



**HAL**  
open science

# Impact des paramètres de fabrication sur la composition microbiologique et physico-chimique des légumes fermentés

Liza Begriche

## ► To cite this version:

Liza Begriche. Impact des paramètres de fabrication sur la composition microbiologique et physico-chimique des légumes fermentés. Alimentation et Nutrition. 2021. hal-03281933

**HAL Id: hal-03281933**

**<https://hal.inrae.fr/hal-03281933v1>**

Submitted on 8 Jul 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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License



**UNIVERSITE DE RENNES I**

(U.F.R. Sciences de la Vie et de l'Environnement)

**UNIVERSITE DE BRETAGNE  
OCCIDENTALE**

(U.F.R. des Sciences)

**MASTER SCIENCES, TECHNOLOGIES, SANTE**

**Mention MICROBIOLOGIE**

**Parcours**

**Microbiologie Fondamentale et Appliquée**

**2020-2021**

**Impact des paramètres de fabrication sur la  
composition microbiologique et physico-chimique  
des légumes fermentés**

Mémoire présenté le 21 juin 2021

Par Liza BEGRICHE  
Encadré par Anne THIERRY

Stage effectué au Laboratoire de l'INRAE, unité Science et Technologie du Lait et de l'Œuf (UMR STLO), 65 rue de St-Brieuc, 35000 Rennes

**UNIVERSITE DE RENNES I**

(U.F.R. Sciences de la Vie et de l'Environnement)

**UNIVERSITE DE BRETAGNE  
OCCIDENTALE**

(U.F.R. des Sciences)

**MASTER SCIENCES, TECHNOLOGIES, SANTE**

Mention MICROBIOLOGIE

Parcours

Microbiologie Fondamentale et Appliquée

2020-2021

# **Impact des paramètres de fabrication sur la composition microbiologique et physico-chimique des légumes fermentés**

Mémoire présenté le 21 juin 2021

Par Liza BEGRICHE  
Encadré par Anne THIERRY

Stage effectué au Laboratoire de l'INRAE, unité Science et Technologie du Lait et de l'Œuf (UMR STLO), 65 rue de St-Brieuc, 35000 Rennes

## **Brève description du stage**

Ce stage a été réalisé du 4 Janvier 2021 au 30 juin 2021 par Liza BEGRICHE, dans le cadre de la seconde année du Master Sciences, Technologies, Santé mention Microbiologie, parcours Microbiologie Fondamentale et Appliquée, durant l'année 2020-2021. L'encadrement a été effectué par Anne Thierry et Marie-Noelle Madec de l'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE), se situant au 65, rue de St Briec à Rennes (35000). Le sujet de ce stage est l'étude de l'impact des paramètres de la fabrication de légumes fermentés sur leur composition microbiologique et physico-chimique, par le biais d'une caractérisation par approche culture-dépendante et indépendante des populations de micro-organismes ainsi qu'une analyse physico-chimique.

## TABLE DES MATIERES

Liste des figures et des tableaux.....	0
Liste des abréviations .....	0
1 Introduction générale .....	6
1.1 La lactofermentation.....	7
1.1.1 Aspect historique.....	7
1.1.2 Bénéfices et effet santé des aliments fermentés .....	7
1.1.3 Déroulement du processus de lactofermentation : exemple de la choucroute .....	8
1.1.4 Principaux paramètres de la lactofermentation des légumes .....	9
1.2 Communautés microbiennes des légumes fermentés.....	10
1.2.1 Les bactéries lactiques.....	10
1.2.2 Autres micro-organismes .....	11
1.3 Méthodes de caractérisation des micro-organismes dans les aliments fermentés .....	12
2 Matériel et méthodes.....	13
2.1 Préparation des légumes fermentés .....	13
2.2 Préparation des échantillons avant analyse et mesure du pH.....	13
2.3 Dénombrement et conditions de culture des différentes populations de micro-organismes	14
2.4 Séquençage du gène de l'ARNr 16S .....	16
2.5 Analyse des acides organiques par HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance).....	16
2.6 Dosage des composés volatils par CPG-SM (Chromatographie en phase gazeuse-Spectrométrie de masse).....	16
2.7 Dosage des minéraux par ICP-OES (spectrométrie d'émission optique avec plasma inductif)	17
2.8 Dosage des sucres par chromatographie échangeuse d'ions.....	18
2.9 Analyses statistiques :.....	18
3 Résultats et discussion .....	18
3.1 Evolution du pH pendant la fermentation.....	18
3.2 Populations dénombrées de micro-organismes durant la fermentation .....	20
3.3 Profil des métabolites produits durant la fermentation.....	24
3.4 Analyse en composantes principales (ACP) des données de pH, composition microbiologique et biochimique des échantillons de légumes au cours de la fermentation .....	27
3.5 Profil des sucres dans la saumure pendant la fermentation.....	28
3.6 Changements de la composition en minéraux durant la fermentation.....	29
4 Conclusion et perspectives .....	31
5 References bibliographiques.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>

## Liste des figures et des tableaux

### Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Principales bactéries lactiques impliquées dans la fermentation de choucroute, du kimchi et des cornichons (7).....	10
<b>Tableau 2.</b> Liste des échantillons et leurs modalités de préparation .....	13
<b>Tableau 3.</b> Liste des temps de prélèvements des différentes analyses effectuées .....	14
<b>Tableau 4.</b> Liste des milieux de culture et des conditions appliquées ainsi que les populations bactériennes recherchées correspondantes.....	15
<b>Tableau 5.</b> Concentration des principaux sucres retrouvés dans la saumure des choux et après fermentation (g/Kg). Moyennes de 2 répliques biologiques (bocaux différents). .....	29
<b>Tableau 6.</b> Concentration des principaux sucres retrouvés dans la saumure des carottes avant et après 686 h de fermentation (g/Kg). Moyennes de 2 répliques biologiques (bocaux différents).....	29

### Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Cinétique de croissance des bactéries lactiques et coliformes durant la fermentation de la choucroute (adapté de Hutkins, 2018) .....	9
<b>Figure 2.</b> Evolution du pH en fonction du temps des échantillons de chou (a) et de carottes (b). Moyennes de 2 répliques biologiques (bocaux différents). .....	20
<b>Figure 3.</b> Cinétiques de croissance des populations de bactéries lactiques (a) et entérobactéries (b) dans les échantillons de chou fermenté. Les symboles montrent les résultats individuels observés pour deux répliques biologiques (bocaux différents) et la courbe l'allure à partir des moyennes des points. ....	22
<b>Figure 4.</b> Cinétiques de croissance des populations de bactéries lactiques (a) et entérobactéries (b) dans les échantillons de carottes fermenté. Les symboles montrent les résultats individuels observés pour deux répliques biologiques (bocaux différents) et la courbe l'allure à partir des moyennes des points. ....	23
<b>Figure 5.</b> Concentrations d'acide lactique (a), acide acétique (b) et éthanol (c) pendant la fermentation du chou. Les symboles montrent les résultats individuels observés pour deux répliques biologiques (bocaux différents) et la courbe l'allure à partir des moyennes des points. ....	25
<b>Figure 6.</b> Changement des concentrations d'acide lactique (a), acide acétique (b) et éthanol (c) pendant la fermentation de la carotte. Les symboles représentent les résultats individuels observés pour deux répliques biologiques (bocaux différents) et la courbe l'allure à partir des moyennes des points. ....	26
Figure 7. Représentation noir.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Figure 8.</b> Concentration en minéraux dans les légumes avant fermentation comparée à la concentration en minéraux de la saumure après 528h de fermentation. ....	30

### **Liste des abréviations**

ACP : Analyse en composantes principales

BL : Bactéries lactiques

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

EPS : Exopolysaccharides

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance

LF : légumes fermentés

SM : Spectrométrie de masse

UFC : Unité formant colonie

## 1 INTRODUCTION GÉNÉRALE

La fermentation constitue un processus de conservation largement employé dans le domaine alimentaire. En effet, elle permet de conserver des matières agricoles périssables assurant ainsi la qualité sanitaire, tout en améliorant les qualités organoleptiques et nutritionnelles du produit. En Asie, la fermentation des légumes est très répandue, générant ainsi une gamme de produits très variés, qui sont issus de la fermentation du chou (ex : Kimchi) ou d'autres légumes comme la carotte, la betterave et les navets, qui peuvent être associées au chou (Cao-Hoang et al., 2013). Ces légumes fermentés ont l'avantage de contenir une grande variété de micro-constituants ayant des effets bénéfiques pour la santé (Chen et al., 2012). En Europe de l'Ouest, ce mode de consommation des légumes n'est pas très courant malgré la présence de certains plats traditionnels comme la choucroute ou encore les olives et les cornichons. Cependant, les légumes fermentés connaissent aujourd'hui un regain d'intérêt en raison de l'engouement grandissant des consommateurs pour des produits plus sains présentant des attraits nouveaux et faits maison.

Assez peu d'études se sont intéressées à la fermentation des légumes, bien que les légumes fermentés soient commercialement disponibles et fabriqués par un nombre croissant de personnes. Le projet FLEGME (Fermentation des LEGuMEs) vise à explorer de nouveaux modes de consommation des légumes, préparés dans le respect de l'environnement en utilisant la fermentation, tout en créant un réseau d'acteurs autour de cette thématique. La première partie de ce projet a consisté à faire une collecte de légumes fermentés (LF) auprès d'une communauté de citoyens constituée de près de 250 personnes, d'enquêter sur les pratiques associées à leur préparation et de caractériser les différentes populations de micro-organismes qui y sont présents.

L'objectif de la deuxième partie du projet FLEGME, qui fait l'objet de mon sujet de stage, était d'étudier l'impact de paramètres de fabrication sur les communautés microbiennes et les caractéristiques physico-chimiques des LF. Pour cela, deux légumes (chou et carotte) ont été choisis et ont été préparés selon deux modalités : le degré de découpe et la concentration en sel. La croissance de différentes populations de micro-organismes présents dans les légumes fermentés a été suivie durant un mois de fermentation. En parallèle, l'évolution du pH a été suivie et la composition en différents métabolites (acides organiques produits, sucres et minéraux) déterminée, afin d'établir un lien avec les paramètres de fabrication.

## 1.1 La lactofermentation

### 1.1.1 Aspect historique

Les aliments fermentés peuvent être préparés à partir d'une grande variété d'aliments d'origine animale et végétale. Depuis l'Antiquité, l'homme utilise la fermentation lactique afin de conserver des aliments facilement périssables pendant de longues périodes, mais aussi pour améliorer leurs caractéristiques organoleptiques, les premières traces remontant à 13000 avant J.-C (1).

Les légumes fermentés tels que les choux, radis, navets, concombres, betteraves, sont apparus pour la première fois 300 ans av. J.-C en Chine (2). Les concombres fermentés ont fait leur apparition 2000 ans avant J.C au Moyen Orient (2). La choucroute, aliment fermenté à base de chou largement consommé en Europe, aurait été importée de Chine lors de l'invasion de l'Europe centrale par les Mongols au 13ème siècle, puis aux Etats-Unis par les immigrants venant d'Allemagne et d'autres pays de l'Europe (2).

Suite à la révolution industrielle et plus récemment ces dernières années, la production et la commercialisation des différents types d'aliments fermentés, a connu une forte augmentation, notamment grâce à une meilleure connaissance des micro-organismes responsables de leur fermentation. Ces différents types d'aliments sont largement consommés et appréciés à travers le monde. En Europe et aux Etats Unis, la choucroute, les olives et les cornichons sont les légumes fermentés les plus consommés de nos jours. En Asie, de nombreux aliments fermentés à base de fruits et de légumes sont également consommés, tel que le Kimchi. (2).

### 1.1.2 Bénéfices et effet santé des aliments fermentés

La fermentation est un des plus anciens procédés permettant la conservation des aliments à faible coût comparé aux technologies de transformation industrielle. En effet, les aliments fermentés produits présentent un risque de contamination réduit car ils sont enrichis en produits finaux antimicrobiens, tels que les acides organiques, l'éthanol et les bactériocines qui inhibent la croissance des micro-organismes pathogènes et d'altération (3).

