



HAL
open science

Etude des cinétiques d'acidification de différentes bactéries lactiques dans une matrice végétale et caractérisation du gel formé

Dugast Roan

► To cite this version:

Dugast Roan. Etude des cinétiques d'acidification de différentes bactéries lactiques dans une matrice végétale et caractérisation du gel formé. Ingénierie des aliments. 2023. hal-04120981

HAL Id: hal-04120981

<https://hal.inrae.fr/hal-04120981v1>

Submitted on 7 Jun 2023

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

Université Bretagne Sud
UFR Science et Sciences de l'Ingénieur

Licence Sciences de la Vie et de la Terre
Spécialité Biotechnologies

Projet N°23-002

Etude des cinétiques d'acidification de
différentes bactéries lactiques dans une
matrice végétale et caractérisation du gel
formé

Par Roan DUGAST

Stage effectué à l'INRAE UMR STLO, Rennes

Du 03 janvier au 24 février 2023

Sous la direction de Marielle HAREL-OGER

Table des matières

Liste des tableaux	3
Liste des figures	3
Remerciements.....	4
Introduction	5
Partie 1 : Etude bibliographique.....	7
1. Les bactéries lactiques.....	7
1.1. Description générale.....	7
1.2. Description génétique.....	8
1.3. Métabolisme fermentaire : cas de la fermentation des hexoses.....	9
1.4. Application alimentaire de la fermentation	10
1.4.1. La bioprotection.....	10
1.4.2. Les Probiotiques	11
2. Le soja.....	11
2.1. Composition	11
2.2. Utilisation technologique dans l'alimentation.....	14
3. La fermentation lactique du soja	14
3.1 Bactérie capable de fermenter le jus de soja	15
Partie 2 : Matériels et Méthodes	16
1. Mise au points des cinétique d'acidification	17
1.1 Matériels.....	17
1.1.1. Matériels biologiques.....	17
1.1.2. Matrices de fermentations	17
1.2 Méthode.....	18
2. Caractérisation des coagulums.....	19
2.1 Evaluation par texturométrie	19
2.2 Evaluation sensorielle.....	19
3. Analyses microbiologiques.....	19
3.1 Milieux de culture.....	19
3.2 Dénombrement bactériens.....	20
4. Règle de décision.....	21
Partie 3 : Résultats	22
1. Cinétique d'acidification.....	22
2. Résultats études de la texture	24
2.1 Analyse par texturométrie	24

2.2	Analyse visuelle des gels.....	26
3.	Résultats microbiologiques.....	27
Partie 4 : Discussion		29
Conclusion.....		31
Références		32

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition des ferments sélectionnés.	17
Tableau 2 : Préparation de l'échantillon	18
Tableau 3 : Composition des milieux de culture.....	20
Tableau 4 : Plan d'analyses microbiologiques	20

Liste des figures

Figure 2 : Cinétiques d'acidification.....	22
Figure 3 : Caractérisation de la fermenté des gels.....	24
Figure 4 : Etude de la texture par analyse visuelle	26
Figure 5 : Evaluation de la population bactérienne avant et après la fermentation.....	27

Remerciements

Je tiens à commencer ce rapport par adresser mes remerciements aux personnes qui ont pu, de près ou de loin, participer à mon travail au sein de l'Unité Mixte de Recherche « Science et Technologie du Lait et de l'œuf » STLO de Rennes.

Tout d'abord, je remercie Gilles GARRIC pour avoir accepté ma demande de stage dans son équipe au sein de l'équipe PLATEFORME Lait du STLO. Je le remercie pour tous ses conseils pendant mon stage.

Je tiens à remercier également madame Marielle HAREL-OGER pour m'avoir encadré tout au long de ce stage en tant que maître de stage. Je la remercie d'avoir partagé son bureau avec moi, d'avoir répondu à mes nombreuses questions et à mes interrogations pendant cette période. Je la remercie aussi pour l'aide quelle m'a apporté pour la rédaction de ce rapport.

J'adresse mes remerciements à Hélène FALENTIN pour m'avoir guidé sur toute la partie microbiologie de mon étude, tant dans la partie théorique que pratique dans la réalisation de mes essais. Merci d'avoir répondu à mes questions et de m'avoir orienté pour la mise en place des protocoles de mes essais.

Je merci également Marie-Hélène FAMELART pour toute la partie analyse de texture de ce rapport. Pour m'avoir indiqué le fonctionnement des appareils et pour les explications associées aux problématiques « textures ». Elle m'a également orienté sur la mise en place d'un raisonnement scientifique dans le contexte de ces analyses.

Je remercie Stéphane BEAU qui m'a bien aidé sur les parties analyses statistiques et interprétation des résultats.

Pour terminer, je remercie grandement toute l'équipe PLATEFORME et les collègues de bureau, Guillaume LESVEQUE-DE-ROSTU, Anny VIVAS, Françoise BOISSEL, Jessica MUSSET pour m'avoir intégré pendant ce stage et être venus à mon aide pour tout le côté pratique et dans la gestion de matériels et matière première. Grâce à cette équipe, mon stage s'est déroulé sous les meilleurs hospices.

Introduction

L'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement, INRAE, est réparti sur tout le territoire français, en métropole et outre-mer. Chaque unité travaille sur des thématiques précises et variées soit dans l'agriculture, l'alimentation ou l'environnement. J'ai effectué mon stage dans l'Unité Mixte de Recherche de Rennes, UMR STLO, Sciences et Technologies du Lait et de l'Œuf. Le STLO accueille 3 grandes équipes : l'équipe de recherche microbiologie (MICRO), l'équipe Bioactivité et Nutrition (BN), l'équipe Procédés Structure Fonctionnalités (PSF). Elles ont la particularité de pouvoir s'appuyer sur 2 Plateformes : le Centre International de Ressources Microbiennes des Bactéries d'Intérêt Alimentaire (CIRM BIA) et La PlateForme Lait (PFL). Celle-ci permet la mise en oeuvre de programmes de recherche sur le couple produits/procédés jusqu'à des Technology Readiness Level (TRL) de 5 à 6. C'est dans cette équipe que j'ai réalisé mon stage.

