lactique/L/h et 4,7 g/L/h (Eş *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2015). La fermentation de sous-produits de maïs en fermentation continue a permis de multiplier la productivité d'acide lactique par cinq, par rapport à une fermentation en batch (Wang *et al.*, 2015). Les productivités associées étaient de 5,7 g d'acide lactique produit/L/h, et 1 g/L/h. Dans une démarche de valorisation, il est également important de considérer le recyclage de la biomasse produite (Blaesen *et al.*, 2007; Risse *et al.*, 2001). Elle est souvent utilisée pour la fertilisation des sols agricoles. Après extraction des cellules microbiennes, celles-ci pourraient également être utilisées pour enrichir des milieux de culture, de la même façon que les extraits de levures. Une étude a été menée afin de comparer la composition de deux extraits de levures et d'une souche d'*Escherichia coli* utilisée pour la production de thréonine à l'origine (Blaesen *et al.*, 2007). Les résultats indiquent que les teneurs en matière carbonée et azotée sont équivalentes, respectivement d'environ 40 et 12%. Les acides aminés présents étaient différents pour les deux extraits. Ceci était lié à la méthode de lyse utilisée.

Conclusion

Conclusion

L'approche abordée dans cette thèse pour valoriser les sous-produits végétaux s'est principalement intéressée à la production de composés avec une valeur ajoutée (ex : acide lactique, phényl-éthyl alcool, éthanol), via les processus de fermentation par les microorganismes du milieu. La littérature décrit largement les processus de fermentation pour la production de produits alimentaires consommables et stables (ex : production d'acides organiques et développement des flores natives protectrices) et aux propriétés organoleptiques améliorées (ex : production d'arômes). L'enjeu ici est d'utiliser ces propriétés pour produire des composés avec des rendements économiques intéressants, à partir de sous-produits souvent destinés à l'alimentation animale. D'autres voies de valorisation existent telles que la production d'énergie (ex : production de biogaz par fermentation anaérobie), la production de compost, ou encore l'épandage.

L'étude préliminaire des sous-produits végétaux a permis de mesurer certains paramètres des produits bruts tels que le pH initial, l'acidité titrable, les flores microbiennes, les quantités de différentes fractions azotées et le taux d'humidité. Afin de compléter ces analyses, il serait intéressant de mesurer les quantités des différents sucres, des minéraux, de certaines vitamines et d'établir les profils de composition en acides aminés des protéines de ces produits. En effet, cela permettrait d'avoir une image plus précise des nutriments disponibles pour la croissance des microorganismes et spécifique à chaque sous-produit. La composition des substrats est déterminante pour la croissance microbienne. Les paramètres physico-chimiques de pH et d'acidité titrable sont des témoins de la fermentation des produits végétaux. Dans le cas du levain de germe de blé dont le processus de production implique une fermentation, un pH acide et une acidité titrable élevée ont logiquement été observés. De plus, excepté pour le levain de germe de blé (qui a subi un traitement thermique) et les peaux de pommes (lavées dans un bain de chlore), les sous-produits n'ont pas subi de traitements physiques ou chimiques. Ils sont donc potentiellement porteurs de flores microbiennes commensales et susceptibles de subir une fermentation spontanée lors du stockage, ou du transport. Pour le levain et les peaux de pommes, un réensemencement spontané par les microorganismes de l'environnement peut être envisagé lors du stockage en conteneur en attendant leur évacuation. Tout ceci rappelle qu'une variabilité entre les lots peut être présente. Ceci a été observé pour les sous-produits les plus riches en eau : la pulpe de carottes et les épluchures de salades, pour lesquels les pH initiaux étaient variables entre deux lots. Il serait donc important de considérer cette variabilité dans les essais qui seront réalisés à l'avenir en répétant les expérimentations à partir de lots différents, récupérés à différents moments de l'année. En effet, la littérature indique que les conditions de culture en champ peuvent modifier les flores microbiennes (Caponigro *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2019).

Conclusion

L'originalité du projet reposait sur le souhait de traiter les produits les plus bruts possibles et de limiter l'ajout de substrats et les prétraitements (physiques, biologiques et chimiques), afin de ne pas créer de nouveaux déchets. Le choix a alors été de réaliser des fermentations spontanées, en faisant varier des paramètres simples de culture, mais capables d'impacter la croissance des microorganismes (température, broyage, quantité en eau). La variable « rafraîchis » devait permettre de récupérer les composés produits dans le surnageant de culture à différents temps de fermentation et potentiellement de réorienter le développement des flores microbiennes.

En fermentation spontanée, une acidification des sous-produits a été observée dès les premiers jours d'incubation. Ceci est un indicateur de la fermentation lactique et suppose la production d'acides organiques. La production d'acide acétique pour la pulpe de carottes met notamment en avant la croissance de microorganismes aux métabolismes hétérofermentaires. Afin d'effectuer des bilans réactionnels plus précis, les quantités des principaux sucres devraient être mesurées tout au long de la fermentation, ainsi que celles des acides organiques. Pour cette partie, le choix d'une matrice modèle était nécessaire pour étudier plusieurs paramètres de culture, à différents niveaux, selon un plan d'expérience, mais a eu pour conséquence une étude moins approfondie des autres matrices. Comme le montrent les résultats, chaque sous-produit devra être traité séparément et les conditions de culture devront être spécifiques. Ceci nécessite d'alléger le nombre de paramètres considérés.

Dans les conditions testées, les résultats n'ont pas montré la production significative de molécules d'intérêt en fermentation spontanée. Afin de « booster » la fermentation, la seconde partie du projet s'est concentrée sur la production d'acide L-lactique à partir de pulpe de carottes, en ajoutant un microorganisme sélectionné au préalable à partir de cette matrice. La souche sélectionnée, *Lactobacillus paracasei* A1L, est bien capable de produire spécifiquement cet acide, dans des quantités trois fois plus importantes qu'en fermentation spontanée (soit une concentration maximale obtenue de 0,974 g/L après 48h de fermentation), et de se développer à partir de ce sous-produit. Toutefois, les quantités produites restent trop faibles pour envisager une application à court terme. Deux points restent à optimiser. Le premier devra l'être à court terme. La méthode d'ensemencement devra être standardisée de façon plus fine afin de s'assurer que la quantité de microorganismes ajoutée est constante. De plus, la variabilité dans les quantités de bactéries ensemencées n'a pas permis un traitement robuste des résultats par le plan d'expérience D-optimal, car les niveaux n'ont pas été respectés. La condition optimale n'a pas pu être déterminée. Si les essais étaient répétés, ils devraient prendre en compte l'ajustement de cette condition ainsi que le contrôle du pH à une valeur proche de la neutralité au cours du temps. En parallèle, des modifications du génome du *Lactobacillus* pourraient permettre d'améliorer les rendements. L'ajout de sucre en début de fermentation et d'une source azotée supplémentaire a également été évoqué. A long terme, l'objectif est d'atteindre des quantités

Conclusion

satisfaisantes pour envisager une production industrielle. L'étude prospective menée par ISARA-conseil pour analyser le marché de l'acide lactique devrait également permettre d'évaluer les attentes économiques liées à ce produit. A terme, elle pourrait également identifier des partenaires industriels ayant une expertise dans sa production et son utilisation, et intéressés pour le produire via de la fermentation de sous-produits végétaux.