La fermentation apporte également des bénéfices nutritionnels tels que l'amélioration de la digestibilité des protéines et de l'amidon, la dégradation des composés antinutritionnels que peuvent contenir les végétaux comme les tanins, et l'augmentation de la teneur en certaines vitamines comme les vitamines B, dont le folate, la riboflavine et la vitamine B12 sont synthétisés par certaines bactéries présentes dans les aliments fermentés végétaux et laitiers (3).

L'activité métabolique des micro-organismes impliqués dans la fermentation a des conséquences importantes sur le développement de caractéristiques organoleptiques

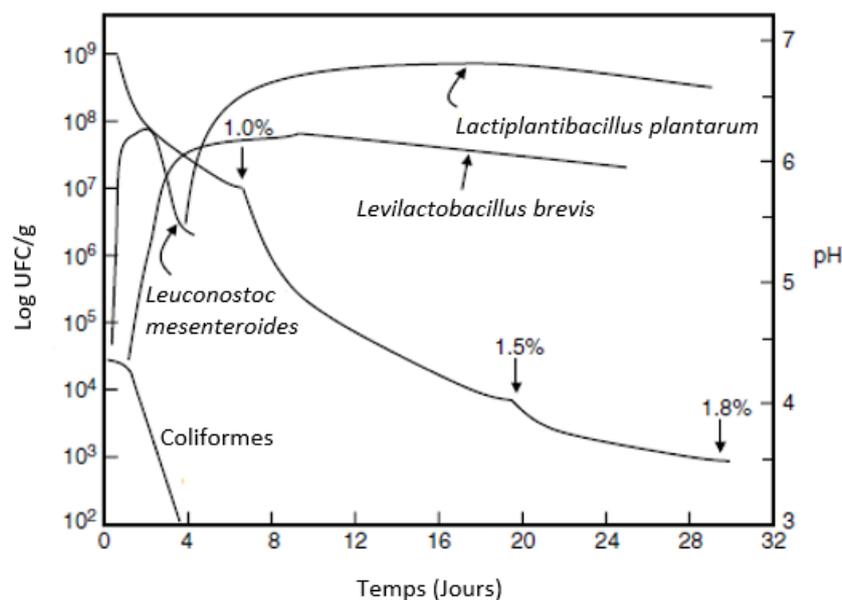
d'intérêt (arômes, texture...) dans les aliments, résultant de la production de molécules et de métabolites pendant la fermentation (Exopolysaccharides, composés aromatiques, acides organiques, etc) (4).

La consommation d'aliments fermentés peut également avoir des effets bénéfiques sur la santé humaine. Ces effets peuvent résulter de l'apport de métabolites produits par les micro-organismes durant la fermentation. Par exemple, certaines protéines ainsi que des exopolysaccharides (EPS) produits pendant la fermentation des aliments peuvent avoir des propriétés antioxydantes, empêcher l'adhésion d'agents pathogènes à la muqueuse intestinale, ou conférer des activités immunostimulantes ou hypocholestérolémiantes (3). Les polysaccharides produits par les bactéries lactiques (BL) peuvent également agir comme des prébiotiques et sont transformés par le microbiote intestinal en acides gras à chaîne courte (5). Ces effets bénéfiques peuvent aussi résulter de l'apport de micro-organismes au tractus gastro-intestinal. En effet, de nombreux aliments fermentés tels que la choucroute, le kimchi, le kéfir ou le miso, contiennent entre  $10^6$  et  $10^9$  micro-organismes viables /g ou /mL. Une partie importante de ces micro-organismes survit au passage dans le tube digestif humain et survit de manière transitoire dans le microbiote intestinal (4).

### 1.1.3 Déroulement du processus de lactofermentation : exemple de la choucroute

La choucroute est fabriquée à partir de chou blanc salé à sec. Les feuilles extérieures du chou sont retirées et le reste est coupé en feuilles ou en lamelles, salées de 2 à 3 % par rapport à la masse du légume, mélangées et tassées dans un récipient de fermentation approprié, c'est-à-dire, empêchant l'entrée d'oxygène tout en permettant l'expulsion du  $\text{CO}_2$ , tels que les bocaux en verre avec joint en caoutchouc. Très vite après avoir mélangé le sel au chou, le jus du légume, qui contient également des sucres et d'autres nutriments dissous, commence à diffuser du tissu végétal vers le milieu extérieur. Une fois que le jus a recouvert le chou, la fermentation bactérienne commence (Figure 1). Elle est caractérisée par une phase initiale hétérofermentaire, initiée par l'espèce *Leuconostoc mesenteroides*. Cette dernière est tolérante au sel (6), présente une phase de latence relativement courte et un taux de croissance élevé à basse température ( $15^\circ\text{C}$  à  $18^\circ\text{C}$ ) (7). Elle métabolise les sucres par voie hétérofermentaire, en produisant de l'acide lactique, de l'acide acétique, du  $\text{CO}_2$  et de l'éthanol. L'espèce *Weissella cibaria* ainsi que d'autres espèces de ce genre peuvent également se développer au début de la fermentation. L'environnement acide généré lors de cette étape par les bactéries hétérofermentaires (0,6 % à 0,8 %, sous forme d'acide lactique) favorise la croissance d'autres BL et inhibe la flore pathogène ou d'altération. Le  $\text{CO}_2$  produit contribue à rendre l'atmosphère anaérobie ce qui favorise également la croissance des bactéries lactiques. Cependant, la croissance de *L. mesenteroides* est rapidement inhibée (en 4 à 6 jours) lorsque la concentration en acide approche 1,0 %.

La phase suivante est une phase homofermentaire, la fermentation est poursuivie par d'autres BL parmi lesquelles on trouve *Lactiplantibacillus plantarum* et *Levilactobacillus brevis* qui prédominent la fermentation. Ces deux espèces produisent de grandes quantités d'acide lactique. Ce qui augmente la concentration d'acide à environ 1,4 % -1,6 %. D'autres espèces de BL telles que *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactilactobacillus curvatus* et *Enterococcus sp.* peuvent également être présentes à cette étape. Enfin, lorsque le pH du milieu est inférieur à 4,0 et que l'acidité avoisine 1,6 %, c'est l'espèce *L. plantarum* qui prédomine. La fermentation est généralement considérée comme terminée lorsque l'acidité atteint environ 1,7 %, avec un pH de 3,4 à 3,6 (7).



**Figure 1.** Cinétique de croissance des bactéries lactiques et coliformes durant la fermentation de la choucroute (adapté de Hutkins, 2018)

#### 1.1.4 Principaux paramètres de la lactofermentation des légumes

De nombreux paramètres peuvent impacter le processus de lactofermentation en favorisant la croissance des BL et en inhibant les micro-organismes pathogènes et d'altération. La plupart des légumes sont fermentés par l'ajout de NaCl (2 % à 5 % du poids total) soit sous forme de saumure ou à sec (8). L'ajout de NaCl favorise la libération de la phase aqueuse se trouvant dans les cellules végétales. La saumure ajoutée aux légumes se répand entre les particules végétales, et permet de chasser l'air du substrat de fermentation. Le tassage des légumes permet également d'expulser l'air et de créer une atmosphère anaérobie. L'oxygène encore disponible, partiellement dissous dans la saumure, est utilisé pour la respiration des cellules végétales et l'activité des micro-organismes aérobies et anaérobies facultatifs. Du CO<sub>2</sub> est produit, ce qui se traduit par un moussage plus au moins important,

et provoque une augmentation de l'anaérobiose et donc une diminution importante du potentiel redox, favorisant la croissance des BL (9). La croissance des bactéries lactiques a pour conséquence une diminution du pH via la production d'acides, principalement l'acide lactique.

La température fait également partie des facteurs critiques pour la production de légumes fermentés car elle affecte la croissance des BL et la vitesse d'acidification. La fermentation est généralement effectuée à température ambiante (15-25 °C), ce qui permet la croissance des BL qui se développent à une température optimale avoisinant les 30 °C (10). La température peut également avoir un impact sur les espèces de BL retrouvées. Par exemple, une température entre 15 et 20 °C favorise la croissance de *Leuconostoc mesenteroides*, principalement responsable de la saveur et de l'odeur des aliments fermentés (11).

## 1.2 Communautés microbiennes des légumes fermentés

Les légumes fermentés sont composés d'un microbiote complexe principalement constitué de BL. Ces micro-organismes déterminent les caractéristiques des aliments fermentés, comme leur capacité à être conservés (via par exemple leur faible pH), leur qualité nutritionnelle, voire leur effet bénéfique sur la santé, et leurs qualités organoleptiques (entre autres la saveur, l'odeur et la texture). Des micro-organismes indésirables peuvent également être présents ; ceux-ci peuvent affecter négativement la qualité des aliments (micro-organismes d'altération) ou même, présenter un risque pour la santé du consommateur (micro-organismes pathogènes).

### 1.2.1 Les bactéries lactiques

Plusieurs espèces de BL ont été retrouvées dans les légumes fermentés (tableau 1). Elles produisent de grandes quantités d'acide lactique. La principale voie métabolique utilisée est la glycolyse. Selon les espèces, les sucres sont catabolisés suivant une voie homofermentaire ou hétérofermentaire. La voie homofermentaire aboutit à la formation de l'acide lactique comme produit final de la dégradation du glucose, tandis que la voie hétérofermentaire produit, en plus de l'acide lactique, des quantités significatives de CO<sub>2</sub> et d'éthanol (12).

**Tableau 1.** Principales bactéries lactiques impliquées dans la fermentation de choucroute, du kimchi et des cornichons (7).

Choucroute	Kimchi	Cornichons
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>

<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
<i>Levilactobacillus brevis</i>	<i>Levilactobacillus brevis</i>	<i>Levilactobacillus brevis</i>
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Leuconostoc kimchii</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Leuconostoc fallax</i>	<i>Leuconostoc gelidum</i>	
	<i>Leuconostoc inhae</i>	
	<i>Leuconostoc citreum</i>	
	<i>Lactococcus lactis</i>	
	<i>Weissella kimchii</i>	

---

Les bactériocines produites par certaines BL ont également une activité inhibitrice dirigée contre des espèces proches de la souche productrice ; elles ont notamment une activité contre certaines bactéries altérantes ou pathogènes telle que *Listeria monocytogenes*. Plusieurs autres molécules aux propriétés antimicrobiennes sont produites par les BL telles que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, la reutérine (3-hydroxypropanal) et le diacétyl (13).

Les BL produisent également des EPS. Ces derniers présentent un grand intérêt, car ils jouent un rôle dans la sensation en bouche et l'amélioration de la texture de produits fermentés à base de végétaux (5). Elles sont également impliquées dans le catabolisme de certains acides aminés, il en résulte la production de molécules aromatiques appréciées qui peuvent par exemple présenter des odeurs de fromage, de yaourt, ou encore des odeurs fruitées (14).

De nombreuses BL ont le statut de QPS (Qualified Presumption of Safety ou présomption d'innocuité reconnue) selon l'EFSA (Autorité européenne de sécurité des aliments), ce qui signifie que leur consommation ne n'engendre généralement pas de risque pour la santé (13).

### 1.2.2 Autres micro-organismes

Dans certains cas, une mauvaise maîtrise des procédés de fabrication des légumes fermentés et le non-respect des conditions d'hygiène peuvent engendrer une contamination par des micro-organismes d'altération et/ou pathogènes et constituer un risque pour la santé du consommateur. La température et le sel constituent les deux paramètres principaux pouvant influencer le développement de ces micro-organismes, s'ils ne sont pas correctement contrôlés. Par exemple, lorsque la quantité de sel ajouté est trop élevée, la croissance de levures telles que l'espèce *Rhodotorula sp.* peut être favorisée. Cette dernière est particulièrement préoccupante en raison du pigment rose indésirable qu'elle produit. Diverses bactéries gram négatives telles qu'*Enterobacter*, *Flavobacterium* et *Pseudomonas* peuvent se développer lorsque la température de fermentation est trop basse (<10°C).