Dans notre culture alimentaire, la consommation de protéines d'origines animale et végétale n'est pas équilibrée. Le rapport actuel est de 65/35 (INRAE) respectivement. Une modification de nos modes alimentaires est nécessaire pour rééquilibrer cette balance et ainsi réduire la consommation de protéines animales au profit de protéines végétales. Ces modifications de consommation permettraient une alimentation plus durables et elles auraient un impact positif à la fois sur la santé et sur l'environnement (Jan et al. 2022). Le deuxième axe étudié est celui de la consommation de produits alimentaires fermentés notamment par des bactéries lactiques qui apportent des propriétés organoleptiques, nutritionnelles et améliorent le goût l'aspect et l'odeur des produits, tout en ayant un impact positif sur la santé du consommateur.

C'est pourquoi des unités de recherche comme le STLO se penchent sur des projets ayant un impact dans cette transition alimentaire. Mon projet lors de ce stage s'inscrit en amont d'un plus grand projet qui vise à caractériser les différents composés libérés lors de la mastication et de la digestion de deux types de fromage et de leurs substituts végétaux. Pour réaliser ce projet, l'implication de l'unité STLO est requise pour la partie « procédés de transformation » et la mise au point de quatre produits. Le projet fait intervenir deux autres unités de recherches, l'UMR INRAE BIA de Nantes et l'UMR CNRS GEPEA de Nantes.

Il existe différentes techniques pour réaliser des produits fermentés végétaux. Ces différentes techniques aboutissent très souvent à une coagulation, différente selon qu'il s'agit d'une matrice laitière ou végétale. Pour une matrice laitière, la coagulation peut être réalisée par deux voies, enzymatique et lactique. Pour la plupart des fromages, ces deux voies sont utilisées concomitamment et la prédominance de l'une sur l'autre oriente la texture finale du fromage. Pour une matrice végétale, deux voies essentielles sont utilisées : la voie acide et la voie utilisant des « sels » (sels de Calcium et sels de Magnésium essentiellement). C'est sur la voie acide adaptée aux matrices végétales à base de soja que se concentre mon étude.

Précisément, mon projet a consisté à étudier la fermentation du jus de soja par des ferments lactiques proposés par les principaux fournisseurs commerciaux et à caractériser les gels formés dans le but de les transformer en substitut de fromage par la suite.

Partie 1 : Etude bibliographique

1. Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques représentent un groupe composé de plusieurs genres bactériens. Elles sont utilisées dans de nombreux domaines tels que l'alimentation, l'agriculture ou encore dans le domaine de la santé (T 2018). Leurs utilisations dans les fermentations alimentaires sont très anciennes, elles remontent à plus de 8 000 ans avant notre ère. Les produits lactofermentés sont courants dans notre alimentation tant dans les produits laitiers (yaourts, fromages) que dans les légumes (choucroute, ...) ou encore dans les produits carnés (charcuterie sèche). Dans le domaine des produits laitiers, les bactéries lactiques ont pour rôle de convertir le sucre principal du lait, le lactose, en acide lactique. Cet acide participe à la conservation des aliments et à leur préservation face aux contaminations par des flores pathogènes ou d'altérations. Cette stratégie est qualifiée de bio protection (Franke et al. 1996). De plus, ces bactéries peuvent contribuer à la texturation des produits notamment par la production d'exo-polysaccharides qui augmentent la viscosité des produits frais par exemple (Liesink et al 1998). Dans la suite de ce chapitre va être abordé plus en détail le fonctionnement des bactéries lactiques et leurs applications dans le domaine de l'alimentation.

1.1. Description générale

Donner une description générale des bactéries lactiques n'est pas chose facile. En 1924, Orla Jensen initie une classification des bactéries lactiques selon quatre critères : la morphologie, la température optimale de croissance, le mode de fermentation du glucose et le type d'acide lactique produit (dextrogyre ou levogyre) (Orla-Jensen 1924). De nos jours, seuls les caractères phylogénétiques sont examinés et étudiés (Khalid 2011). Les bactéries lactiques constituent un groupe de bactéries possédant des similarités morphologiques, métaboliques et physiologiques. Cependant, il est plus approprié de décrire une bactérie lactique typique : celle-ci est gram positif, non sporulée, catalase négative et dépourvue de cytochrome. Cette bactérie n'est pas anaérobie stricte ou aérobie, elle est aéro-anaérobie facultative, tolérante au pH acide. Cette bactérie est strictement fermentaire avec comme produit final majoritaire, l'acide lactique suite à la fermentation des glucides.

D'un point de vue écologique, les bactéries lactiques sont principalement retrouvées dans les aliments, notamment les aliments fermentés comme le lait, la viande, les boissons ou les légumes. Cependant, les bactéries lactiques peuplent également les animaux et en particulier les mammifères en constituant la flore intestinale, buccale, ou encore vaginale. Quatre genres composent principalement les bactéries lactiques : *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus* et *Lactococcus*. Des révisions taxonomiques ont été appliquées, d'autres genres bactériens ont été ajoutés au groupe : *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, et *Weissella* (Liu et al. 2009).