Parmi les essais menés dans le cadre de projets annexes, la compréhension des métabolismes producteurs de phényl-éthyl alcool, et la récupération d'énergie par production de chaleur dans un fermenteur pilote à chambres adiabatiques semblent être les plus prometteuses. Les expérimentations devraient se poursuivre. A ce stade, la thèse a permis d'enrichir les connaissances scientifiques sur la fermentation de sous-produits végétaux et de tester l'influence de plusieurs paramètres de culture sur l'évolution des écosystèmes. Des pistes ont été proposées afin de toujours améliorer les méthodes utilisées et de mettre en avant certaines limites. D'un point de vue applicatif, il semble indispensable de restituer l'ensemble des résultats aux partenaires industriels afin que chacun puisse réorienter ses attentes et co-construire la suite du projet. Ceci devrait être réalisé dans les prochains mois.

Le projet ValPro a été construit autour d'une problématique globale de recyclage des sous-produits, et plus particulièrement de la valorisation des sous-produits végétaux issus de l'industrie agroalimentaire. La recherche de voies de valorisation répond aux enjeux scientifiques et technologiques, afin de réduire les pertes, voire d'augmenter les gains liés à la production de molécules ayant une valeur ajoutée. A l'échelle mondiale, les volumes générés ne sont pas négligeables et représentaient en 2007, pour les sous-produits végétaux (post-culture), environ 400 millions de tonnes. Pour les industriels du projet les quantités peuvent aller de 140 t/an à 4000 t/an. Cette thèse a été financé par le fond de dotation TERRA-ISARA qui soutient des projets de recherche en lien avec la préservation des ressources, et particulièrement des ressources agricoles, la production d'aliments sains et les problématiques de développement durable. C'est dans ce contexte que les orientations de la thèse ont été définies, en accord avec les entreprises Charles et Alice, Philibert Savours, Pierre Martinet, Panzani et Florette qui se sont investies individuellement. D'un point de vue scientifique, les études comme celle-ci permettent d'enrichir les connaissances spécifiques à chaque sous-produit végétal. Comme le montrent les résultats, les propriétés physico-chimiques, biochimiques et biologiques peuvent varier. De plus, la nature des molécules d'intérêt à produire et les métabolismes conduisant à leur obtention étant différents, plus les études se multiplieront, plus les données disponibles permettront d'optimiser les processus de production.

- Abbasi, H., Hamedj, M.M., Lotfabad, T.B., Zahiri, H.S., Sharafi, H., Masoomi, F., Moosavi-Movahedi, A.A., Ortiz, A., Amanlou, M., Noghabi, K.A., 2012. Biosurfactant-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MA01 isolated from spoiled apples: Physicochemical and structural characteristics of isolated biosurfactant. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 113, 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.10.002>
- Abdel-Rahman, M.A., Tashiro, Y., Sonomoto, K., 2013. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances* 31, 877–902. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.04.002>
- Abu Yazid, N., Barrena, R., Komilis, D., Sánchez, A., 2017. Solid-State Fermentation as a Novel Paradigm for Organic Waste Valorization: A Review. *Sustainability* 9, 224. <https://doi.org/10.3390/su9020224>
- Ademe, 2019. Déchets, chiffres clés, l'essentiel 2018.
- Adler, P., Hugen, T., Wiewiora, M., Kunz, B., 2011. Modeling of an integrated fermentation/membrane extraction process for the production of 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate. *Enzyme and Microbial Technology* 48, 285–292. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.12.003>
- Aimaretti, N.R., Clementz, A.L., Codevilla, A., Rojas, M.L., Yori, J.C., 2013. Sustainable fermentation processing of two revalorized agro-industrial discards: carrot and brewer's yeast. *International Journal of Energy and Environmental Engineering* 4, 24. <https://doi.org/10.1186/2251-6832-4-24>
- Aimaretti, N.R., Ybalo, C.V., Rojas, M.L., Plou, F.J., Yori, J.C., 2012. Production of bioethanol from carrot discards. *Bioresource Technology* 123, 727–732. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.035>
- Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., Kuipers, O.P., 2016. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100, 2939–2951. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7343-9>
- Alves de Oliveira, R., Komesu, A., Vaz Rossell, C.E., Maciel Filho, R., 2018. Challenges and opportunities in lactic acid bioprocess design—From economic to production aspects. *Biochemical Engineering Journal* 133, 219–239. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.03.003>
- Anses, 2017. Ciqual Table de composition nutritionnelle des aliments. URL <https://ciqual.anses.fr/#/cms/mentions-legales/node/22> (consulté le 12.10.19).
- Aponte, M., Blaiotta, G., La Croce, F., Mazzaglia, A., Farina, V., Settanni, L., Moschetti, G., 2012. Use of selected autochthonous lactic acid bacteria for Spanish-style table olive fermentation. *Food Microbiology* 30, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.10.005>
- Arnous, A., Meyer, A.S., 2008. Comparison of methods for compositional characterization of grape (*Vitis vinifera* L.) and apple (*Malus domestica*) skins. *Food and Bioprocess Processing* 86, 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2008.03.004>
- Arroyo-López, F.N., Bautista-Gallego, J., Domínguez-Manzano, J., Romero-Gil, V., Rodríguez-Gómez, F., García-García, P., Garrido-Fernández, A., Jiménez-Díaz, R., 2012. Formation of lactic acid bacteria–yeasts communities on the olive surface during Spanish-style Manzanilla fermentations. *Food Microbiology* 32, 295–301. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.07.003>
- Badel, S., Bernardi, T., Michaud, P., 2011. New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnology Advances* 29, 54–66. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.08.011>
- Balet, J.-M., 2016. Gestion des déchets.
- Banerjee, J., Singh, R., Vijayaraghavan, R., MacFarlane, D., Patti, A.F., Arora, A., 2017. Bioactives from fruit processing wastes: Green approaches to valuable chemicals. *Food Chemistry* 225, 10–22. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.093>
- Bartowsky, E.J., Henschke, P.A., 2004. The 'buttery' attribute of wine—diacetyl—desirability, spoilage and beyond. *International Journal of Food Microbiology* 96, 235–252. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.013>

- Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., Barrio, E., Querol, A., Garrido-Fernández, A., Arroyo-López, F.N., 2011. Exploring the yeast biodiversity of green table olive industrial fermentations for technological applications. *International Journal of Food Microbiology* 147, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.013>
- Beney, L., Gervais, P., 2001. Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57, 34–42. <https://doi.org/10.1007/s002530100754>
- Berg, G., Smalla, K., 2009. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere: Plant species, soil type and rhizosphere communities. *FEMS Microbiology Ecology* 68, 1–13. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00654.x>
- Bernalier-Donadille, A., 2010. Fermentative metabolism by the human gut microbiota. *Gastroentérologie Clinique et Biologique* 34, S16–S22. [https://doi.org/10.1016/S0399-8320\(10\)70016-6](https://doi.org/10.1016/S0399-8320(10)70016-6)
- Bertrand, J.-C., 2012. *Écologie microbienne : microbiologie des milieux naturels et anthropisés*. Presses universitaires de Pau et des Pays de l'Adour, Pau.
- Besancenot, J.-M., Lemétayer, J.-M., Mérellot, J.-M., Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie (France), Institut de l'élevage (France), 2000. *Les Coproduits d'origine végétale des industries agroalimentaires : Leur valorisation en alimentation animale et leur place dans les circuits courts industries-éleveurs*. ADEME, Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie, Paris.
- Beuchat, L.R., 2002. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes Infect.* 4, 413–423.
- Bhattacharyya, P.N., Jha, D.K., 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28, 1327–1350. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>
- Björkroth, J., Koort, J., 2016. Lactic Acid Bacteria: Taxonomy and Biodiversity, in: *Reference Module in Food Science*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00864-7>
- Blaesen, M., Friehs, K., Flaschel, E., 2007. Recycling of bacterial biomass in a process of l-threonine production by means of a recombinant strain of *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 132, 431–437. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.08.011>
- Bolaji, I.O., Dionisi, D., 2017. Acidogenic fermentation of vegetable and salad waste for chemicals production: Effect of pH buffer and retention time. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 5, 5933–5943. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.11.001>
- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J.C., Gerds, M.L., Hammes, W.P., Harnett, J., Huys, G., Laulund, S., Ouwehand, A., Powell, I.B., Prajapati, J.B., Seto, Y., Ter Schure, E., Van Boven, A., Vankerckhoven, V., Zgoda, A., Tuijelaars, S., Hansen, E.B., 2012. Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology* 154, 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.030>
- Bouton, Y., Grappin, R., 1995. Comparaison de la qualité de fromages à pâte pressée cuite fabriqués à partir de lait cru ou microfiltré. *Le Lait* 75, 31–44.
- Bringel, F., Quénéé, P., Tailliez, P., 2001. Polyphasic Investigation of the Diversity within *Lactobacillus plantarum* Related Strains Revealed Two *L. plantarum* subgroups. *Systematic and Applied Microbiology* 24, 561–571. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00061>
- Campos, J.M., Montenegro Stamford, T.L., Sarubbo, L.A., de Luna, J.M., Rufino, R.D., Banat, I.M., 2013. Microbial biosurfactants as additives for food industries. *Biotechnology Progress* 29, 1097–1108. <https://doi.org/10.1002/btpr.1796>
- Caponigro, V., Ventura, M., Chiancone, I., Amato, L., Parente, E., Piro, F., 2010. Variation of microbial load and visual quality of ready-to-eat salads by vegetable type, season, processor and retailer. *Food Microbiology* 27, 1071–1077. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.011>

- Capozzi, V., Fiocco, D., Spano, G., 2011. Responses of Lactic Acid Bacteria to Cold Stress, in: Tsakalidou, E., Papadimitriou, K. (Eds.), Stress Responses of Lactic Acid Bacteria. Springer US, Boston, MA, pp. 91–110. https://doi.org/10.1007/978-0-387-92771-8_5
- Casado, A., Alvarez, A., Gonzalez, L., Fernandez, D., L. Marcos, J., E. Tornadijo, M., 2017. Effect of fermentation on microbiological, physicochemical and physical characteristics of sourdough and impact of its use on bread quality. Czech Journal of Food Sciences 35, 496–506. <https://doi.org/10.17221/68/2017-CJFS>
- Cebulj, A., Cunja, V., Mikulic-Petkovsek, M., Veberic, R., 2017. Importance of metabolite distribution in apple fruit. Scientia Horticulturae 214, 214–220. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.11.048>
- Chaisu, K., Charles, A.L., Guu, Y.-K., Yen, T.-B., Chiu, C.-H., 2014. Optimization Lactic Acid Production from Molasses Renewable Raw Material through Response Surface Methodology with *Lactobacillus Casei* M-15. APCBEE Procedia 8, 194–198. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2014.03.026>
- Chantaro, P., Devahastin, S., Chiewchan, N., 2008. Production of antioxidant high dietary fiber powder from carrot peels. LWT - Food Science and Technology 41, 1987–1994. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.11.013>
- Charalampopoulos, D., Wang, R., Pandiella, S.S., Webb, C., 2002. Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. International Journal of Food Microbiology 79, 131–141. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00187-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00187-3)
- Chen, G., Chen, C., Lei, Z., 2017. Meta-omics insights in the microbial community profiling and functional characterization of fermented foods. Trends in Food Science & Technology 65, 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.05.002>
- Chen, H., 2006. Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. Genes & Development 20, 1150–1161. <https://doi.org/10.1101/gad.1411806>
- Chmielewski, R.A.N., Frank, J.F., 2003. Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 2, 22–32. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00012.x>
- Cho, E.-H., Jung, H.-T., Lee, B.-H., Kim, H.-S., Rhee, J.-K., Yoo, S.-H., 2019. Green process development for apple-peel pectin production by organic acid extraction. Carbohydrate Polymers 204, 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.09.086>
- Christiansen, J.K., Hughes, J.E., Welker, D.L., Rodríguez, B.T., Steele, J.L., Broadbent, J.R., 2008. Phenotypic and Genotypic Analysis of Amino Acid Auxotrophy in *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32. Applied and Environmental Microbiology 74, 416–423. <https://doi.org/10.1128/AEM.01174-07>
- Cizeikiene, D., Juodeikiene, G., Damasius, J., 2018. Use of wheat straw biomass in production of L-lactic acid applying biocatalysis and combined lactic acid bacteria strains belonging to the genus *Lactobacillus*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 15, 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.06.015>
- Code de l'environnement - Légifrance, n.d. URL https://www.legifrance.gouv.fr/codes/texte_lc/LEGITEXT000006074220/2020-11-09/ (Consulté le 11.9.20).
- Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P., 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nature Reviews Microbiology 3, 777–788. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1273>
- Couto, S.R., Sanromán, M.Á., 2006. Application of solid-state fermentation to food industry—A review. Journal of Food Engineering 76, 291–302. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.05.022>
- Critzer, F.J., Doyle, M.P., 2010. Microbial ecology of foodborne pathogens associated with produce. Current Opinion in Biotechnology 21, 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.01.006>
- D'Amico, S., Collins, T., Marx, J.-C., Feller, G., Gerday, C., 2006. Psychrophilic microorganisms: challenges for life. EMBO reports 7, 385–389. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400662>