Certaines de ces bactéries sont capables de produire des enzymes pectinolytiques qui provoquent l'hydrolyse de la pectine, résultant en un produit de texture altérée et molle (7).

### **1.3 Méthodes de caractérisation des micro-organismes dans les aliments fermentés**

Les micro-organismes présents dans les aliments fermentés peuvent être caractérisés à l'aide de méthodes dites "culture-dépendantes". Ces méthodes permettent de dénombrer différents types de micro-organismes cultivables sur différents milieux de culture, de les isoler et les conserver, puis d'étudier leurs caractéristiques et leur comportement afin de les utiliser éventuellement comme levains, ou de les mettre en collection. Il est important d'avoir une idée *a priori* des micro-organismes présents afin d'utiliser les milieux ainsi que les conditions de culture adaptées.

Cependant, les micro-organismes cultivables isolés du microbiote d'un aliment fermenté ne représentent qu'une fraction de sa diversité (15), et les méthodes de culture ne permettent pas de détecter les micro-organismes non cultivables ou fortement sous-dominants, qui peuvent néanmoins jouer des rôles fonctionnels importants dans la production de ces aliments (16). De plus, certaines conditions défavorables dans l'écosystème alimentaire telles que l'épuisement des nutriments, les traitements thermiques, les variations de pH ou les basses températures, pourraient induire un état de stress chez les micro-organismes, qui se caractérise par l'incapacité des cellules à produire des colonies sur des milieux de culture, même si elles sont encore capables d'avoir une activité métabolique. Elles entrent alors dans un état viable mais non cultivable (VBNC en anglais), qui ne peut pas être détecté par des méthodes de culture classiques (17).

L'émergence des méthodes dites « culture-indépendantes » ou métagénomique, permet d'étudier la diversité microbienne de nombreux échantillons (18). Ces techniques permettent d'identifier à la fois les populations microbiennes cultivables et non cultivables, en un temps réduit sans passer par une étape de culture. L'identification des espèces et des souches au cours des différentes phases de la production d'aliments fermentés permet de mieux comprendre comment elles agissent et leur rôle potentiel la matrice alimentaire, et les méthodes culture-indépendantes peuvent donc être utilisées à cet effet (16).

Ces méthodes ont cependant certains inconvénients. En effet, il peut exister de multiples biais à différentes étapes de l'analyse. Par exemple, le choix de la méthode d'extraction d'ADN peut introduire un biais car son efficacité varie selon les espèces présentes dans l'échantillon (18). De plus, la métagénomique fournit une quantité importante de données dont le traitement peut être lent et fastidieux.

L'application des méthodes « culture-dépendantes » et « culture-indépendantes » doit donc se faire en combinaison. Ainsi, la complémentarité des informations générées peut contribuer à une meilleure compréhension des écosystèmes microbiens.

## 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1 Préparation des légumes fermentés

Un total de 80 bocaux de choux et carottes fermentés ont été préparés. Les feuilles externes des choux ont été retirées. Les carottes ont été épluchées puis lavées à l'eau du robinet.

Deux facteurs ont été testés, selon un plan d'expérience complet : la teneur en sel (1 %, 0,8 % m/m totale) et le degré de découpe (carotte : rondelle 5 mm, râpée 3 mm ; chou : émincé 5 mm, feuilles 10 cm). Les légumes ont été tassés dans les bocaux et de la saumure a été ajoutée jusqu'à 1 cm du haut du bocal, ce qui correspondant à un ratio légume/saumure d'environ 1 :1. Pour chaque modalité (1 légume, 1 teneur en sel et un type de découpe), 10 bocaux ont été préparés (tableau 2). Les bocaux ont été collectés puis déposés dans une pièce climatisée à 19 °C pendant toute la durée de l'expérience.

**Tableau 2.** Liste des échantillons et leurs modalités de préparation

Légume	Sel (%)	Découpe	Nombre de bocaux
Chou	0,8	Émincé	10
Chou	1	Émincé	10
Chou	0,8	Feuille	10
Chou	1	Feuille	10
Carotte	0,8	Rondelle	10
Carotte	1	Rondelle	10
Carotte	0,8	Râpée	10
Carotte	1	Râpée	10

### 2.2 Préparation des échantillons avant analyse et mesure du pH

Après homogénéisation du contenu du bocal, 20 mL de saumure ont été prélevés pour mesurer le pH. Un volume de 90 mL d'eau physiologique et 10 g d'échantillon ont été introduits dans un sac à filtre puis broyés pendant 2 min au Stomacher. Le filtrat obtenu, correspondant à la dilution  $10^{-1}$ , a ensuite été transféré dans un flacon stérile en verre, puis, des dilutions en cascade dans l'eau tryptonée jusqu'à  $10^{-7}$  ont été réalisées.

Pour la recherche des formes bactériennes sporulées, un volume de 10 mL de la dilution  $10^{-1}$  a été déposé dans un tube en verre stérile, chauffé au bain marie à 70 °C pendant 17 min puis placé à 4 °C directement afin de détruire les formes végétatives. Des dilutions en cascade jusqu'à  $10^{-6}$  en eau tryptonée ont été réalisées.

Afin de réaliser une extraction d'ADN pour une analyse métagénomique amplicon 16S, un volume de 2 fois 5 mL de la dilution  $10^{-1}$  de chaque échantillon ont été centrifugés 20 min à

10 000 rpm (4 °C), puis les surnageants ont été éliminés et les culots de cellules bactériennes obtenu ont été placés à -20 °C.

Dans le but de conserver les échantillons, 2 fois 2 mL de chaque échantillon ont été transférés dans des cryotubes contenant 2 mL de glycérol. Ensuite, les cryotubes ont été placés à -80 °C.

Environ 130 g de chaque échantillon ont été transmis au laboratoire réalisant la recherche de pathogènes (Labocéa, Fougères).

Pour l'analyse des composés volatils, des acides organiques et des sucres, 2 fois 10 g de chaque échantillon ont été prélevés et placés à -20 °C pour analyse ultérieure. 20 g de chaque échantillon ont également été placés à -20 °C pour l'analyse des minéraux. Le reste des échantillons (légumes et saumures) a été congelé séparément à -20 °C.

**Tableau 3.** Liste des analyses effectuées, des différents stades de fermentation considérés et du type d'échantillon prélevé

Analyse	Stade de prélèvement choux (h)	Stade de prélèvement carottes (h)	Type d'échantillon analysé
Dénombrements microbiens	0, 40, 86, 326, 686	0, 40, 64, 362, 688	Mix légumes et saumure
Mesure pH	0, 40, 86, 326, 494, 687	0, 40, 64, 232, 362, 506, 689	Saumure
Composés volatils	0, 40, 86, 326, 494, 688	0, 40, 64, 232, 362, 506, 690	Saumure
Sucres	0, 688	0, 688	Saumure
Acides organiques	0, 40, 86, 326, 494, 688	0, 40, 86, 326, 494, 688	Saumure
Minéraux	0, 494	0, 506	Légumes et saumure

### 2.3 Dénombrement et conditions de culture des différentes populations de micro-organismes

Les différentes populations de micro-organismes présents dans les échantillons de légumes fermentés ont été caractérisés en étalant les dilutions décrites précédemment sur différents milieux de culture (tableau 3). Un volume de 0,1 mL de chaque dilution a été déposé sur les milieux MRSA, BHI-YEAn, BHI-YEAnp, TSA<sub>n</sub>-NaCl et OGAc. Ces milieux ont ensuite été incubés à 25 °C jusqu'à 7 jours afin de pouvoir dénombrer les micro-organismes à croissance lente. L'addition de natamycine à certains milieux permet d'inhiber la croissance

de levures et moisissures. La pénicilline a également été ajoutée à certains milieux afin d'inhiber la croissance des bactéries à Gram positif, principalement représentées par les bactéries lactiques. 1 mL des dilutions  $10^{-1}$  à  $10^{-3}$  ont été inoculés dans la masse pour les milieux VRBG, KF, TSN et BCA pour la recherche des populations bactériennes pouvant contenir des pathogènes, exprimés en UFC/g.

D'autres bactéries pathogènes, à savoir *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* et les staphylocoques à coagulase positive tels que *Staphylococcus aureus* ont également été recherchées par un laboratoire sous-traitant (Labocéa, Fougères) en suivant les normes ISO 16649-2, ISO 6888-2, BRD 07/11-12/05 et AES 10/03-09/00.

**Tableau 4.** Liste des milieux de culture et des conditions appliquées ainsi que les populations bactériennes recherchées correspondantes.

	Milieu de culture	Population recherchée	Conditions de culture
MRSA	Gélose de Man, Rogosa, Sharpe	Bactéries lactiques et entérobac	25 °C en anaérobie 7 jours
BHI-YEAn	Gélose cœur-cerveille enrichie en extrait de levure + natamycine	Population bactérienne totale aérobie	25 °C en aérobie 2 à 5 jours
BHI-YEAnp	Gélose cœur-cerveille enrichie en extrait de levure + natamycine	Bactéries Gram-négatif aérobie	25 °C en anaérobie 2 à 5 jours
TSAn-NaCl)	Tryptone Soja Agar 4% NaCl + natamycine	Population bactérienne totale halophile	25 °C en anaérobie 7 jours
OGAc	Gélose Oxytétracycline Glucose Agar au chloramphénicol (OGAc)	Levures et moisissures	25 °C en anaérobie 7 jours
BHI-YEA	Gélose coeur-cerveille enrichie en extrait de levure (BHI-YEA)	Bactéries aérobies sporulées	37 °C en aérobie 2 jours
VRBG	Gélose glucosée bilisée au cristal violet et au rouge neutre (VRBG)	<i>Enterobacteriaceae</i>	37 °C en aérobie 4 jour
KF	Kenner Fecal (KF)	<i>Enterococcus</i>	37 °C en aérobie 2 jours
	B. cereus Selective Agar base (BCA)	<i>Bacillus cereus</i>	30 h en aérobie 1 à 2 jours
TSN	Tryptone Sulfite Néomycine Agar (TSN)	Bactéries sporulées anaérobies sulfito-réducteurs ( <i>Clostridium</i> )	37 °C en anaérobie 2 à 5 jours

## **2.4 Séquençage du gène de l'ARNr 16S**

L'ADN des clones isolés a été extrait et purifié à l'aide du kit Macherey-Nagel Genomic DNA from Tissue. Le gène de l'ARNr 16S a été amplifié par PCR en utilisant les amorces universelles W001 : AGAGTTTGATCMTGGCTC, W002 : GNTACCTTGTTACGACTT et le programme PCR suivant : 1 cycle : 96 °C – 4 min, 35 cycles : 96 °C – 40 s, 50 °C – 30 s, 72 °C – 1,30 min, 1 cycle : 72 °C – 10 min (SimpliAmp™ Thermal Cycler, Applied Biosystems™, ThermoFisherScientific) (19). Les amplicons ont été séquencés par un prestataire externe (LGC genomics, Berlin, Allemagne). Les séquences du gène de l'ARNr 16S obtenues ont ensuite été assemblées et corrigées à l'aide du logiciel Geneious, puis, alignées par BLAST et comparées à celles disponibles dans la base GenBank. L'identification au niveau de l'espèce a été définie par une similarité de séquence du gène de l'ARNr 16S de 98 % avec la séquence de la souche alignée. L'identification au niveau du genre a été définie par un pourcentage d'identité de 97 % avec la séquence de la souche alignée.