1.2. Description génétique

Des analyses génétiques obtenues après les séquençages des génomes des bactéries membres de la famille des bactéries lactiques permettent de connaître plus en détail chaque genre de bactéries lactiques. Le séquençage de ces génomes a permis d'extraire et de comparer les séquences 16S codant pour la petite sous-unité de l'ARN ribosomique. Dans la partie suivante, seuls trois des principaux genres seront abordés en détail, les Streptocoques, les lactocoques et les lactobacilles :

- ***Streptococcus spp*** : *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*) est le second ferment le plus utilisé dans l'industrie alimentaire avec *Lactobacillus delbrueckii*. Il est retrouvé principalement dans les fermentations de produits laitiers comme le yaourt et certains fromages (Bintsis 2014). Il est très apprécié pour sa capacité à acidifier rapidement de par son métabolisme homolactique qui transforme tout sucre exclusivement en acide lactique. Suite à des analyses génétiques, il est possible de connaître les voies métaboliques de dégradation des sucres et des protéines ainsi que les voies de synthèse des polysaccharides ou de certains composés d'arômes . D'après la base de données NCBI, le génome de *S. thermophilus* représente 1.8 Mb. C'est un des plus petits génomes des bactéries lactiques, avec une proportion de GC de 36.8%. *S. thermophilus* sont génétiquement proches de bactéries pathogènes pour l'homme appartenant au même genre, *S. pyogenes* ou *S. pneumoniae* (Bolotin et al. 2004). Cependant, les facteurs de pathogénicité sont soit absents soit inactivés sous la forme de pseudogènes (Bolotin et al. 2004).
- ***Lactococcus spp*** : Les lactocoques sont des bactéries lactiques isolées dans un premier temps des plantes vertes (Klaenhammer et al. 2002). Les lactocoques sont appréciés pour leur capacité à acidifier rapidement le lait et à produire des métabolites à effet santé ou aromatisant, souvent à partir du catabolisme des acides aminés. *Lactococcus lactis* constitue l'un des principaux constituants des cultures de ferment. Les génomes de quatre-vingt-cinq souches de *Lactococcus lactis* ont été obtenus jusqu'à présent. La taille du génome varie de 2,3 à 2,7 Mb (Oliveira et al. 2005). Il existe des différences notables entre les souches. Par exemple, le chromosome de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MG1363 est 160 kb plus grand que celui de *Lactococcus lactis subsp. lactis* IL1403 et a une teneur moyenne en GC de 35,8%, et donc, encode plus de protéines (Bintsis 2014). *L. cremoris* -nouveau nom de *L. lactis subsp. cremoris* (Li et al. 2021) -est préférable à *L. lactis subsp. lactis* en raison de sa contribution supérieure à la saveur des produits laitiers via des mécanismes métaboliques uniques (McKay 2018). Souvent les différentes sous-espèces sont associées dans les levains.
- ***Lactobacillus spp*** : Le genre *Lactobacillus* englobe un grand nombre d'espèces différentes qui présentent un degré de diversité relativement élevé. En effet, c'est le plus

grand genre de la famille des bactéries lactiques, avec plus de cinquante espèces au total (Zheng et al. 2020). L'espèce *Lactobacillus delbrueckii* contient trois sous-espèces : subsp. *delbrueckii*, subsp. *lactis* et subsp. *bulgaricus*. Les génomes de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* ont une longueur de 1,87624 Mb et possède 1641 séquences codantes et une proportion de GC de 49,8% (Benson et al. 2018).

1.3. Métabolisme fermentaire : cas de la fermentation des hexoses

Les bactéries lactiques sont chimiotrophes. Elles tirent l'énergie nécessaire à leur fonctionnement de l'oxydation de composés chimiques qu'elles trouvent dans leur environnement (Khalid 2011). Leur métabolisme est essentiellement fermentaire. Cette fermentation des glucides entraîne une production d'ATP, de composés réducteurs (NADH) et de précurseurs ce qui permet à la cellule de réaliser des actions de biosynthèse (Salminen and Wright 2004). Les bactéries lactiques ont la capacité de dégrader différents types de glucides. Une fois cette dégradation réalisée, le produit majoritairement produit est l'acide lactique. La production de ces produits terminaux est variable. En effet, en fonction des conditions dans lesquelles évoluent la bactérie, elle peut modifier son métabolisme.

Il existe deux types de fermentation des hexoses et notamment du glucose : la première est la voie homofermentaire, production d'un seul composé terminal et la seconde hétérofermentaire, production de plusieurs composés terminaux.

Les bactéries homofermentaires, streptocoque, lactocoque, lactobacille, transforment les hexoses, principalement les glucoses, de leur environnement en acide lactique. La première phase de cette voie est la glycolyse. Celle-ci va permettre de passer d'un hexose au pyruvate. Le glucose pénètre dans la cellule et est activé par phosphorylation en glucose-6-phosphate par une hexokinase. Ce dernier est converti en fructose-5-phosphate par une isomérase puis cette molécule est phosphorylée en fructose-1,6-bisphosphate (F1,6-P) par la phosphofructokinase 1. L'aldolase va couper F1,6-P en glyceraldehyde-3-phosphate et en dihydroxyacétone phosphate. Le dihydroxyacétone phosphate est isomérisé en glyceraldehyde-3-phosphate pour poursuivre la voie. Le glyceraldehyde-3-phosphate est phosphorylé en 1,3-diphosphoglycérate par une kinase puis est converti en 3-phosphoglycérate avec production d'un ATP. Le 3-phosphoglycérate est isomérisé en 2-phosphoglycérate par la phosphoglycérate mutase. Le 2-phosphoglycérate est converti en phosphoenol pyruvate puis déphosphorylé en pyruvate pour finir cette voie métabolique avec la production d'un autre ATP. Chez les bactéries lactiques, le pyruvate est réduit en acide lactique. La conversion du pyruvate en acide lactique est due à une enzyme, la lactate-déshydrogénase dépendante du NAD⁺ (LDH) (Mozzi et al. 2010). Il existe deux formes d'acide lactique, la forme D et L. La forme produite dépend de la stéréospécificité de l'enzyme (L-LDH ou D-LDH). Dans certaines espèces de lactobacilles comme *Lactobacillus casei*, l'enzyme se trouve sous les deux formes L et D (Viana et al. 2005). Contrairement à *Lactococcus lactis*, qui produit uniquement la forme L-LDH est présente (Gaspar et al. 2007).