- De Angelis, M., Gobbetti, M., 2011. Stress Responses of Lactobacilli, in: Tsakalidou, E., Papadimitriou, K. (Eds.), Stress Responses of Lactic Acid Bacteria. Springer US, Boston, MA, pp. 219–249. https://doi.org/10.1007/978-0-387-92771-8_11
- Deguchi, Y., Morishita, T., 1992. Nutritional Requirements in Multiple Auxotrophic Lactic Acid Bacteria: Genetic Lesions Affecting Amino Acid Biosynthetic Pathways in *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium*, and *Pediococcus acidilactici*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 56, 913–918. <https://doi.org/10.1271/bbb.56.913>
- 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. International Journal of Food Science & Technology 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 Microbiology 33, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.003>
- Di Cagno, R., Minervini, G., Rizzello, C.G., De Angelis, M., Gobbetti, M., 2011. Effect of lactic acid fermentation on antioxidant, texture, color and sensory properties of red and green smoothies. Food Microbiology 28, 1062–1071. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.02.011>
- Di Cagno, R., Surico, R.F., Siragusa, S., De Angelis, M., Paradiso, A., Minervini, F., De Gara, L., Gobbetti, M., 2008. Selection and use of autochthonous mixed starter for lactic acid fermentation of carrots, French beans or marrows. International Journal of Food Microbiology 127, 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.07.010>
- Diaz, A.B., Blandino, A., Caro, I., 2018. Value added products from fermentation of sugars derived from agro-food residues. Trends in Food Science & Technology 71, 52–64. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.10.016>
- Drider, D., Prévost, H. (Eds.), 2009. Bactéries lactiques : physiologie, métabolisme, génomique et applications industrielles. Economica, Paris.
- Duncan, S.H., Scott, K.P., Ramsay, A.G., Harmsen, H.J.M., Welling, G.W., Stewart, C.S., Flint, H.J., 2003. Effects of Alternative Dietary Substrates on Competition between Human Colonic Bacteria in an Anaerobic Fermentor System. Applied and Environmental Microbiology 69, 1136–1142. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.2.1136-1142.2003>
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Ricci, A., Allende, A., Bolton, D., Chemaly, M., Davies, R., Girones, R., Herman, L., Koutsoumanis, K., Lindqvist, R., Nørrung, B., Robertson, L., Ru, G., Sanaa, M., Simmons, M., Skandamis, P., Snary, E., Speybroeck, N., Ter Kuile, B., Threlfall, J., Wahlström, H., Coconcelli, P.S., Klein, G., Prieto Maradona, M., Querol, A., Peixe, L., Suarez, J.E., Sundh, I., Vlaskovic, J.M., Aguilera-Gómez, M., Barizzone, F., Brozzi, R., Correia, S., Heng, L., Istace, F., Lythgo, C., Fernández Escámez, P.S., 2017. Scientific Opinion on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA†. EFSA Journal 15. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4664>
- Ercolini, D., Pontonio, E., De Filippis, F., Minervini, F., La Stora, A., Gobbetti, M., Di Cagno, R., 2013. Microbial Ecology Dynamics during Rye and Wheat Sourdough Preparation. Applied and Environmental Microbiology 79, 7827–7836. <https://doi.org/10.1128/AEM.02955-13>
- Eş, I., Mousavi Khaneghah, A., Barba, F.J., Saraiva, J.A., Sant’Ana, A.S., Hashemi, S.M.B., 2018. Recent advancements in lactic acid production - a review. Food Research International 107, 763–770. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.001>
- Etschmann, M.M.W., Sell, D., Schrader, J., 2003. Screening of yeasts for the production of the aroma compound 2-phenylethanol in a molasses-based medium. Biotechnology Letters 25, 531–536. <https://doi.org/10.1023/A:1022890119847>
- Fabre, C.E., Blanc, P.J., Goma, G., 1998. Production of 2-Phenylethyl Alcohol by *Kluyveromyces marxianus*. Biotechnology Progress 14, 270–274. <https://doi.org/10.1021/bp9701022>
- Falovo, C., Roupheal, Y., Cardarelli, M., Rea, E., Battistelli, A., Colla, G., 2009. Yield and quality of leafy lettuce in response to nutrient solution composition and growing season. Journal of Food, Agriculture and Environment 7, 456–462.

- Fan, L., Hansen, L., 2012. Fermentation and Biopreservation of Plant- Based Foods with Lactic Acid Bacteria, in: Handbook of Plant-Based Fermented Food and Beverage Technology, Second Edition. CRC Press, pp. 35–48. <https://doi.org/10.1201/b12055-5>
- FAO, 2013. Food wastage footprint. Impacts on natural resources. Summary report. FAO 1–63.
- Fernández Ramírez, M.D., Smid, E.J., Abee, T., Nierop Groot, M.N., 2015. Characterisation of biofilms formed by *Lactobacillus plantarum* WCFS1 and food spoilage isolates. International Journal of Food Microbiology 207, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.030>
- Filannino, P., Bai, Y., Di Cagno, R., Gobbetti, M., Gänzle, M.G., 2015. Metabolism of phenolic compounds by *Lactobacillus* spp. during fermentation of cherry juice and broccoli puree. Food Microbiology 46, 272–279. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.08.018>
- Filannino, P., Di Cagno, R., Gobbetti, M., 2018. Metabolic and functional paths of lactic acid bacteria in plant foods: get out of the labyrinth. Current Opinion in Biotechnology 49, 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.07.016>
- Filip, M., Vlassa, M., Coman, V., Halmagyi, A., 2016. Simultaneous determination of glucose, fructose, sucrose and sorbitol in the leaf and fruit peel of different apple cultivars by the HPLC–RI optimized method. Food Chemistry 199, 653–659. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.060>
- Fonty, G., Bernalier-Donadille, A., Forano, E., Mosoni, P., 2019. Consommation et digestion des végétaux : rôles des microbiotes et fonctions essentielles à la biodiversité.
- Gaggia, F., Di Gioia, D., Baffoni, L., Biavati, B., 2011. The role of protective and probiotic cultures in food and feed and their impact in food safety. Trends in Food Science & Technology 22, S58–S66. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.03.003>
- Gänzle, M., Ripari, V., 2016. Composition and function of sourdough microbiota: From ecological theory to bread quality. International Journal of Food Microbiology 239, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.004>
- Gänzle, M.G., 2015a. Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. Current Opinion in Food Science 2, 106–117. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.03.001>
- Gänzle, M.G., 2015b. Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. Current Opinion in Food Science 2, 106–117. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.03.001>
- Gänzle, M.G., Vermeulen, N., Vogel, R.F., 2007. Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. Food Microbiology 24, 128–138. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.07.006>
- Gardner, N.J., Savard, T., Obermeier, P., Caldwell, G., Champagne, C.P., 2001. Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage, beet and onion vegetable mixtures. Int. J. Food Microbiol. 64, 261–275.
- Gemelas, L., Degraeve, P., Demarigny, Y., 2014. The Citrate Metabolism in Homo- and Heterofermentative LAB: A Selective Means of Becoming Dominant over Other Microorganisms in Complex Ecosystems. Food and Nutrition Sciences 05, 953–969. <https://doi.org/10.4236/fns.2014.510106>
- Gemelas, L., Rigobello, V., Ly-Chatain, M.H., Demarigny, Y., 2013. Selective *Lactococcus* Enumeration in Raw Milk. Food and Nutrition Sciences 04, 49–58. <https://doi.org/10.4236/fns.2013.49A2008>
- Geys, R., Soetaert, W., Van Bogaert, I., 2014. Biotechnological opportunities in biosurfactant production. Current Opinion in Biotechnology 30, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.06.002>
- Giraffa, G., Chanishvili, N., Widyastuti, Y., 2010. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. Research in Microbiology 161, 480–487. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.03.001>