## **2.5 Analyse des métabolites par HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance)**

Les métabolites produits au cours de la fermentation ont été analysés par HPLC directement dans les échantillons de saumure. Pour cela, les débris de légumes ont été éliminés des saumures par centrifugation à 8000 xg pendant 10 min à 4 °C. Le surnageant a ensuite été filtré sur des unités Vivaspin Sartorius (polyethersulfone, seuil de coupure 10 kDa) puis centrifugé à 19 000 xg pendant 15 min à 4 °C. Le filtrat obtenu a été dilué au 1/2, au 1/3, ou au 1/4 dans une solution d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.005 mol·L<sup>-1</sup> puis déposé en vial, pour être injecté dans le chromatographe HPLC DIONEX (Sunnyvale California), en utilisant une colonne garnie d'une résine échangeuse d'ions Aminex A-6 (BioRad, Hercules, California), chauffée à 55 °C. La phase mobile était le H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 0.01 mol·L<sup>-1</sup> avec un débit de 1 mL·min<sup>-1</sup>. Une double détection par réfractométrie et par UV à 210 nm a été effectuée. Le traitement des données a été réalisé avec le logiciel Chromeleon™ (20).

## **2.6 Dosage des composés volatils par CPG-SM (Chromatographie en phase gazeuse- Spectrométrie de masse)**

Les composés volatils ont été analysés par CPG-SM après extraction, selon Pogačić et al. (2015), avec quelques modifications. Cette technique permet de séparer les composés par CPG (Clarus 680, Perkin Elmer), puis d'identifier et/ou quantifier ces composés par couplage à un spectromètre de masse (MS quandripolaire Clarus 600T,

Perkin Elmer). Un volume de 2,5 mL de saumure de chaque échantillon a été déposé dans un vial spécifique (Perkin B0104236, 20 mm 22 mL clear crimp vial) et les vials hermétiquement fermés conservés à -80 °C jusqu'à analyse. L'extraction des composés volatils a été effectuée sous une pression d'hélium à 65 °C pendant 15 min. Elle consiste à créer un équilibre de concentration des composés volatils entre l'échantillon liquide et l'espace de tête ou « head space », de transférer ces composés de l'espace de tête grâce à un courant d'hélium vers un piège adsorbant constitué d'une phase de tenax, puis de désorber les composés volatils par chauffage du piège avant l'injection. Le piège a été chauffé à 250 °C pendant 0,1 min et rétrobalayé avec de l'hélium à 89 kPa, entraînant la désorption des volatils. Ces derniers ont ensuite été séparés sur une colonne capillaire Stabilwax MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm ; Restek, Bellefonte, PA), avec de l'hélium comme gaz vecteur. La température initiale du four a été maintenue à 35 °C pendant 10 min, avec une augmentation de 5 °C/min jusqu'à 230 °C. Les molécules séparées ont été ionisées et fragmentées puis analysées avec le logiciel TurboMass™.

## **2.7 Dosage des minéraux par ICP-OES (spectrométrie d'émission optique avec plasma inductif)**

Les minéraux ont été dosés dans les saumures des légumes par ICP-OES (iCAP™ 7000 Thermo scientific USA) pilotée par le logiciel Thermo Scientific™ Qtegra™ Intelligent Scientific Data Solution™. Pour leur minéralisation, les échantillons ont été déposés dans des creusets puis placés à l'étuve à 102 °C pendant une nuit. Ensuite, les creusets ont été placés au four à mouffles, la température du four a été augmentée progressivement pour carboniser le contenu, puis maintenue à 550 °C +/- 20 °C, jusqu'à obtention de cendres blanches (environ 5 heures). Les cendres ont été diluées dans icap pour analyse.

Une pompe péristaltique aspire l'échantillon à un débit de 2 mL/min à travers un tuyau en Tygron (1,01 mm), et le transporte dans une chambre de nébulisation où le liquide se transforme en aérosol. Pour contrôler avec précision la concentration de l'aérosol, et le diluer si besoin est, un débit d'argon est introduit dans le nébuliseur via un régulateur de débit. L'aérosol est ensuite introduit dans la chambre du réacteur où il entre en collision avec le plasma d'argon qui se trouve déjà dans cette chambre. Les éléments sont soumis à une telle quantité d'énergie qu'ils se trouvent dans un état excité. Les électrons des atomes excités (ionisés), émettent un photon dont la longueur d'onde est caractéristique de l'élément. Ce rayonnement est détecté par le spectromètre et son intensité mesurée puis comparée à celle émise par le même élément contenu dans la gamme étalon analysée dans les mêmes conditions que les échantillons.

## **2.8 Dosage des sucres et du mannitol par chromatographie échangeuse d'ions**

Avant analyse, les échantillons à analyser ont été centrifugés à 8000 g pendant 10 min à 4 °C. Le surnageant a été récupéré puis ultrafiltré sur vivaspin et centrifugé à 19000 g pendant 30 min. Le filtrat obtenu a été dilué 400 fois dans de l'eau ultrapure (milliQ).

Les sucres présents dans la saumure des légumes ont été dosés par chromatographie ionique HPAEC-PAD (High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection), sur la chaîne ICS 5000+ Dionex (Thermo Electron SA, Courtaboeuf, France), la colonne utilisée est une échangeuse d'anions CarboPac PA210-4 µm (2 x 150 mm) précédée par une précolonne CarboPac PA210-4µm (2\*30 mm). La méthode de détection repose sur la mesure du courant électrique généré par l'oxydation des composés à la surface d'une électrode. La concentration des métabolites détectés dans l'échantillon a été déterminée par l'intégration des pics présents dans le chromatogramme avec le logiciel Chromelon7 de Thermo Scientific. Cette méthode permet de détecter les monosaccharides, les disaccharides et les oligosaccharides linéaires en milieu dilué. La séparation des glucides se base sur leur taille et sur leur charge. Les sucres sont élués par l'hydroxyde de potassium (KOH) à un débit de 0.2 ml/min avec le gradient suivant : 0 à 32 min 13 mM, 32 min à 55 min 100 mM puis retour à 13 mM de 55 à 65 min. D'autres composés peuvent être analysés par cette méthode, comme le mannitol.

Une gamme étalon de 0.1 à 40 mg/l a été injectée dans les mêmes conditions que les échantillons et a permis d'établir la corrélation entre l'aire et la concentration de glucides dans l'échantillon.

## **2.9 Analyses statistiques :**

Les données obtenues à partir des résultats de dénombrement, du suivi pH et des analyses biochimiques ont été traitées avec le logiciel Rstudio. Une analyse de la variance (ANOVA) a été réalisée, ainsi qu'une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée à l'aide des packages FactoMineR et FactoShiny.

# **3 RÉSULTATS ET DISCUSSION**

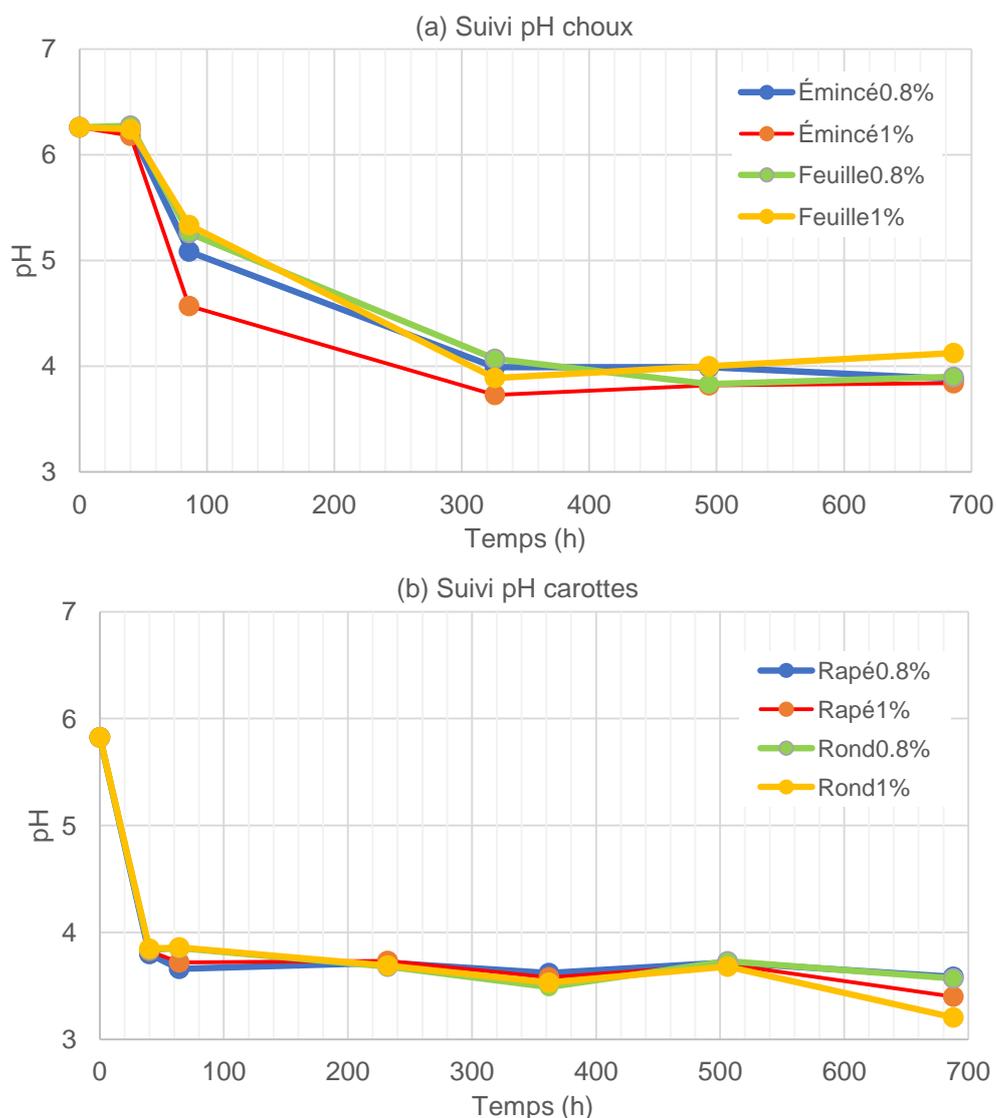
## **3.1 Evolution du pH pendant la fermentation**

Le pH est un indicateur critique de la progression de la fermentation. Sa baisse est principalement due à la production d'acide lactique par le métabolisme des BL (22). Comme le montre la Figure 3 (a), la valeur de pH initiale du chou était de 6,3. Le pH a rapidement diminué à partir de 40 h de fermentation dans tous les échantillons. Une diminution plus lente a été observée après environ 80 h de fermentation pour atteindre une valeur comprise

entre 3,8 et 4,1. Les variations des valeurs pH étaient ensuite faibles jusqu'à la fin de l'expérience.

La concentration en sel et le degré de découpe n'avaient pas d'effet significatif sur la variation du pH (p-value > 0,05).

La Figure 3 (b) montre les changements de pH des échantillons de carottes fermentées. La valeur initiale du pH était de 5,8. Le pH a rapidement baissé pour atteindre un plateau, après environ 40 h de fermentation, sa valeur était comprise entre 3,2 et 3,8. Les valeurs pH les plus faibles à la fin de l'expérience ont été observés dans les échantillons de carotte avec 1 % de sel. Cependant, ni la concentration en sel ni le degré de découpe n'avaient d'effet significatif sur la variation du pH (p-value > 0,05). Seul le type de légume avait un effet significatif sur l'évolution du pH (p-value < 0,001). En moyenne, le pH des échantillons de carottes fermentées était inférieur d'une valeur de 0,5 au pH des choux après 686h de fermentation.