La seconde voie de fermentation est la voie des pentoses-phosphate ou voie du 6-phosphogluconate/phosphocétolase. La première étape sur cette voie se caractérise par une déshydrogénation avec la formation de 6-phosphogluconate suivie par une décarboxylation. Le pentose-5-phosphate (ribulose 5-P puis xylulose 5-P) restant est divisé en glycéraldéhyde-3-phosphate et en acetyl phosphate par la phosphocétolase. Le G3P est métabolisé de la même manière que dans la glycolyse entraînant la formation de pyruvate. L'acetyl phosphate est métabolisé en acide acétique d'une part et en acétyl-CoA puis acétaldehyde puis éthanol. On parle pour ce type de métabolisme d'hétérofermentation car elle conduit à la synthèse de plusieurs produits terminaux comme de l'acide lactique et acétique, de l'éthanol et du CO₂ (Salminen and Wright 2004).

Comme explicité précédemment, les bactéries qui utilisent la glycolyse comme voie métabolique du glucose sont considérées comme des bactéries lactiques homofermentaires et les bactéries qui se servent de la voie des pentoses phosphates sont considérées comme des bactéries hétérofermentaires. Cependant, cette différence doit être nuancée. En effet, dans certaines conditions des bactéries homofermentaires vont utiliser la voie des pentoses phosphates et procéder à la synthèse de différents produits terminaux en fonction des conditions environnementales (type et concentration de sucres, potentiel d'oxydo-réduction)

Pour conclure cette partie « Métabolisme », il est possible de tirer le bilan de ces voies. Les bactéries homofermentaires empruntant la voie de la glycolyse permettent la production de 2 ATP par mole de glucose consommée et conduit à la synthèse de 2 moles d'acide lactique en fin de fermentation. La fermentation hétérofermentaire du glucose par la voie des pentoses-phosphate produit une mole d'acide lactique, de CO₂ et la production d'une mole d'ATP par mole de glucose consommée et soit 1 mole d'éthanol en absence d'accepteur d'électron soit 1 mole d'acide acétique en présence de cet accepteur.

1.4. Application alimentaire de la fermentation

1.4.1. La bioprotection

La bio préservation ou bioprotection est la capacité à augmenter la durée de vie d'un produit alimentaire (viande, fruit de mer, produit laitier, etc.) par l'utilisation de microorganismes et en particulier les bactéries lactiques. Ces dernières ont le plus gros potentiel pour jouer un rôle important dans la préservation des aliments. En effet, ces bactéries sont inoffensives pour la consommation humaine et elles font partie de la microflore originelle de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, fruits, légumes etc. Le phénomène de bioprotection vient du fait que certaines souches de bactéries lactiques produisent des polypeptides, bactériocines, qui ont la capacité de lutter contre les bactéries (T 2018). Ces polypeptides ont des effets bactéricides ou bactériostatiques pour lutter contre les bactéries. Dans la plupart des

cas, les bactériocines entraînent l'inhibition de la biosynthèse des parois ou la perforation des membranes cellulaires. Quelques exemples de bactériocines : Lacticine 3147 produit par *Lactococcus*, la plantaricine produit par *Lactobacillus plantarum* ou la macedovine produit par *Streptococcus* (Castellano et al. 2008 ; T 2018). Cette production de bactériocines est très utilisée dans différents secteurs de l'alimentation pour lutter et prévenir contre les contaminations par une flore d'altération et pathogène.

1.4.2. Les Probiotiques

Les bactéries lactiques sont considérées comme le principal groupe de bactéries probiotiques (Naidu et al. 1999). Les probiotiques sont des bactéries vivantes qui apportent des effets bénéfiques sur la santé du consommateur et en particulier sur l'équilibre de la balance de son microbiote intestinal (Fuller 1989). Les probiotiques couramment retrouvés dans le commerce sont du genre *Lactobacillus spp*, *Bifidobacterium spp*, *Propionibacterium spp*. Les effets positifs des probiotiques sont généralement souche ou espèce dépendantes. C'est pourquoi le mélanges des souches et des espèces est couramment réalisé pour bénéficier d'un effet positif global. Les effets peuvent être nombreux. Parmi ces effets, on retrouve la tolérance au lactose, une meilleure assimilation du cholestérol, une stimulation du système immunitaire ou encore une diminution des maladies inflammatoires (Panagiota et al. 2013). Depuis le progrès des études omiques et notamment génomiques, des études sont menées sur l'enrichissement des aliments avec des probiotiques avec des effets santé dans le but de fabriquer des produits alimentaires capables de prévenir de maladies ou d'inflammations.

2. Le soja

2.1. Composition

La graine de soja est étudiée depuis de nombreuses années. Il donc est possible d'avoir une idée précise de sa composition. Dans cette partie, seulement trois des composants seront abordés et détaillés, mais la composition de la graine est très riche. Les macromolécules principales de la graine de soja sont les protides, les lipides et les glucides.