- Gnanoubesse, N., Audinet, N., Barre, L., Cauquil, A., Cornu, M., Colin, P., 2006. Effect of the inoculum size on *Listeria monocytogenes* growth in structured media. *International Journal of Food Microbiology* 110, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.03.002>
- Guiraud, J.P., 2012. *Microbiologie alimentaire*. Dunod, Paris.
- Guo, D., Zhang, L., Kong, S., Liu, Z., Li, X., Pan, H., 2018. Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for Production of 2-Phenylethanol and 2-Phenylethyl Acetate from Glucose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66, 5886–5891. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01594>
- Güzel, M., Akpınar, Ö., 2019. Valorisation of fruit by-products: Production characterization of pectins from fruit peels. *Food and Bioproducts Processing* 115, 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.03.009>
- Hammes, W.P., Hertel, C., 2006. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*, in: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes*. Springer US, New York, NY, pp. 320–403. https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3_10
- Hua, D., Xu, P., 2011. Recent advances in biotechnological production of 2-phenylethanol. *Biotechnology Advances* 29, 654–660. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.001>
- Huang, C.-H., Li, S.-W., Huang, L., Watanabe, K., 2018. Identification and Classification for the *Lactobacillus casei* Group. *Front. Microbiol.* 9, 1974. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01974>
- Hujanen, M., Linko, Y.-Y., 1996. Effect of temperature and various nitrogen sources on L (+)-lactic acid production by *Lactobacillus casei*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45, 307–313. <https://doi.org/10.1007/s002530050688>
- Hutkins, R.W., 2006. *Microbiology and technology of fermented foods*, 1st ed. ed, IFT Press series. IFT Press ; Blackwell Pub, [Chicago, Ill. ?] : Ames, Iowa.
- Idris, A., Suzana, W., 2006. Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochemistry* 41, 1117–1123. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.12.002>
- Ivey, M., Massel, M., Phister, T.G., 2013. Microbial Interactions in Food Fermentations. *Annual Review of Food Science and Technology* 4, 141–162. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101219>
- Jawad, A.H., Alkarkhi, A.F.M., Jason, O.C., Easa, A.M., Nik Norulaini, N.A., 2013. Production of the lactic acid from mango peel waste – Factorial experiment. *Journal of King Saud University - Science* 25, 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2012.04.001>
- Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A., 2005. *Modern food microbiology*, 7th ed. ed, Food science text series. Springer, New York.
- John, R.P., Nampoothiri, K.M., Pandey, A., 2007a. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74, 524–534. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0779-6>
- John, R.P., Nampoothiri, K.M., Pandey, A., 2006. Solid-state fermentation for l-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochemistry* 41, 759–763. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.09.013>
- John, R.P., Sukumaran, R.K., Nampoothiri, K.M., Pandey, A., 2007b. Statistical optimization of simultaneous saccharification and l(+)-lactic acid fermentation from cassava bagasse using mixed culture of lactobacilli by response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal* 36, 262–267. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.02.028>
- Juvonen, R., Honkapää, K., Maina, N.H., Shi, Q., Viljanen, K., Maaheimo, H., Virkki, L., Tenkanen, M., Lantto, R., 2015. The impact of fermentation with exopolysaccharide producing lactic acid bacteria on rheological, chemical and sensory properties of pureed carrots (*Daucus carota* L.). *International Journal of Food Microbiology* 207, 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.031>

- Kesmen, Z., Kacmaz, N., 2011. Determination of Lactic Microflora of Kefir Grains and Kefir Beverage by Using Culture-Dependent and Culture-Independent Methods. *Journal of Food Science* 76, M276–M283. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02191.x>
- Kim, B., Cho, B.-R., Hahn, J.-S., 2014. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of 2-phenylethanol via Ehrlich pathway: 2-Phenylethanol Production in *S. cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering* 111, 115–124. <https://doi.org/10.1002/bit.24993>
- Kim, T.-Y., Lee, S.-W., Oh, M.-K., 2014. Biosynthesis of 2-phenylethanol from glucose with genetically engineered *Kluyveromyces marxianus*. *Enzyme and Microbial Technology* 61–62, 44–47. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.04.011>
- Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O.P., Leer, R., Turchini, R., Peters, S.A., Sandbrink, H.M., Fiers, M.W.E.J., Stiekema, W., Lankhorst, R.M.K., Bron, P.A., Hoffer, S.M., Groot, M.N.N., Kerkhoven, R., de Vries, M., Ursing, B., de Vos, W.M., Siezen, R.J., 2003. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 1990–1995. <https://doi.org/10.1073/pnas.0337704100>
- Knief, C., Delmotte, N., Chaffron, S., Stark, M., Innerebner, G., Wassmann, R., von Mering, C., Vorholt, J.A., 2012. Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice. *The ISME Journal* 6, 1378–1390. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.192>
- Kowalska, H., Czajkowska, K., Cichowska, J., Lenart, A., 2017. What's new in biopotential of fruit and vegetable by-products applied in the food processing industry. *Trends in Food Science & Technology* 67, 150–159. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.016>
- Kubota, H., Senda, S., Nomura, N., Tokuda, H., Uchiyama, H., 2008. Biofilm Formation by Lactic Acid Bacteria and Resistance to Environmental Stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 106, 381–386. <https://doi.org/10.1263/jbb.106.381>
- Kwan, T.H., Hu, Y., Lin, C.S.K., 2018. Techno-economic analysis of a food waste valorisation process for lactic acid, lactide and poly(lactic acid) production. *Journal of Cleaner Production* 181, 72–87. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.01.179>
- Laufenberg, G., Kunz, B., Nystroem, M., 2003. Transformation of vegetable waste into value added products: *Bioresource Technology* 87, 167–198. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00167-0](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00167-0)
- Liu, M., Bayjanov, J.R., Renckens, B., Nauta, A., Siezen, R.J., 2010. The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. *BMC Genomics* 11, 36. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-36>
- LOI n° 2020-105 du 10 février 2020 relative à la lutte contre le gaspillage et à l'économie circulaire (1) - Légifrance, n.d. URL <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000041553759/> (accessed 11.6.20).
- Lonsane, B.K., Saucedo-Castaneda, G., Raimbault, M., Roussos, S., Viniegra-Gonzalez, G., Ghildyal, N.P., Ramakrishna, M., Krishnaiah, M.M., 1992. Scale-up strategies for solid state fermentation systems. *Process Biochemistry* 27, 259–273. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(92\)85011-P](https://doi.org/10.1016/0032-9592(92)85011-P)
- López-Gómez, J.P., Alexandri, M., Schneider, R., Venus, J., 2018. A review on the current developments in continuous lactic acid fermentations and case studies utilising inexpensive raw materials. *Process Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.12.012>
- Lund, B.M., 1992. Ecosystems in vegetable foods. *Journal of Applied Bacteriology* 73, 115s–126s. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1992.tb03631.x>
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D.M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J.-H., Diaz-Muniz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G., Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O'Sullivan, D., Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, S., Weimer, B., Mills, D., 2006.

- Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 15611–15616. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607117103>
- Manini, F., Casiraghi, M.C., Poutanen, K., Brasca, M., Erba, D., Plumed-Ferrer, C., 2016. Characterization of lactic acid bacteria isolated from wheat bran sourdough. *LWT - Food Science and Technology* 66, 275–283. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.045>
- Marti, A., Torri, L., Casiraghi, M.C., Franzetti, L., Limbo, S., Morandin, F., Quaglia, L., Pagani, M.A., 2014. Wheat germ stabilization by heat-treatment or sourdough fermentation: Effects on dough rheology and bread properties. *LWT - Food Science and Technology* 59, 1100–1106. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.039>
- Martins, S., Mussatto, S.I., Martínez-Avila, G., Montañez-Saenz, J., Aguilar, C.N., Teixeira, J.A., 2011. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances* 29, 365–373. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.008>
- Massini, L., Rico, D., Belen Martín Diana, A., Barry-Ryan, C., 2013. Valorisation of Apple Peels. <https://doi.org/10.21427/D7R32T>
- Mendes, R., Garbeva, P., Raaijmakers, J.M., 2013. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews* 37, 634–663. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12028>
- Miguel, M.G. da C.P., Reis, L.V. de C., Efraim, P., Santos, C., Lima, N., Schwan, R.F., 2017. Cocoa fermentation: Microbial identification by MALDI-TOF MS, and sensory evaluation of produced chocolate. *LWT - Food Science and Technology* 77, 362–369. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.076>
- Mokoena, M.P., 2017. Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. *Molecules* 22, 1255. <https://doi.org/10.3390/molecules22081255>
- Moletta, R., Guillou, M., 2013. *Le traitement des déchets*. Éd. Tec & doc : Lavoisier, Paris.
- Montet, D., Ray, R.C., Zakhia-Rozis, N., 2014. Lactic Acid Fermentation of Vegetables and Fruits. <https://doi.org/10.13140/2.1.2374.1127>
- Moon, S.-K., Wee, Y.-J., Choi, G.-W., 2012. A novel lactic acid bacterium for the production of high purity l-lactic acid, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CHB2121. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 114, 155–159. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.03.016>
- Morishita, T., Deguchi, Y., Yajima, M., Sakurai, T., Yura, T., 1981. Multiple nutritional requirements of lactobacilli: genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways. *J. Bacteriol.* 148, 64–71.
- Nalini, S., Parthasarathi, R., 2018. Optimization of rhamnolipid biosurfactant production from *Serratia rubidaea* SNAU02 under solid-state fermentation and its biocontrol efficacy against *Fusarium* wilt of eggplant. *Annals of Agrarian Science* 16, 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.aasci.2017.11.002>
- Narayanan, N., Roychoudhury, P.K., Srivastava, A., 2004. L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology* 7. <https://doi.org/10.2225/vol7-issue2-fulltext-7>
- Nascimento, M.S., Silva, N., Catanozi, M.P.L.M., Silva, K.C., 2003. Effects of Different Disinfection Treatments on the Natural Microbiota of Lettuce. *Journal of Food Protection* 66, 1697–1700. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.9.1697>
- Olsen, M.J., Pérez-Díaz, I.M., 2009. Influence of Microbial Growth on the Redox Potential of Fermented Cucumbers. *Journal of Food Science* 74, M149–M153. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01121.x>
- Olstorpe, M., Axelsson, L., Schnitzler, J., Passoth, V., 2010. Effect of starter culture inoculation on feed hygiene and microbial population development in fermented pig feed composed of a cereal grain mix with wet wheat distillers' grain: Starter culture in feed fermentation. *Journal of Applied Microbiology* 108, 129–138. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04399.x>

- Ordonnance n° 2010-1579 du 17 décembre 2010 portant diverses dispositions d'adaptation au droit de l'Union européenne dans le domaine des déchets, n.d.
- Ortolani, M.B., Viçosa, G.N., Beloti, V., Nero, L.A., 2007. Screening and enumeration of lactic acid bacteria in milk using three different culture media in Petrifilm™ Aerobic Count plates and conventional pour plate methodology. *Journal of Dairy Research* 74, 387–391. <https://doi.org/10.1017/S002202990700266X>
- O'Sullivan, L., Ross, R.P., Hill, C., 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie* 84, 593–604. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(02\)01457-8](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(02)01457-8)
- Özcelik, S., Kuley, E., Özogul, F., 2016. Formation of lactic, acetic, succinic, propionic, formic and butyric acid by lactic acid bacteria. *LWT - Food Science and Technology* 73, 536–542. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.066>
- Panda, S.K., Mishra, S.S., Kayitesi, E., Ray, R.C., 2016. Microbial-processing of fruit and vegetable wastes for production of vital enzymes and organic acids: Biotechnology and scopes. *Environmental Research* 146, 161–172. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.12.035>
- Panesar, P., Kennedy, J., Gandhi, D., Bunko, K., 2007. Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry* 105, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.035>
- Panesar, P.S., Kennedy, J.F., Knill, C.J., Kosseva, M., 2010. Production of L(+) lactic acid using *Lactobacillus casei* from whey. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53, 219–226. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132010000100027>
- Papalexandratou, Z., Lefeber, T., Bahrim, B., Lee, O.S., Daniel, H.-M., De Vuyst, L., 2013. *Hanseniaspora opuntiae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum*, and *Acetobacter pasteurianus* predominate during well-performed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these microbial species for a successful cocoa bean fermentation process. *Food Microbiology* 35, 73–85. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.02.015>
- Park, E.-J., Chun, J., Cha, C.-J., Park, W.-S., Jeon, C.O., Bae, J.-W., 2012. Bacterial community analysis during fermentation of ten representative kinds of kimchi with barcoded pyrosequencing. *Food Microbiology* 30, 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.10.011>
- Peng, Q., Jiang, S., Chen, J., Ma, C., Huo, D., Shao, Y., Zhang, J., 2018. Unique Microbial Diversity and Metabolic Pathway Features of Fermented Vegetables From Hainan, China. *Frontiers in Microbiology* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00399>
- Pescuma, M., Hébert, E.M., Mozzi, F., Font de Valdez, G., 2008. Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: Evolution of carbohydrates and protein content. *Food Microbiology* 25, 442–451. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.01.007>
- Petrova, P., Petrov, K., 2012. Direct starch conversion into L-(+)-lactic acid by a novel amylolytic strain of *Lactobacillus paracasei* B41. *Starch/Stärke* 64, 10–17. <https://doi.org/10.1002/star.201100074>
- Plazzotta, S., Calligaris, S., Manzocco, L., 2018a. Application of different drying techniques to fresh-cut salad waste to obtain food ingredients rich in antioxidants and with high solvent loading capacity. *LWT* 89, 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.056>
- Plazzotta, S., Manzocco, L., 2018. Effect of ultrasounds and high pressure homogenization on the extraction of antioxidant polyphenols from lettuce waste. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 50, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.10.004>
- Plazzotta, S., Manzocco, L., Nicoli, M.C., 2017. Fruit and vegetable waste management and the challenge of fresh-cut salad. *Trends in Food Science & Technology* 63, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.013>
- Plazzotta, S., Sillani, S., Manzocco, L., 2018b. Exploitation of lettuce waste flour to increase bread functionality: effect on physical, nutritional, sensory properties and on consumer response. *International Journal of Food Science & Technology* 53, 2290–2297. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13820>
- Pleissner, D., Qi, Q., Gao, C., Rivero, C.P., Webb, C., Lin, C.S.K., Venus, J., 2016. Valorization of organic residues for the production of added value chemicals: A contribution to the bio-based