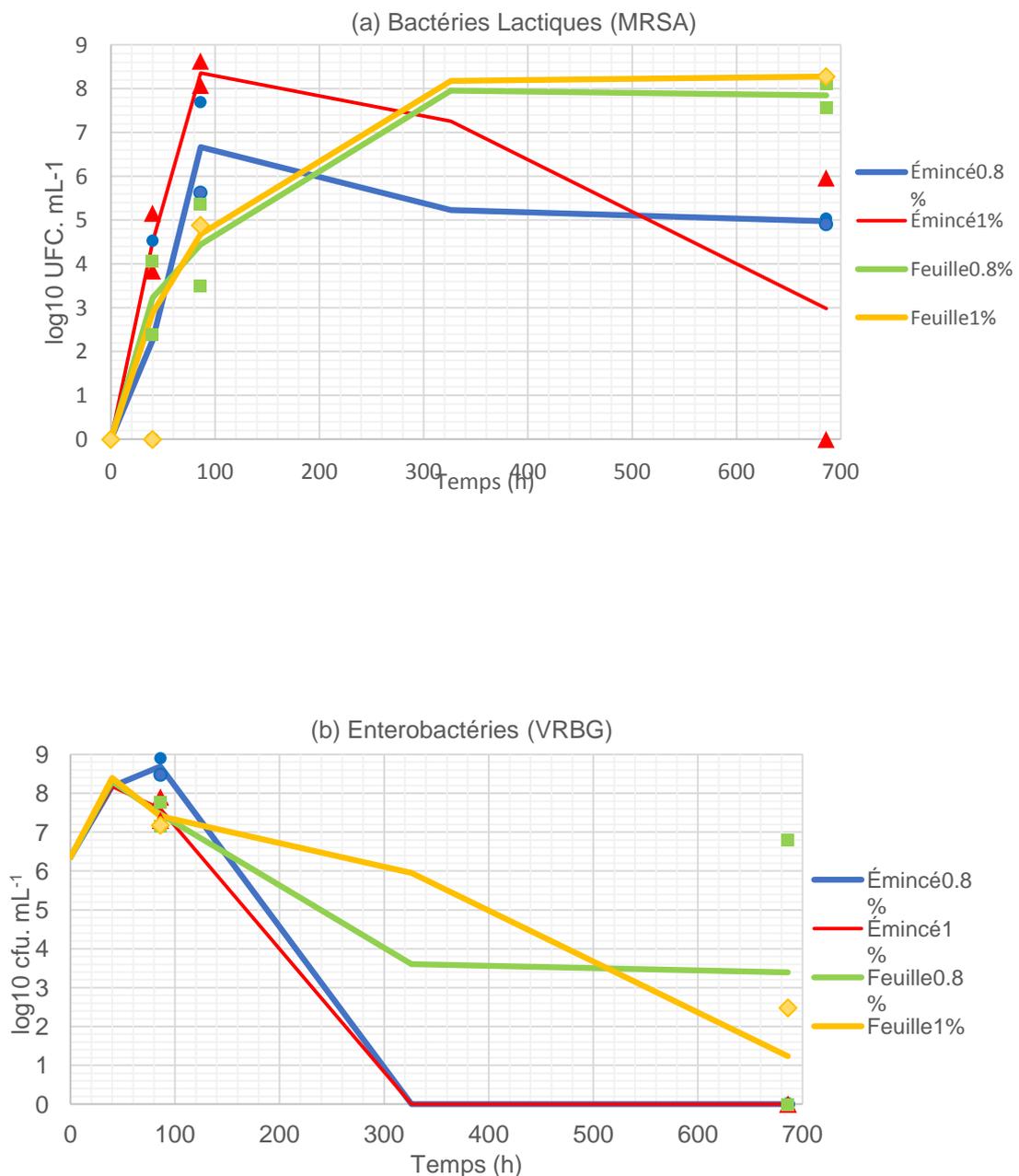
**Figure 2.** Evolution du pH en fonction du temps des échantillons de chou (a) et de carottes (b). Moyennes de 2 répliques biologiques (bocaux différents).

### 3.2 Populations dénombrées de micro-organismes durant la fermentation

La détermination du nombre de BL sur gélose MRSA a montré que la concentration en BL dans les échantillons de chou émincés avait rapidement augmenté au cours des 80 premières heures de fermentation (Figure 3a). Elle atteignait à 86 h une concentration de  $2,7 \cdot 10^8$  unités formant colonie.  $\text{mL}^{-1}$  dans le chou émincé avec 1% de sel, et de  $2,5 \cdot 10^7$  UFC/g dans le chou émincé avec 0.8 % de sel. La concentration de BL baissait ensuite dans l'émincé avec 1 % de sel jusqu'à atteindre une concentration de  $9,6 \cdot 10^4$  UFC/g à environ 600 h de fermentation. Elle baissait également dans le chou émincé à 0,8 % de sel puis atteignait un plateau et se stabilisait à une concentration d'environ  $4,6 \cdot 10^5$  UFC/g.

La concentration en bactéries lactiques dans le chou feuille augmentait moins rapidement et atteignait un pic à environ 300 h, elle restait ensuite stable quelle que soit la concentration en sel et atteignait concentration de  $1,9 \cdot 10^8$  UFC/g à 686 h.

Le nombre d'entérobactéries dans le chou analysé était de  $1,5 \cdot 10^8$  UFC/g. Il atteignait un pic à environ 80 h de fermentation dans le chou émincé à 0,8 % de sel et après 40 h pour le reste des échantillons. Le nombre d'entérobactéries a ensuite diminué considérablement dans les échantillons de chou émincé, jusqu'à être inférieur à la limite de détection après 326 h de fermentation. La population d'entérobactéries se maintenait plus longtemps dans les échantillons de chou feuille. En effet, elle se stabilisait à une concentration de  $3,1 \cdot 10^6$  UFC/g dans le chou feuille à 0.8 % et continuait de baisser progressivement dans le chou feuille 1 % jusqu'à atteindre une concentration de  $1,5 \cdot 10^2$  UFC/g (Figure 3b).



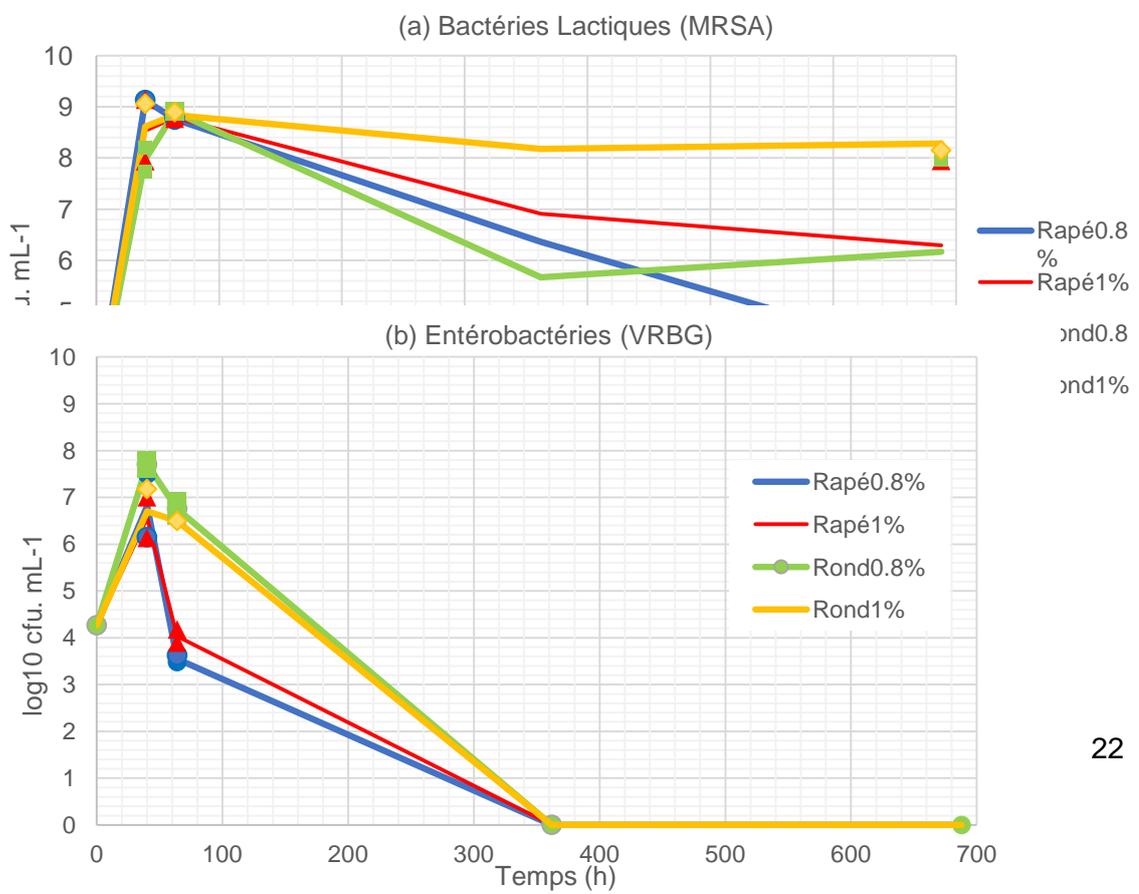
**Figure 3.** Cinétiques de croissance des bactéries lactiques (a) et entérobactéries (b) dans les échantillons de chou fermenté. Les symboles montrent les résultats individuels observés pour deux répliques biologiques (bocaux différents) et la courbe l'allure à partir des moyennes des points.

La population de bactéries lactiques initiale présente dans la carotte était de  $1,6 \cdot 10^3$  UFC/g. La concentration de BL a rapidement augmenté dans tous les échantillons de carotte quelle que soit le taux de sel ou la découpe pour atteindre environ  $6,8 \cdot 10^8$  UFC/g après 64 h de fermentation (figure 5a). Elle a ensuite baissé pour atteindre une concentration de  $1,5 \cdot 10^4$  UFC/g dans la carotte râpée à 0,8 % de sel,  $4,3 \cdot 10^7$  UFC/g dans la carotte rondelle à 0,8 % de sel et  $4,6 \cdot 10^7$  UFC/g dans les râpées à 1 % de sel alors qu'elle se maintenait à  $2 \cdot 10^8$  UFC/g dans la carotte rondelle à 1 %.

La population initiale d'entérobactéries dans les échantillons de carottes était de  $3,8 \cdot 10^4$  UFC/g, elle a rapidement augmenté durant les 40 premières heures de fermentation pour atteindre entre  $1,3 \cdot 10^6$  UFC/g et  $6,1 \cdot 10^7$  UFC/g puis a chuté brutalement dans tous les échantillons. La population d'entérobactéries est indétectable après environ 360 h de fermentation dans tous les échantillons.

La croissance des bactéries lactiques est accompagnée de la production d'acides, essentiellement l'acide lactique, et d'éthanol qui inhibent la croissance des entérobactéries et d'autres bactéries pathogènes (23).

La concentration de sel et le degré de découpe n'avaient pas d'effet significatif sur la croissance des bactéries lactiques et des entérobactéries dans le chou et la carotte fermentés ( $p$ -value > 0,05).



**Figure 4.** Cinétiques de croissance des populations de bactéries lactiques (a) et entérobactéries (b) dans les échantillons de carotte fermentée. Les symboles montrent les résultats individuels observés pour deux répliques biologiques (bocaux différents) et la courbe l'allure à partir des moyennes des points.

Les staphylocoques à coagulase positive, *E. coli*, *Salmonella* et *Listeria* n'ont été détectés dans aucun des échantillons, cela peut être dû à la baisse rapide du pH dans les échantillons ce qui inhibe le développement de ces micro-organismes. De plus, les BL peuvent produire des composés antimicrobiens qui permettent d'inhiber la croissance de ces pathogènes (13, 24). Un seul échantillon, correspondant au chou feuille à 686 h de fermentation, contenait des colonies caractéristiques des bactéries sporulées anaérobies sulfite-réductrices (*Clostridium*) sur milieu TSN avec une abondance de  $1,6 \cdot 10^4$  UFC/g. Sur ce même échantillon, ainsi que sur des échantillons de carottes rondelles et râpées à 64 h, des colonies de bactéries sporulées aérobies ont été dénombrées sur milieu BCA en faible abondance ( $1,8 \cdot 10^2$  UFC/g en moyenne), mais celles-ci n'étaient pas caractéristiques des colonies de *B. cereus*, un séquençage du gène de l'ADNr 16S sera effectué afin d'identifier ces colonies.