- Protides

Les protéines constituent l'élément le plus abondant dans la graine de soja. Elles représentent à elles seules 40 à 41% de la matière sèche (Medic et al. 2014). Les protéines peuvent être classées en quatre catégories : métaboliques, structurales, membranaires et de stockage (Krishnan 2000).

Les protéines de stockage sont les plus abondantes : 65-80% des protéines totales (Murphy 2008). Ces protéines de stockage fournissent les acides aminés à la graine lors de la germination. Deux protéines prédominent quantitativement : la glycinin (legumin 11S) et la β -conglycinin (globulins 7S), respectivement 40% et 25% du total des protéines. La glycinin est un hexamère composé de deux trimères liés par des interactions hydrophobes, électrostatiques et des ponts ioniques (Zarkadas et al. 2007). Les sous-unités monomériques formant les trimères sont constituées de polypeptides acides et basiques liés de manière covalente entre eux par des ponts disulfures (Medic et al. 2014). La β -conglycinin est une glycoprotéine composée de trois sous-unités α , α' et β (Medic et al. 2014). Ces sous-unités sont assemblées entre elles par des interactions hydrophobes fortes et des ponts hydrogènes. Les sous-unités protéiques sont liées de manière covalente au mannose et au glucosamine et représentent 5% de la masse moléculaire de la protéine.

La glycinin et la β -conglycinin possèdent des propriétés intéressantes dans le secteur de la production alimentaire. En effet, grâce à son organisation, la glycinin est capable de former un gel rigide et résistant. Ces propriétés sont dues à la présence de groupement sulfhydryle. La β -conglycinin, quant à elle, possède des capacités émulsifiantes et joue un rôle dans la stabilisation des émulsions. Ces protéines de stockage possèdent également des intérêts en santé et de nutrition. Elles permettent un apport en acides aminés essentiels à l'organisme notamment la glycinin qui est une source d'acides aminés soufrés (méthionine et cystéine).

La graine de soja contient d'autres protéines mais de façon moins abondante. Nombreuses de ces protéines possèdent des composants anti-métaboliques qui peuvent être la cible du système immunitaire et entraîner des réponses allergiques de l'organisme ou des réactions gastro-intestinales (Herman 2005).

- Lipides 64542

Les lipides représentent un stockage énergétique pour la plante. Ils constituent également les membranes des cellules. Ils jouent un rôle dans la signalisation moléculaire ou encore dans la défense contre les pathogènes. Dans la graine de soja, les lipides représentent entre 8.1% et 24% de la matière sèche (Medic et al. 2014).

Le stockage des lipides se fait principalement sous la forme de triglycérides. C'est un ester de trois acides gras liés à une molécule de glycérol. L'acide gras le plus abondant dans la graine de soja est l'acide linoléique (18:2), suivi par l'acide oléique (18:1), l'acide palmitique (16:0) et l'acide stéarique (18:0) (Medic et al. 2014; Johnson et al. 2015). La position des acides gras sur le glycérol est déterminée en fonction de la spécificité des lipases de la plante. Les acides gras saturés à longue chaîne carbonée sont placés proportionnellement sur les positions 1 et 3 du glycérol. Les acides linoléique et oléique peuvent occuper ces deux positions, les autres acides gras se positionnant dans les positions restantes (Johnson et al. 2015).

La composition en acides gras détermine la qualité nutritionnelle et fonctionnelle d'une huile. Elle détermine également son goût, sa stabilité vis-à-vis de l'oxydation, son point de fusion et de cristallisation (Wang et al. 1997). L'huile issue du soja possède une bonne qualité nutritionnelle par sa composition en acides gras insaturés comme l'acide oléique et linoléique. De plus, les acides linoléique et linolénique sont des acides gras essentiels : l'organisme humain n'est pas capable de les synthétiser mais ils sont nécessaires à son fonctionnement. Cependant l'huile de soja est relativement instable à cause des acides gras insaturés comme l'acide linoléique qui est majoritaire dans le soja et sensible à l'oxydation. Elle entraîne un développement de goût de rance.

Les autres lipides présents dans la graine de soja sont principalement les lipides constitutifs des membranes cellulaires, majoritairement des phospholipides. Ils représentent environ 3% des lipides (Wang et al. 1997). La différence avec les triglycérides vient du fait que sur la position 3 du glycérol est positionné un groupement phosphate. Dans le milieu industriel, cette fraction lipidique, contenant une grande proportion de phospholipides, est considérée comme de la lecithine de soja et est utilisée comme émulsifiant. Cette fraction est composée de phosphatidylcholines, de phosphatidylethanolamines et de phosphatidylinositols (Wang et al. 1997).

- Glucides

La matière sèche de la graine de soja est composée à 35% de glucides, principalement retrouvée dans l'enveloppe de la graine, 86% des glucides totaux. Dans le soja, il est possible de distinguer deux types de glucides : structuraux et non structuraux (Karr-Lilienthal et al. 2005). Les glucides de structure sont des polysaccharides qui composent les parois cellulaires. Ce sont principalement de la cellulose, de l'hémicellulose et de la pectine. Les glucides non-structuraux sont composés de différents oses, di et polyosides (Medic et al. 2014).

Les glucides de structure, cellulose, etc. sont considérés dans l'alimentation comme des fibres. Ces fibres nécessitent l'action d'enzymes pour les dégrader notamment la cellulase. Cette enzyme est présente dans le système digestif des animaux ruminant ce qui leur permet de l'assimiler. Les glucides de la paroi cellulaire n'ont pas de réel intérêt dans la technologie alimentaire mais constituent un bon aliment pour l'homme. En effet, l'Homme n'est pas capable de dégrader ces fibres ce qui augmentent le bol alimentaire et facilitent le transit intestinal.