- economy. *Biochemical Engineering Journal* 116, 3–16. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.12.016>
- Prückler, M., Lorenz, C., Endo, A., Kraler, M., Dürrschmid, K., Hendriks, K., Soares da Silva, F., Auterith, E., Kneifel, W., Michlmayr, H., 2015a. Comparison of homo- and heterofermentative lactic acid bacteria for implementation of fermented wheat bran in bread. *Food Microbiology* 49, 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.02.014>
- Prückler, M., Lorenz, C., Endo, A., Kraler, M., Dürrschmid, K., Hendriks, K., Soares da Silva, F., Auterith, E., Kneifel, W., Michlmayr, H., 2015b. Comparison of homo- and heterofermentative lactic acid bacteria for implementation of fermented wheat bran in bread. *Food Microbiology* 49, 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.02.014>
- Ramade, F., 2008. Dictionnaire encyclopédique des sciences de la nature et de la biodiversité.
- Risse, J.M., Friehs, K., Flaschel, E., 2001. Recycling of Biomass Resulting from Fermentation Processes with *Bacillus licheniformis*. *Engineering in Life Sciences* 1, 141. [https://doi.org/10.1002/1618-2863\(200110\)1:4<141::AID-ELSC141>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/1618-2863(200110)1:4<141::AID-ELSC141>3.0.CO;2-H)
- Rivera-Espinoza, Y., Gallardo-Navarro, Y., 2010. Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology* 27, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.06.008>
- Rizo, J., Guillén, D., Farrés, A., Díaz-Ruiz, G., Sánchez, S., Wachter, C., Rodríguez-Sanoja, R., 2020. Omics in traditional vegetable fermented foods and beverages. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 60, 791–809. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1551189>
- Rizzello, C.G., Coda, R., Wang, Y., Verni, M., Kajala, I., Katina, K., Laitila, A., 2018. Characterization of indigenous *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc kimchii*, *Weissella cibaria* and *Weissella confusa* for faba bean bioprocessing. *International Journal of Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.014>
- Rodgers, S., 2001. Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures—a review. *Trends in Food Science & Technology* 12, 276–284. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00093-0](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00093-0)
- Rodrigues, C., Vandenberghe, L.P.S., Woiciechowski, A.L., de Oliveira, J., Letti, L.A.J., Soccol, C.R., 2017. Production and Application of Lactic Acid, in: *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, pp. 543–556. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63662-1.00024-5>
- Rodríguez Couto, S., 2008. Exploitation of biological wastes for the production of value-added products under solid-state fermentation conditions. *Biotechnology Journal* 3, 859–870. <https://doi.org/10.1002/biot.200800031>
- Roissart, H. de (Ed.), 1994. Bactéries lactiques : aspects fondamentaux et technologiques. Loriga, Uriage.
- Salvetti, E., Torriani, S., Felis, G.E., 2012. The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 4, 217–226. <https://doi.org/10.1007/s12602-012-9117-8>
- Savijoki, K., Ingmer, H., Varmanen, P., 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71, 394–406. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0427-1>
- Scheirlinck, I., Van der Meulen, R., Van Schoor, A., Vancanneyt, M., De Vuyst, L., Vandamme, P., Huys, G., 2007. Influence of Geographical Origin and Flour Type on Diversity of Lactic Acid Bacteria in Traditional Belgian Sourdoughs. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 6262–6269. <https://doi.org/10.1128/AEM.00894-07>
- Settanni, L., Corsetti, A., 2008. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology* 121, 123–138. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.09.001>
- Sharma, K.D., Karki, S., Thakur, N.S., Attri, S., 2012. Chemical composition, functional properties and processing of carrot—a review. *Journal of Food Science and Technology* 49, 22–32. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0310-7>
- Siezen, R.J., Tzeneva, V.A., Castioni, A., Wels, M., Phan, H.T.K., Rademaker, J.L.W., Starrenburg, M.J.C., Kleerebezem, M., Molenaar, D., van Hylckama Vlieg, J.E.T., 2010. Phenotypic and genomic diversity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from various environmental niches. *Environmental Microbiology* 12, 758–773. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02119.x>