Une grande variabilité de l'abondance des micro-organismes a été observée entre les répliques de chou et de carottes (représentés par des symboles Figure 3 et 4), c'est-à-dire entre 2 bocaux différents. Par exemple, les deux répliques de chou émincé avec 1 % de sel à 686 h présentaient une concentration de BL en dessous du seuil de détection ou de  $9,3 \cdot 10^5$  UFC/g. Un écart est également visible au niveau des concentrations en acide lactique qui étaient de 1,79 et 2,2 g.L<sup>-1</sup> et pourrait s'expliquer par le fait que les fermentations ne soient pas au même stade d'avancement dans les différents répliques, ce qui n'a pas été décrit dans la littérature.

Les proportions de bactéries dénombrées sur MRSA et BHI-YEAn étaient très proches, ce qui nous permet de formuler l'hypothèse selon laquelle les bactéries présentes sur le milieu BHI-YEAn sont les mêmes que celles présentes sur MRSA et correspondraient aux BL. La durée d'incubation de 7 jours des milieux a pu faciliter la croissance des BL, même en aérobiose.

Des bactéries Gram négatif anaérobies ont été dénombrées sur BHI-YEAnp principalement en début de fermentation (avant 86 h), leur concentration moyenne était de  $1,2 \cdot 10^8$  UFC/g dans les échantillons de chou et de  $4,7 \cdot 10^7$  UFC/g dans les échantillons de carottes.

Plusieurs colonies ont été dénombrées sur milieu OGAc dans les échantillons de chou avec une abondance allant de  $10^1$  à  $10^2$  UFC/g et dans les échantillons de carotte avec des

concentrations très variables allant de  $10^2$  à  $10^7$  UFC/g. Après observation microscopique, il s'est avéré que certaines de ces colonies, d'aspect atypique, correspondaient à des colonies de bactéries qui, de manière inattendue, ont poussé en présence de chloramphénicol. Seules les colonies typiques de levures ont été comptabilisées.

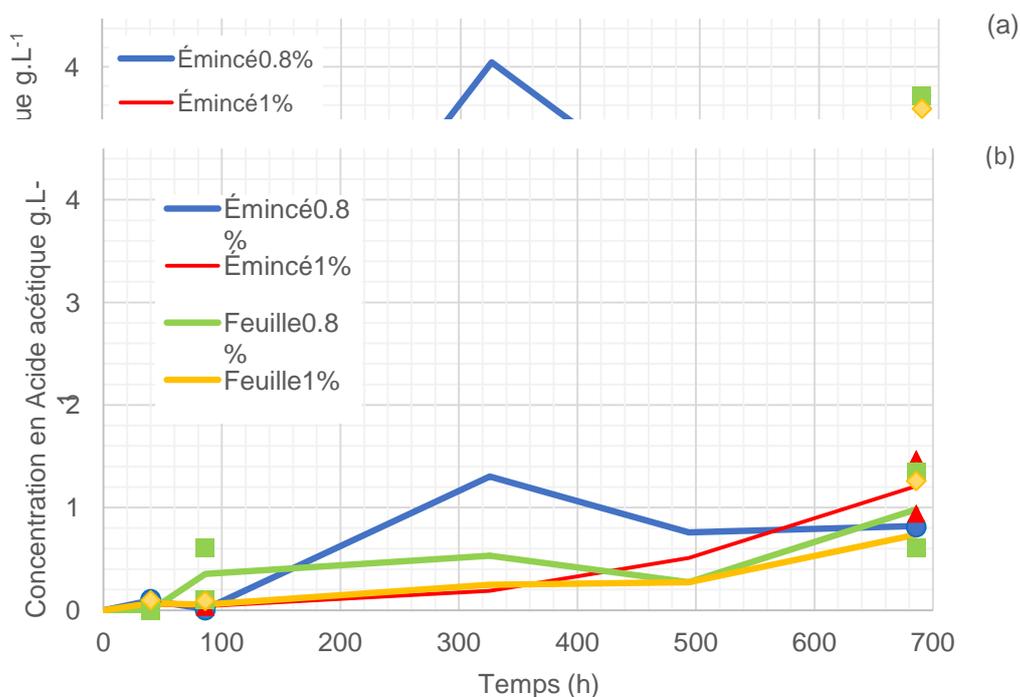
### 3.3 Profil des métabolites produits durant la fermentation

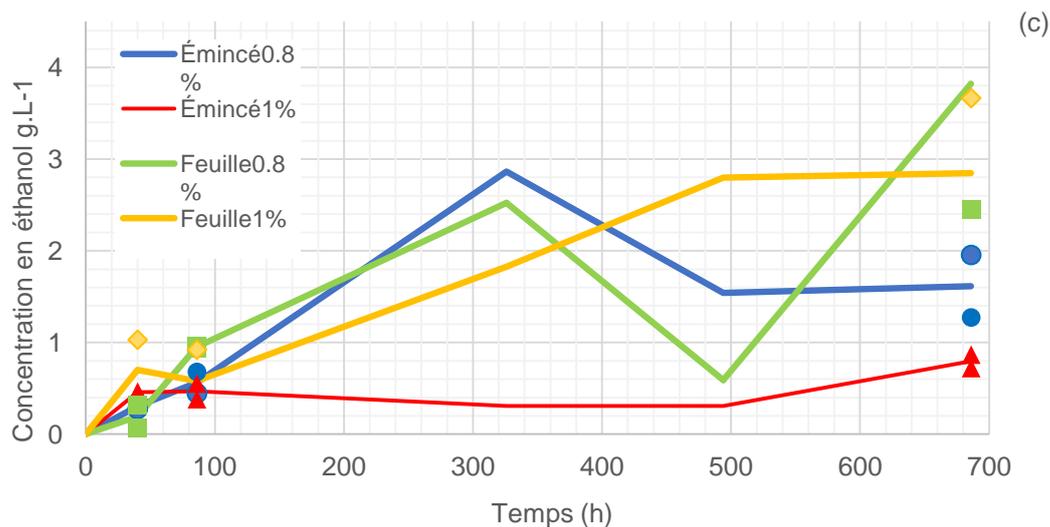
Les principaux métabolites détectés étaient l'acide lactique, l'acide acétique, l'éthanol et le mannitol. Comme le montre la figure 6a, la concentration en acide lactique a augmenté lentement les 86 premières heures puis a augmenté rapidement jusqu'à atteindre un pic  $4 \text{ g.L}^{-1}$  à environ 300 h dans les choux émincés à 0,8 % de sel. Cette augmentation s'accompagnait d'une baisse du pH pendant les 326 premières heures (Figure 3a). Après 594 h de fermentation, la concentration d'acide lactique dans les échantillons de chou à 1 % de sel baissait pour atteindre une concentration allant de  $1,9$  à  $2,3 \text{ g.L}^{-1}$  en fin de fermentation, alors que la concentration d'acide lactique a continué d'augmenter dans les échantillons de chou à 0,8 % de sel et a atteint une concentration de  $2,8 \text{ g.L}^{-1}$ .

Comme pour l'acide lactique, le pic acide acétique était atteint à environ 300 h de fermentation dans l'échantillon de chou émincé avec 0,8 % de sel (Figure 6b), sa concentration a ensuite baissé à  $0,8 \text{ g.L}^{-1}$  à 686 h de fermentation. Dans tous les autres échantillons la concentration d'acide lactique a augmenté progressivement avec le temps. Elle était d'une valeur de  $0,7$  à  $1,2 \text{ g.L}^{-1}$  à 686 h de fermentation.

De l'éthanol était également produit durant la fermentation du chou (Figure 6c).

Le contenu en éthanol était plus élevé dans les choux émincés avec 0,8 % à 326h de fermentation et il variait selon la concentration en sel. En fin de fermentation c'est l'échantillon de chou émincé avec 1 % de sel qui a atteint la plus haute concentration en éthanol, ce qui pourrait être dû à la dominance des bactéries lactiques hétérofermentaires dans ce bocal échantillon.



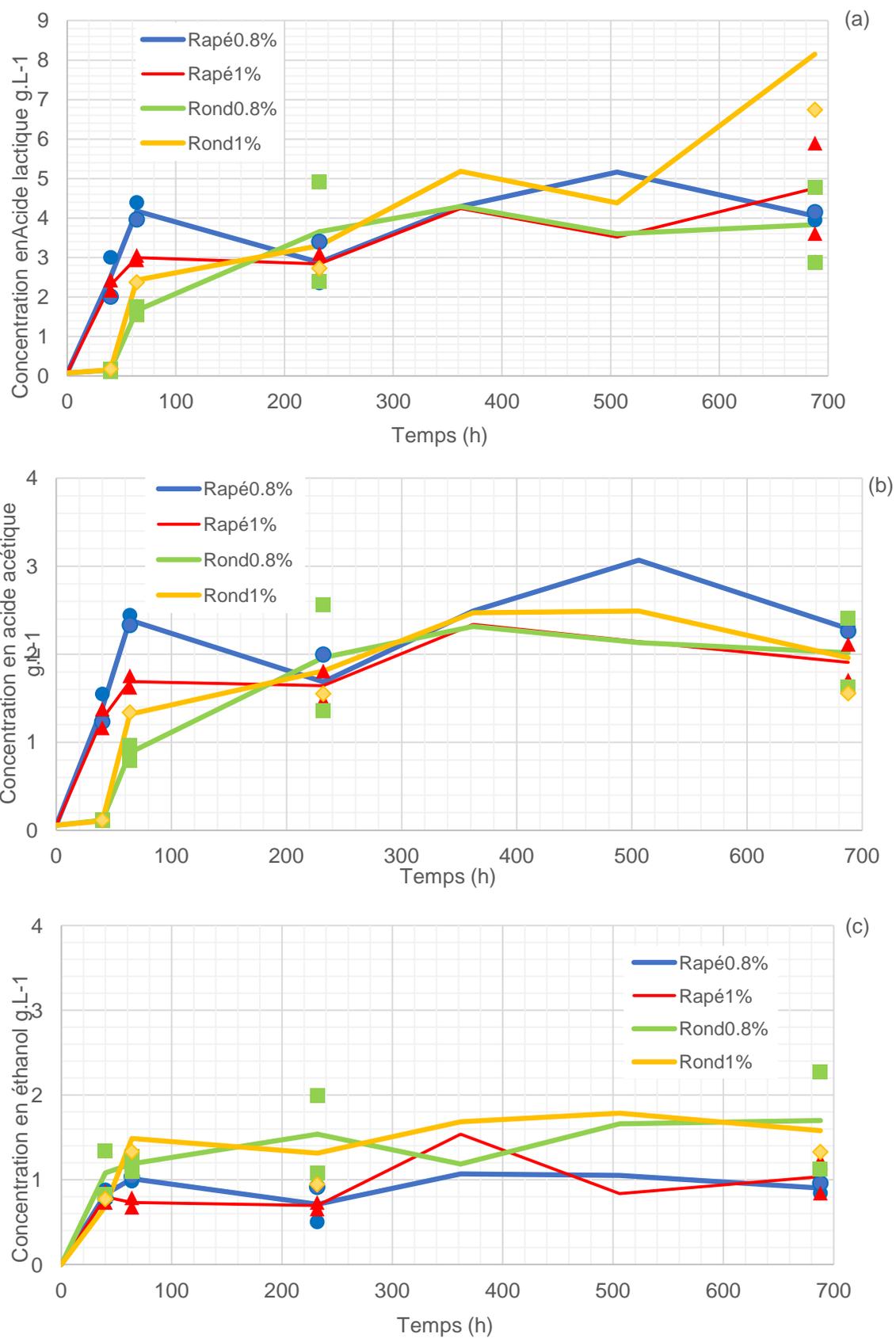


**Figure 5.** Concentrations d'acide lactique (a), acide acétique (b) et éthanol (c) pendant la fermentation du chou. Les symboles montrent les résultats individuels observés pour deux réplicas biologiques (bocaux différents) et la courbe l'allure à partir des moyennes des points.