Les glucides non-structuraux représentent entre 11 et 25% des glucides de la graine. Dans le soja, il est possible de distinguer une vingtaine de glucides différents (Obendorf et al. 2008). Les glucides les plus abondants sont le saccharose, le raffinose et le stachyose. Le raffinose, le stachyose et le verbascose sont des galactooligosaccharides. Ce sont des chaînes glucidiques constituées de 2 à 9 monomères de galactose liés avec un monosaccharide de glucose. Le raffinose est constitué d'un monomère de galactose lié à un saccharose par une liaison $\alpha 1 \rightarrow 6$ glucidique. La stachyose et le verbascose sont composés également d'un saccharose lié de la même manière à respectivement 2 et 3 galactoses (Medic et al. 2014). Ces glucides peuvent être

à l'origine de troubles de la digestion chez l'Homme. Le rôle de ces sucres dans la graine est le stockage et le transport des glucides dans la maturation de la graine (Dey and Dixon 1985).

2.2. Utilisation technologique dans l'alimentation

Il existe différents produits dérivés du soja obtenus suite à sa transformation. Ces différents produits dérivés sont utilisés dans l'alimentation à travers le monde.

- Huile de soja

L'huile de soja est une des huiles végétales alimentaires la plus consommée dans le monde. Cette huile est obtenue suite à la torréfaction des graines de soja. Celles-ci vont subir une opération d'extraction de l'huile. Cette huile brute est traitée avec des étapes de désodorisation puis de raffinage pour arriver à une huile finale consommable. Les coproduits de la production d'huile de soja sont valorisés dans l'alimentation animale (Johnson et al. 2015).

- Farine de soja

La farine de soja est obtenue suite au dépelliculage des graines de soja. Ces graines dépelliculées sont par la suite broyées et tamisées comme dans un processus de farine traditionnelle. Il est possible de retrouver sur le marché différents types de farine de soja : farine dégraissée, farine complète, farine toastée, etc. Les utilisations majeures de la farine de soja sont dans l'alimentation infantile et les produits pâtisseries (Berk 1993).

- Concentrat et isolat de protéines de soja

Ces matières premières sont issues de la farine de soja. Ce sont des concentrés de protéines qui doivent respecter une teneur minimale de 70% pour le concentrat et de 90% pour l'isolat. Ces produits sont principalement utilisés dans des régimes alimentaires de personnes déficitaires en protéines ou dans des formulations de produits alimentaires industriels (Berk 1993).

- Jus de soja

Le jus de soja est un extrait aqueux de couleur blanc jaunâtre obtenu suite à différentes opérations unitaires. Les graines de soja sont, dans un premier temps, trempées, puis broyées et filtrées pour obtenir un jus sans coproduit. Le jus de soja peut subir, par la suite, des traitements de stabilisation pour garantir la sécurité sanitaire du produit comme un traitement de stérilisation avant le conditionnement. Le jus peut être en définitive consommé comme boisson en substitut au lait de mammifères ou bien entrer dans la fabrication de produits comme le tofu, des yaourts ou autres substituts aux produits animaux (De Staercke 1990).

3. La fermentation lactique du soja

La fermentation du jus de soja est variable et dépend de nombreux paramètres : la composition de la matière première initiale, sa composition en glucides fermentescibles etc. Les bactéries lactiques utilisées pour la fermentation ont également un impact sur celle-ci. La fermentation est également pilotée par un certain nombre de paramètres, comme la température qui influence le bon déroulement du développement des bactéries dans le jus de soja. (Harlé et al. 2020)

3.1 Bactéries capables de fermenter le jus de soja

De nombreux microorganismes colonisent la surface des fruits, légumes et céréales crus. Ils sont principalement représentés par des bactéries aérobies gram-négatives ainsi que des levures et des moisissures. Les bactéries lactiques ne représentent qu'une petite partie de la communauté primaire. *Weissella cibaria/confusa* et *Lactiplantibacillus plantarum* sont les espèces les plus communes (Di Cagno et al. 2013). La plupart des plantes, des légumes et des fruits peuvent subir une fermentation lactique spontanée si les conditions appropriées sont réunies c'est-à-dire absence d'oxygène, des conditions osmotiques appropriées, humidité et concentration de sel et température modérées. D'autres micro-organismes c'est-à-dire les bactéries gram-négatives, les levures et les moisissures, sont éliminées par l'ajout de sel au stade initial de la fermentation, puis par divers mécanismes, y compris la production d'acides organiques par les LAB (Gustaw et al. 2021).

Le pH d'un produit fermenté est un facteur important étroitement lié à l'activité des micro-organismes impliqués dans la fermentation. Il contribue à la stabilité microbiologique contre les bactéries pathogènes et l'altération. La réduction du pH est plus rapide lors de la fermentation effectuée par *Lactobacillus plantarum* qu'en présence de *Lactobacillus helveticus*. Ceci est lié à la capacité de certaines souches bactériennes à produire des acides organiques (Fujita et al. 2017). Ces composés sont générés dans le processus de décomposition de la matière organique par les microbes. La présence d'acides organiques, en particulier d'acide lactique, réduit le pH à 5,0 ou moins (Indasah and Muhith 2020). Le mécanisme de ce phénomène est basé sur la dissociation acide entraînant la libération d'ions hydrogène qui modifie l'équilibre de la solution et diminue le pH.