- Singh, A., Kuila, A., Adak, S., Bishai, M., Banerjee, R., 2012. Utilization of Vegetable Wastes for Bioenergy Generation. *Agricultural Research* 1, 213–222. <https://doi.org/10.1007/s40003-012-0030-x>
- Singh, D., Lee, S., Lee, C.H., 2017. Metabolomics for empirical delineation of the traditional Korean fermented foods and beverages. *Trends in Food Science & Technology* 61, 103–115. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.01.001>
- Singh, R., Singh, S., 2007. Design and development of batch type acetifier for wine-vinegar production. *Indian Journal of Microbiology* 47, 153–159. <https://doi.org/10.1007/s12088-007-0029-3>
- Singh, R.S., Chauhan, K., Singh, J., Pandey, A., Larroche, C., 2018. Solid-State Fermentation of Carrot Pomace for the Production of Inulinase by *Penicillium oxalicum* BGPUP-4. *Food Technol. Biotechnol.* 56, 31–39. <https://doi.org/10.1713/ftb.56.01.18.5411>
- Singh, S.K., Ahmed, S.U., Pandey, A., 2006. Metabolic engineering approaches for lactic acid production. *Process Biochemistry* 41, 991–1000. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.12.004>
- Singhania, R.R., Sukumaran, R.K., Patel, A.K., Larroche, C., Pandey, A., 2010. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology* 46, 541–549. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.03.010>
- Sisto, A., Lavermicocca, P., 2012. Suitability of a probiotic *Lactobacillus paracasei* strain as a starter culture in olive fermentation and development of the innovative patented product “probiotic table olives.” *Front. Microbio.* 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00174>
- Smokvina, T., Wels, M., Polka, J., Chervaux, C., Brisse, S., Boekhorst, J., Vlieg, J.E.T. van H., Siezen, R.J., 2013. *Lactobacillus paracasei* Comparative Genomics: Towards Species Pan-Genome Definition and Exploitation of Diversity. *PLoS ONE* 8, e68731. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068731>
- Snyder, A.B., Worobo, R.W., 2014. Chemical and genetic characterization of bacteriocins: antimicrobial peptides for food safety: Chemical and genetic characterization of bacteriocins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94, 28–44. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6293>
- Stark, D., Munch, T., Sonnleitner, B., Marison, I.W., von Stockar, U., 2002. Extractive Bioconversion of 2-Phenylethanol from L-Phenylalanine by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Progress* 18, 514–523. <https://doi.org/10.1021/bp020006n>
- Subramaniyam, R., Vimala, R., 2012. Solid State and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. *International Journal of Science and Nature* 3, 480–486.
- Swain, M.R., Anandharaj, M., Ray, R.C., Parveen Rani, R., 2014. Fermented Fruits and Vegetables of Asia: A Potential Source of Probiotics. *Biotechnology Research International* 2014, 1–19. <https://doi.org/10.1155/2014/250424>
- Swindell, S.R., Benson, K.H., Griffin, H.G., Renault, P., Ehrlich, S.D., Gasson, M.J., 1996. Genetic manipulation of the pathway for diacetyl metabolism in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2641.
- Talebna, F., Karakashev, D., Angelidaki, I., 2010. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology* 101, 4744–4753. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.080>
- Tang, J., Wang, X., Hu, Y., Zhang, Y., Li, Y., 2016. Lactic acid fermentation from food waste with indigenous microbiota: Effects of pH, temperature and high OLR. *Waste Management* 52, 278–285. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.03.034>
- Thang, V.H., Novalin, S., 2008. Green Biorefinery: Separation of lactic acid from grass silage juice by chromatography using neutral polymeric resin. *Bioresource Technology* 99, 4368–4379. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.08.045>
- Tokoro, N., Sawada, M., Sukanuma, Y., Mochizuki, M., Masuzawa, K., Aoyama, Y., Ashida, K., 1987. Nitrogen composition of vegetables common to Japan. *Journal of Food Composition and Analysis* 1, 18–25. [https://doi.org/10.1016/0889-1575\(87\)90007-X](https://doi.org/10.1016/0889-1575(87)90007-X)

- Troller, J.A., Stinson, J.V., 1981. Moisture requirements for growth and metabolite production by lactic Acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 42, 682–687.
- van Dijk, C., Ebbenhorst-Selles, T., Ruisch, H., Stolle-Smits, T., Schijvens, E., van Deelen, W., Boeriu, C., 2000. Product and Redox Potential Analysis of Sauerkraut Fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 132–139. <https://doi.org/10.1021/jf990720t>
- Venus, J., Fiore, S., Demichelis, F., Pleissner, D., 2018. Centralized and decentralized utilization of organic residues for lactic acid production. *Journal of Cleaner Production* 172, 778–785. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.10.259>
- Vera, A., Ly-Chatain, M.H., Rigobello, V., Demarigny, Y., 2012. Description of a French natural wheat sourdough over 10 consecutive days focussing on the lactobacilli present in the microbiota. *Antonie van Leeuwenhoek* 101, 369–377. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9642-6>
- Veyret, Y. (Ed.), 2007. *Dictionnaire de l'environnement*, Dictionnaire. A. Colin, Paris.
- Wadhwa, M., Bakshi, M.P.S., 2013. Utilization of fruit and vegetable wastes as livestock feed and as substrates for generation of other value added products. *Rap Publication* 4.
- Waldron, K. (Ed.), 2009. *Handbook of waste management and co-product recovery in food processing*. 2: ... CRC, Boca Raton, Fla.
- Wang, H., Dong, Q., Meng, C., Shi, X. ai, Guo, Y., 2011. A continuous and adsorptive bioprocess for efficient production of the natural aroma chemical 2-phenylethanol with yeast. *Enzyme and Microbial Technology* 48, 404–407. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.01.006>
- Wang, L., Liu, Z., Duan, Y., Chen, H., 2014. Relations between substrate morphological change and oxygen transfer in solid-state fermentation (SSF) using *Penicillium decumbens* JUA10. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 89, 1582–1589. <https://doi.org/10.1002/jctb.4334>
- Wang, Y., Tashiro, Y., Sonomoto, K., 2015. Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 119, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.06.003>
- Weiss, A., Domig, K., Kneifel, W., 2005. Comparison of Selective Media for the Enumeration of Probiotic Enterococci from Animal Feed. *Food Technol. Biotechnol* 43, 147–155.
- Wouters, D., Bernaert, N., Conjaerts, W., Van Droogenbroeck, B., De Loose, M., De Vuyst, L., 2013. Species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of spontaneous leek fermentations. *Food Microbiology* 33, 185–196. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.016>
- Wouters, Dorrit, Grosu-Tudor, S., Zamfir, M., De Vuyst, L., 2013a. Bacterial community dynamics, lactic acid bacteria species diversity and metabolite kinetics of traditional Romanian vegetable fermentations: Romanian spontaneous vegetable fermentations. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93, 749–760. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5788>
- Wouters, Dorrit, Grosu-Tudor, S., Zamfir, M., De Vuyst, L., 2013b. Applicability of *Lactobacillus plantarum* IMDO 788 as a starter culture to control vegetable fermentations: *Lactobacillus plantarum* IMDO 788 as a starter culture for vegetable fermentations. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93, 3352–3361. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6184>
- Wu, W., Zhao, N., 2019. Metabolomics of Lactic Acid Bacteria, in: Chen, W. (Ed.), *Lactic Acid Bacteria*. Springer Singapore, Singapore, pp. 167–182. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7832-4_6
- Yoon, K.Y., Woodams, E.E., Hang, Y.D., 2004. Probiotication of tomato juice by lactic acid bacteria. *J. Microbiol.* 42, 315–318.
- Yu, A.O., Leveau, J.H.J., Marco, M.L., 2019. Abundance, diversity and plant-specific adaptations of plant-associated lactic acid bacteria. *Environmental Microbiology Reports*. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12794>
- Zagorec, M., Christeans, S., 2013. *Flores protectrices pour la conservation des aliments*. Éditions Quæ, Versailles, France.
- Zannini, E., Waters, D.M., Coffey, A., Arendt, E.K., 2016. Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100, 1121–1135. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7172-2>

- Zhang, Y., Vadlani, P.V., 2015. Lactic acid production from biomass-derived sugars via co-fermentation of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 119, 694–699. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.10.027>
- Zhao, D., Du, R.P., Ge, J.P., Wang, X.Y., Mu, L.Q., Ping, W.X., 2016. Impact of *Lactobacillus paracasei* HD1.7 as a Starter Culture on Characteristics of Fermented Chinese Cabbage (*Brassica rapa* var. *pekinensis*). *FSTR* 22, 325–330. <https://doi.org/10.3136/fstr.22.325>