La concentration en acide lactique dans les échantillons de carotte fermentée a augmenté progressivement durant les ~506 premières heures pour atteindre une moyenne de 4 g.L<sup>-1</sup>. A 688 h, ce sont les carottes rondelles à 1 % de sel qui contenaient la plus grande concentration d'acide lactique, atteignant 8 g.L<sup>-1</sup> (Figure 7a), ce qui pourrait être dû au fait que la concentration en bactéries lactiques était également la plus élevée dans cet échantillon (Figure 5a).

Comme le montre la figure (Figure 7b), la concentration en acétate dans la carotte fermentée a augmenté au cours du temps pour atteindre son pic à environ 500 h de fermentation, correspondant à une valeur comprise entre 2 et 3 g.L<sup>-1</sup>. L'augmentation était plus rapide dans les échantillons de carotte râpée. La concentration la plus élevée était détectée dans la carotte râpée avec 0,8 % de sel. Cependant, l'effet de la découpe et de la concentration de sel sur la concentration en acide lactique et acétique dans les échantillons de choux et de carottes n'était pas significatif (p-value > 0,05).

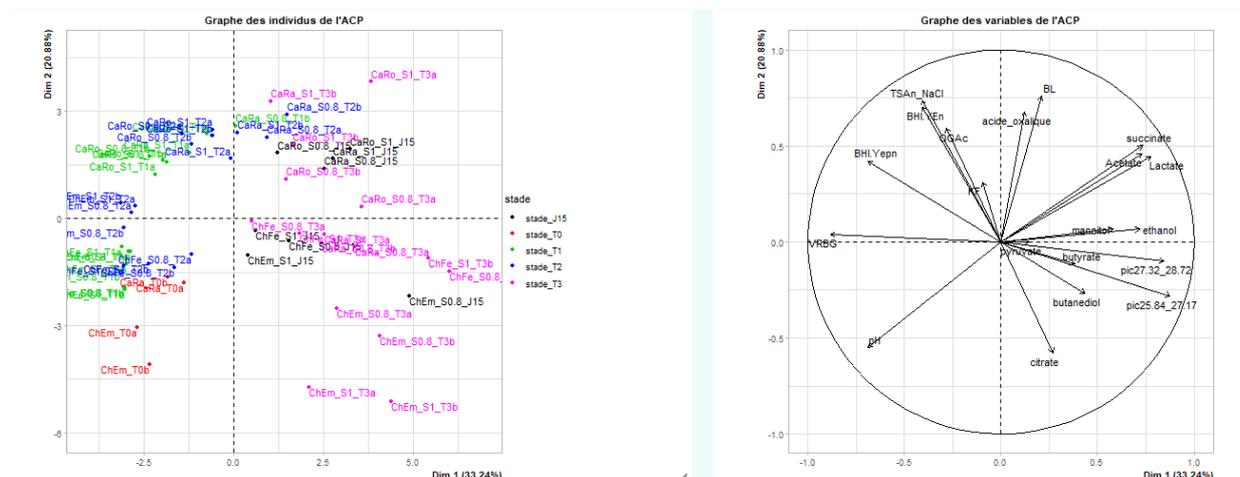
En ce qui concerne l'éthanol, sa concentration était plus élevée pour les carottes en rondelles. Elle augmentait rapidement pour atteindre son pic à environ 60 h de fermentation. A la fin de la fermentation elle atteignait une concentration d'environ 1,6 g.L<sup>-1</sup> dans les rondelles et de 0,9 g.L<sup>-1</sup> dans la carotte râpée (Figure 7c).



**Figure 6.** Concentrations en acide lactique (a), acide acétique (b) et éthanol (c) pendant la fermentation de la carotte. Les symboles représentent les résultats individuels observés

pour deux répliques biologiques (bocaux différents) et la courbe l'allure à partir des moyennes des points.

### 3.4 Analyse en composantes principales (ACP) des données de pH, composition microbiologique et biochimique des échantillons de légumes au cours de la fermentation



**Figure 7.** Graphique représentant les modalités des variables actives utilisées pour l'ACP (a) et la répartition des individus, c'est-à-dire les échantillons de légumes fermentés (b).

Les résultats d'analyse du pH, des dénombrements (7 variables, exprimées en logUFC/g) et des analyses de métabolites (12 variables) pour 60 échantillons de légumes fermentés (60 individus) ont été analysés par analyse en composantes principales (ACP), afin d'illustrer au mieux le tableau des données et de rechercher les différences et les ressemblances entre individus et les corrélations entre variables.

Les 2 premiers axes de l'ACP expriment plus de 54 % de l'inertie (information) totale du jeu de données (figure 7). Comme le montre le graphe des variables (figure 7a) L'axe 1 est positivement associé à la concentration en éthanol et en deux composés non identifiés et négativement associé à la concentration en entérobactéries (« VRBG »). L'axe 2 est positivement associé à la concentration en bactéries lactiques (BL), bactéries totales (BHI-Yen) et bactéries halotolérantes (TSAn NaCl). De plus, les deux premiers axes sont positivement associés à la concentration en acides organiques principaux (acides lactique et acétique) et en acide succinique, et négativement associés à la valeur du pH.

Le graphe des individus (figure 7b) montre que les échantillons âgés de moins de 3 à 4 jours (T0, T1 et T2 respectivement représentés en rouge, vert et bleu), se situent à gauche, négativement associés à l'axe 1, alors que les échantillons âgés de plus de 15 jours (J15 et T3 respectivement représentés en noir et rose), se situent à droite, positivement associés à l'axe 1. Cet axe sépare donc les échantillons « jeunes » associés à des concentrations

élevées en entérobactéries des échantillons fermentés associés à des concentrations élevées en métabolites. Plus précisément, la plupart des échantillons de chou (ChEm et ChFe) à T1 et T2 se situent près des échantillons T0 dans le quartant inférieur gauche et apparaissent donc peu fermentés. Ces échantillons sont caractérisés par un pH élevé, des teneurs élevées en entérobactéries et des concentrations faibles en métabolites. De plus, tous les échantillons carotte (CaRa et Caro) sont positivement associés à l'axe 2 alors que les échantillons de chou (ChEm et ChFe) sont négativement associés à l'axe 2, montrant que globalement, les échantillons de carottes ont une teneur plus élevée en BL que les choux. Le graphe des individus montre également que les répliques sont assez dispersés pour les échantillons âgés de plus de 15 jours, montrant une diversité de profils microbiologiques et biochimiques.

Les échantillons ne se distinguent très peu en fonction de la découpe et du taux de sel, montrant que ces deux facteurs jouent beaucoup moins que le légume.

### **3.5 Profil des sucres dans la saumure pendant la fermentation**

La quantification des sucres dans les saumures a montré que les principaux sucres retrouvés dans les saumures du chou et de la carotte sont le saccharose, le glucose et le fructose (Tableau 5).

La diffusion des sucres contenus dans les légumes vers la saumure est plus rapide dans les légumes émincés/râpés que dans les feuilles/rondelles.

La carotte est un légume plus riche en sucres que le chou (25). De ce fait, la quantité de sucres observée dans la saumure de carottes est plus élevée que celle retrouvée dans la saumure des choux, ce qui favorise probablement un démarrage plus rapide de la fermentation.

Les tableaux 5 et 6 montrent qu'après environ 686 h de fermentation, les saumures contiennent encore des sucres, essentiellement du glucose et du fructose. La teneur en sucre ne constitue donc pas un facteur limitant pour la croissance microbienne. Ces résultats montrent également la présence d'une variabilité parfois très élevée entre les répliques (a et b). On peut par exemple observer que les échantillons ont et b de carottes râpées avec 1% de sel contiennent respectivement 4,84 et 0,8 g.L<sup>-1</sup> de glucose.

**Tableau 5.** Concentration des principaux sucres retrouvés dans la saumure des choux et

		Temps (h)	Glucose	Saccharose	Fructose
Choux	Émincé	0	0,47	0,10	0,34
	<u>a</u> Émincé 0,8 %	686	1,98	0,03	0,26
	<u>b</u> Émincé 0,8 %	686	2,79	0,01	0,24
	<u>a</u> Émincé 1 %	686	3,94	0,07	0,35
	<u>b</u> Émincé 1 %	686	3,95	0,03	0,35
	Feuille 0	0	0,15	0,03	0,10
	<u>a</u> Feuille 0,8 %	686	1,59	0,08	0,10
	<u>b</u> Feuille 0,8 %	686	4,64	0,11	0,83
	<u>a</u> Feuille 1 %	686	1,65	0,17	1,64
	<u>b</u> Feuille 1 %	686	1,51	0,00	0,24

après fermentation (g/kg). Moyennes de 2 répliques biologiques (bocaux différents).

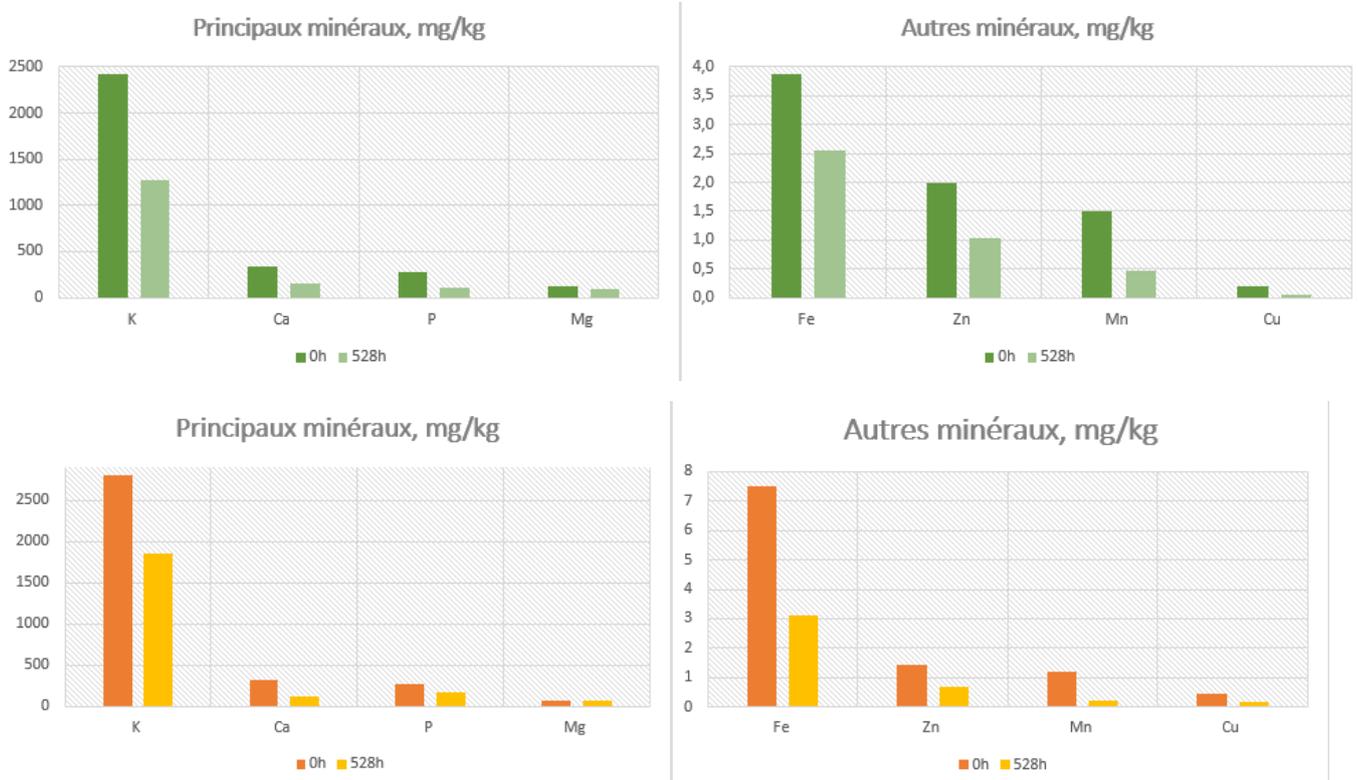
**Tableau 6.** Concentration des principaux sucres retrouvés dans la saumure des carottes avant et après 686 h de fermentation (g/Kg). Moyennes de a et b : 2 répliques biologiques

		Temps (h)	Glucose	Saccharose	Fructose
Carotte	Râpé	0	4,22	6,05	3,65
	<u>a</u> Râpé 0,8 %	686	4,49	0,98	0,32
	<u>b</u> Râpé 0,8 %	686	3,50	0,97	0,21
	<u>a</u> Râpé 1 %	686	4,84	1,39	0,37
	<u>b</u> Râpé 1 %	686	0,88	0,61	0,18
	Rondelle	0	0,18	0,34	0,17
	<u>a</u> Rondelle 0,8 %	686	2,50	0,81	0,39
	<u>b</u> Rondelle 0,8 %	686	2,85	0,91	0,14
	<u>a</u> Rondelle 1 %	686	0,06	0,77	0,05
	<u>b</u> Rondelle 1 %	686	0,01	0,51	0,00

(bocaux différents)

### 3.6 Changements de la composition en minéraux durant la fermentation

**Figure 8.** Concentration en minéraux dans les légumes (choux en vert, carottes en orange) avant fermentation comparée à la concentration en minéraux de la saumure après 528 h de fermentation.