Une étude menée sur un panel de plus de 300 bactéries lactiques met en évidence qu'elles ne sont pas toutes capables de croître dans le soja et en particulier dans le jus. En effet, les sources de glucides, de protéines ne sont pas les mêmes que dans d'autres matrices comme le lait par exemple (Harlé et al. 2020). Il est possible suite à la fermentation du jus de soja d'obtenir des produits comparables à des yaourts, sans pouvoir en prendre le nom. Ces jus de soja fermentés sont obtenus par l'action des bactéries classiques du yaourt, *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii*. Le processus de fabrication est également similaire à celui de la fabrication de yaourt :

- Préparation des matières premières avec standardisation en matières protéique et grasse suivi d'un traitement thermique ;
- Ensemencement en micro-organismes
- Fermentation à des températures optimales pour le développement bactérien soit 43°C
- Refroidissement.

Exemple de *Streptococcus thermophilus* :

Une étude (Harlé et al. 2020) a démontré que *Streptococcus thermophilus* pouvait se développer dans le jus de soja et l'acidifier rapidement. De plus, la bactérie présentait une dynamique de croissance et d'acidification similaire dans le jus de soja et le lait de vache. Elle consomme du saccharose pour croître ce qui entraîne la production d'acide lactique et, à son tour, l'acidification préserve le jus de soja de contaminations microbiennes. Ces travaux ont également permis d'établir la première carte protéinique de *Streptococcus thermophilus* cultivé dans le jus de soja, qui a mis en évidence l'importance du métabolisme de l'azote. En outre, il a été découvert que la protéase membranaire PrtS est impliquée dans la croissance de la bactérie dans le jus de soja et la protéolyse des protéines de soja. La capacité de *S. thermophilus* à hydrolyser les protéines de soja pourrait aider à améliorer la digestibilité des produits contenant du soja et offrir des avantages pour la santé, comme la réduction de l'allergénicité à ces protéines ou la modulation de la production de peptides potentiellement bioactifs. L'identification des peptides et, plus généralement, des métabolites présents après fermentation devrait permettre de mieux comprendre les propriétés organoleptiques et probiotiques des produits à base de soja fermentés avec *S. thermophilus* ou avec d'autres bactéries lactiques (Boulay et al. 2020).

Partie 2 : Matériels et Méthodes

1. Mise au point des cinétiques d'acidification

1.1 Matériels

1.1.1. Matériels biologiques

Les bactéries sélectionnées pour cette étude résultent de recherches et de conseils collectés auprès des fournisseurs de ferments commerciaux. Les bactéries entrent dans la composition de ferments commerciaux utilisés dans l'industrie de la fermentation de matrices végétales. Dans cette étude, 2 fournisseurs ont été contactés : DANISCO Copenhague (Danemark) et STANDA Caen (France). Des échantillons de ferments ont été commandés pour être testés. La dénomination et la composition des ferments sont explicitées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Composition des ferments sélectionnés.

Fournisseurs	Ferments acidifiants	Espèces de compositions	Code échantillon	classe de température	Température de fermentation	Dose
Danisco						
	Vege 047	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	D1	Thermophile	43°C	10D/100L
	Vege ST040	<i>Streptococcus thermophilus</i>	D2	Thermophile	43°C	10D/100L
Standa						
	PAL DIA VEG	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	S1	Mésophile	30°C	10D/10L
	PAL LACTIC LC 2229 VEG	<i>Lactobacillus casei</i> ou <i>Lactobacillus paracasei</i>	S2	Mésophile	30°C	10D/10L

Un ferment est une association ou non de différentes espèces microbiennes dans le but de réaliser une fermentation sur des produits alimentaires. Les ferments sélectionnés ici font intervenir différentes espèces bactériennes, notamment des espèces thermophiles, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus* et des espèces mésophiles, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus casei* et *Lactococcus paracasei*. Ils peuvent être sous forme de bactérie isolée comme dans le « Vege ST040 » ou sous forme de consortium comme dans le « Vega047 ». Les ferments sont conditionnés dans des sachets après lyophilisation et stockés à -18°C selon les recommandations des fournisseurs.

1.1.2. Matrices de fermentation

- Jus de soja

La première matrice de fermentation étudiée lors de cette étude est le jus de soja. C'est un jus biologique UHT, conditionné en brique de 1 litre tétraformée, provenant de l'entreprise Olga (anciennement Triballat), Noyal-sous-Vilaine. Les jus employés proviennent du même lot afin de maîtriser la composition biochimique qui peut être amenée à évoluer de façon importante en jus biologique.

La composition du jus est la suivante, pour 100g : 3.80g de protéines ; 2.10g de lipides ; 0.40g de glucides ; 0.08g de sel (m/m).

1.2 Méthode

Dans un premier temps, les ferments ont été réhydratés dans du sérum physiologique stérile à 4°C. La concentration en ferment dans le sérum a été déterminée par le mode d'utilisation transmis par les fournisseurs. Les doses ont été réalisées pour ensemer 10 ou 100 litres de jus à fermenter. L'étude étant réalisée sur des volumes de 1 litre, la réhydratation a permis de réaliser la dilution. Pour un sachet de ferment destiné à ensemer 100L de matrice à fermenter, celui-ci a été dilué dans 100ml de sérum physiologique. La même méthode a été utilisée pour les sachets destinés à ensemer 10L. La réhydratation se poursuit sur une période de 10 minutes.

Pour permettre et favoriser une fermentation, les jus de soja sont préalablement enrichis en saccharose à 10g/kg, afin de ne pas subir l'effet d'une teneur limitante en sucre fermentescible. Le jus a été enrichi à 10g/kg grâce à du sirop de saccharose stérile concentré à 500g/L. Le sirop a été préparé à partir de saccharose et d'eau osmosée, mélangés dans un flacon pour être stérilisés.