Le chou et la carotte représentent une source de minéraux tels que le K, Ca, P, Mg. Dans le but de déterminer en quoi la fermentation modifie la teneur en minéraux des légumes fermentés, c'est-à-dire la fraction consommée, le jus n'étant pas systématiquement consommé, la teneur en minéraux des légumes frais et de la saumure après 528 h de fermentation ont été analysés. Les résultats sont représentés dans la figure 8.

Les résultats montrent qu'une partie des minéraux contenus dans les légumes diffusaient dans la saumure. Dans les échantillons de choux, 20 à 60 % des minéraux majeurs (K, Ca, P, Mg) et 50 à 70 % des minéraux mineurs (Fe, Zn, Mn, Cu) étaient « perdus » dans la saumure. En ce qui concerne les carottes, 40 à 98 % des minéraux majeurs et 18 à 45 % des minéraux mineurs diffusaient dans la saumure après 528 h de fermentation.

## 4 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La présente étude avait pour objectif d'étudier les changements microbiologiques et biochimiques au cours de la fermentation de deux légumes fermentés, le chou et la carotte, et d'évaluer pour ces légumes l'impact de deux paramètres de fabrication : le degré de découpe et la concentration en sel.

Les résultats obtenus ont montré une croissance rapide des BL dans tous les échantillons, accompagnée d'un déclin des entérobactéries. La recherche de bactéries pathogènes a permis de mettre en évidence l'absence de salmonelles, de *Listeria monocytogenes*, et de staphylocoques à coagulase positive. Des colonies suspectes ont été isolées sur milieu destiné à la recherche de *B. cereus* et sont en cours d'indentification. Une identification moléculaire par séquençage du gène de l'ARNr 16S des colonies isolées sur les différents milieux est en cours et permettra de mieux comprendre les résultats de dénombrements obtenus dans cette étude. La concentration de sel et le degré de découpe n'ont pas statistiquement influencé les concentrations dénombrées en micro-organismes dans les légumes fermentés.

Le suivi du pH a montré que ce dernier baissait de manière plus rapide pour les carottes que pour les choux fermentés mais que les paramètres de fabrication testés n'avaient pas d'effet significatif sur son évolution. L'analyse des métabolites produits au cours de la fermentation a montré que les principaux métabolites produits étaient l'acide lactique, l'acide acétique, le mannitol et l'éthanol. Les résultats statistiques ont montré que seul le paramètre « découpe » avait un effet significatif, sur les échantillons de chou.

Les analyses des sucres et des minéraux contenus dans la saumure ont permis de voir qu'une grande partie est perdue dans la saumure, cette dernière n'étant généralement pas consommée.

Une grande variabilité entre les répliques biologiques a été observée, ce qui pourrait être dû au fait que les bocaux ne soient pas au même stade de la fermentation au moment de l'analyse. Il serait donc intéressant pour la suite de l'étude de prévoir un plus grand nombre de répliques.

## 5 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Galimberti A, Bruno A, Agostinetti G, Casiraghi M, Guzzetti L, Labra M. 2021. Fermented food products in the era of globalization: tradition meets biotechnology innovations. *Curr Opin Biotechnol* 70:36–41.
2. Breidt F, McFeeters RF, Perez-Diaz I, Lee C-H. 2014. Fermented Vegetables, p. 841–855. *In* Doyle, MP, Buchanan, RL (eds.), *Food Microbiology*. ASM Press, Washington, DC, USA.
3. Marco ML, Heeney D, Binda S, Cifelli CJ, Cotter PD, Foligné B, Gänzle M, Kort R, Pasin G, Pihlanto A, Smid EJ, Hutkins R. 2017. Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Curr Opin Biotechnol* 44:94–102.
4. Şanlıer N, Gökçen BB, Sezgin AC. 2019. Health benefits of fermented foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 59:506–527.
5. Salazar N, Gueimonde M, de los Reyes-Gavilán CG, Ruas-Madiedo P. 2016. Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria as Fermentable Substrates by the Intestinal Microbiota. *Crit Rev Food Sci Nutr* 56:1440–1453.
6. Wu R, Song X, Liu Q, Ma D, Xu F, Wang Q, Tang X, Wu J. 2016. Gene expression of *Lactobacillus plantarum* FS5-5 in response to salt stress. *Ann Microbiol* 66:1181–1188.
7. Hutkins RW. 2018. *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. John Wiley & Sons.
8. Tamang JP. 2015. *Health Benefits of Fermented Foods and Beverages*. CRC Press.
9. Buckenhueskes HJ. 2014. *Advances in Fermented Foods and Beverages - 1st Edition* W Holzapfel. Woodhead Publishing is an imprint of Elsevier.
10. He Z, Chen H, Wang X, Lin X, Ji C, Li S, Liang H. 2020. Effects of different temperatures on bacterial diversity and volatile flavor compounds during the fermentation of suancai, a traditional fermented vegetable food from northeastern China. *LWT* 118:108773.
11. Thakur PK, Panja P, Kabir J. 2017. Effect of Temperature on Fermentation and Quality of Sauerkraut. *Indian J Ecol*.
12. Leroy F, De Vuyst L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci Technol* 15:67–78.
13. Dortu C, Thonart P. 2009. Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol Agron Soc Env* 12.

14. Ben-Harb S, Saint-Eve A, Panouillé M, Souchon I, Bonnarne P, Dugat-Bony E, Irlinger F. 2019. Design of microbial consortia for the fermentation of pea-protein-enriched emulsions. *Int J Food Microbiol* 293:124–136.
15. H R, V G, C F-F. 2009. Biodiversity of lactic acid bacteria in French wheat sourdough as determined by molecular characterization using species-specific PCR. *Int J Food Microbiol* 135:53–59.
16. Tamang JP, Watanabe K, Holzapfel WH. 2016. Review: Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages. *Front Microbiol* 7.
17. Vartoukian SR, Palmer RM, Wade WG. 2010. Strategies for culture of 'unculturable' bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 309:1–7.
18. Zhao N, Cai J, Zhang C, Guo Z, Lu W, Yang B, Tian F-W, Liu X-M, Zhang H, Chen W. 2017. Suitability of various DNA extraction methods for a traditional Chinese paocai system. *Bioengineered* 8:642–650.
19. Godon JJ, Zumstein E, Dabert P, Habouzit F, Moletta R. 1997. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* 63:2802–2813.
20. 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 Microbiol* 33:185–196.
21. Pogačić T, Maillard M-B, Leclerc A, Hervé C, Chuat V, Yee AL, Valence F, Thierry A. 2015. A methodological approach to screen diverse cheese-related bacteria for their ability to produce aroma compounds. *Food Microbiol* 46:145–153.
22. Müller A, Rösch N, Cho G-S, Meinhardt A-K, Kabisch J, Habermann D, Böhnlein C, Brinks E, Greiner R, Franz CMAP. 2018. Influence of iodized table salt on fermentation characteristics and bacterial diversity during sauerkraut fermentation. *Food Microbiol* 76:473–480.
23. Liang H, He Z, Wang X, Song G, Chen H, Lin X, Ji C, Li S. 2020. Effects of salt concentration on microbial diversity and volatile compounds during suancai fermentation. *Food Microbiol* 91:103537.
24. Ricci A, Bernini V, Maoloni A, Cirlini M, Galaverna G, Neviani E, Lazzi C. 2019. Vegetable By-Product Lacto-Fermentation as a New Source of Antimicrobial Compounds. *Microorganisms* 7.
25. Ciqual Table de composition nutritionnelle des aliments.

## **Résumé**

Les légumes fermentés, constituent une source importante de vitamines, de minéraux mais aussi un apport important de micro-organismes au tractus gastro-intestinal. La fermentation permet d'augmenter la durée de conservation des légumes et contribue à l'amélioration des caractéristiques organoleptiques. La nature des micro-organismes impliqués dans la fermentation détermine les caractéristiques des aliments fermentés.

En raison de ses bénéfices, la fermentation des légumes connaît aujourd'hui un intérêt croissant auprès des industriels et des citoyens. Le projet participatif FLEGME (Fermentation des LEGuMEs), financé par les régions Pays de la Loire et Bretagne, a pour objectif d'obtenir une vision globale de la fermentation des légumes en France. Ce stage, réalisé à l'unité STLO, à l'INRAE de Rennes, avait pour objectif d'étudier l'impact de paramètres de fabrication sur les communautés microbiennes et les caractéristiques physico-chimiques des LF. Pour cela, deux légumes (chou et carotte) ont été étudiés selon deux modalités : le degré de découpe (Carottes : râpées, rondelles ; choux : émincés, feuilles) et la concentration en sel (1%, 0,8%). La croissance de différentes populations de micro-organismes présents dans les légumes fermentés, l'évolution du pH et la composition en différents métabolites (acides organiques produits, sucres et minéraux) déterminée, afin d'établir un lien avec les paramètres de fabrication. Les résultats ont montré qu'aucun des taux de sel testés n'avaient d'effet significatif sur l'ensemble des variables. Seule la découpe avait un effet significatif sur les échantillons de chou. L'analyse ACP a montré que les échantillons se distinguent très peu en fonction de la découpe et du taux de sel, montrant que ces deux facteurs jouent beaucoup moins que le légume.

Mots clés : Légumes fermentés, bactéries lactiques, métabolites, participatif

## **Summary**

Fermented vegetables are an important source of vitamins and minerals, but also an important source of micro-organisms to the gastrointestinal tract. Fermentation increases the storage time of vegetables and contributes to the improvement of organoleptic characteristics. The nature of the microorganisms involved in fermentation determines the characteristics of fermented foods.

Because of its benefits, vegetable fermentation is nowadays of increasing interest to both industry and citizens. The participative project FLEGME (Fermentation des LEGuMEs), financed by le pays de la Loire and Bretagne region, aims to obtain a global vision of vegetable fermentation in France. This internship, carried out at the STLO unit, at INRAE in Rennes, aimed to study the impact of manufacturing parameters on microbial communities and the physicochemical characteristics of LF. For this purpose, two vegetables (cabbage and carrot) were studied according to two modalities: the degree of cutting (carrots: grated, sliced; cabbage: sliced, leaves) and the salt concentration (1%, 0.8%). The growth of different populations of microorganisms present in the fermented vegetables, the evolution of pH and the composition of different metabolites (organic acids produced, sugars and minerals) were determined, in order to establish a link with the manufacturing parameters. The results showed that none of the salt levels tested had a significant effect on all variables. Only the type of cut had a significant effect on the cabbage samples. The PCA analysis showed that the samples differed very little by cut and salt level, showing that these two factors play much less of a role than the vegetable.

Key words: Fermented vegetables, lactic acid bacteria, metabolites, participatory