Les jus sucrés ont été placés dans une enceinte thermostatée afin d'amener la température à celle de la fermentation (température de fermentation précisées dans le tableau 1).

Dans un second temps, 1ml de bactéries réhydratées a été prélevé dans le but d'inoculer le litre de jus. Afin de s'assurer de l'homogénéité de la répartition des bactéries dans le jus, les flacons ont été agités de manière circulaire pour ne pas introduire d'air dans le jus afin d'éviter de créer un stress oxydatif chez les bactéries. Après environ 20 minutes, le litre de jus ensemercé a été reparti dans des flacons stériles destinés aux différentes analyses, microbiologiques et physico-chimiques. La répartition a été réalisée comme mentionné dans le tableau 2.

Tableau 2 : Répartition de l'échantillon

Analyses	Analyses Physico-Chimiques			Analyse microbiologiques	
	Mesure de pH	Texturométrie	Analyses sensorielles	Denombrement T0	Denombrement T finale
Volume (ml)	80	5x50	4x150	20	20

Les échantillons ainsi répartis et identifiés ont été placés dans une enceinte thermostatée. Les températures de fermentation ont été déterminées suivant les températures de croissance optimales des bactéries composant le ferment.

Le suivi des pH est réalisé grâce à trois pH-mètres, WTW 3310 et 3320. Ces derniers ont au préalable été testés pour valider la répétabilité des résultats. Les sondes des appareils ont été placées au contact de l'échantillon dans un flacon avec couvercle percé pour maintenir un environnement le plus propre possible. Les relevés des pH ont été effectués automatiquement, toutes les 10 minutes, sur toute la durée de la fermentation. Les données ont été ensuite transférées sur un ordinateur personnel et traité par tableur Excel.

2. Caractérisation des coagulums

2.1 Evaluation par texturométrie

L'étude de la fermeté des coagulums obtenus suite aux fermentations a été caractérisée par texturométrie. Ce test mesure la force de pénétration d'un objet dans le gel. Pour assurer la comparaison des différents gels produits, ces derniers ont été testés au même pH, celui-ci étant fixé à 4.5+/-0.1 unité pH. Ce pH a été déterminé par recherche dans la littérature et par des pré-essais. La température a été maintenue également constante pour assurer une comparaison fiable. Cette dernière a été fixée à 4°C, température à laquelle les échantillons ont été conservés suite à la fermentation. Les tests sont réalisés 12h +/- 1h après la fin de la fermentation. Les échantillons étaient aux nombres de 5 par répétitions soient 15 pour chaque ferment.

Les tests ont été réalisés sur un texturomètre TPA+ Lloyd (Analyseur de Texture et de Pénétration), avec un objet conique de 3 cm de largeur et d'une hauteur de 2.4 cm soit un volume de 5.056 cm³. Les gels ont été conçus à partir de 50ml de matrice fermentée dans des flacons de verre. Un capteur de 5 N a été utilisé pour réaliser ces tests. L'allongement a été fixé à 20mm à une vitesse de 60mm/min. Le test mesure la force en fonction de l'allongement.

Le flacon a été placé sur le support sous l'objet fixé au capteur. Le gel a été compressé par l'objet lors de sa descente et mesure la force de compression. Une fois le test terminé l'objet remonte à son point de départ.

2.2 Evaluation visuelle

Cette analyse a pour but de qualifier uniquement visuellement le gel obtenu suite à la coagulation acide des protéines du jus de soja. L'homogénéité du gel est observée tout comme la capacité à exsuder la phase dispersée liquide dans le gel.

3. Analyses microbiologiques

3.1 Milieux de culture

Les analyses microbiologiques ont été réalisées sur 3 milieux de culture gélosés : M17, MRS (deMan, Rogosa, Sharp) et PCA (Plat Count Agar). La composition des milieux est explicitée dans le tableau 3.

Tableau 3 : Composition des milieux de cultures

Milieux	Espèces cultivées	Compositions pour 1L de milieu
M17+Lactose	<i>Streptococcus thermophilus</i>	2.50g de tryptone, 2.50g de peptone pepsique de viande, 5g de peptone papainique de soja, 2.50g d'extrait de levure, 5g de lactose, pour neutraliser l'acide lactique produit par la fermentation du lactose présence de 19g de glycérophosphate de sodium.
	<i>Lactococcus lactis</i>	
MRS	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	10g de peptone de 10g d'extrait de viande 5g d'extrait de levure 20g de glucose.
	<i>Lactobacillus casei</i>	
PCA	Flores Mésophiles Aérobie Revivifiées	5g de peptone de caséine, 2,5g d'extrait de levure et de 1g de glucose.

3.2 Dénombrements bactériens

Dans le cas de chaque ferment, le milieu de culture est adapté pour répondre aux besoins de la ou des bactéries présentes dans l'échantillon.

Tableau 4: Plan d'analyses microbiologiques

Fournisseurs	Ferments acidifiants	Espèces de compositions	Code échantillon	Milieu de culture	Volume d'incolome	Mode d'ensemencement	Température d'incubation	temps d'incubation
Danisco								
	Vege 047	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	D1	M17+Lactose MRS pH 5,4	1ml	En masse	43°C	24h
	Vege ST040	<i>Streptococcus thermophilu</i>	D2	M17+Lactose	1ml	En masse	43°C	24h
Standa								
	PAL DIA VEG	<i>Lactococcus lactis subsp.lactis biovar diacetylactis</i>	S1	M17+Lactose	1ml	En masse	30°C	24h
	PAL LACTIC LC 2229 VEG	<i>Lactobacillus caseioi</i> <i>Lactobacillus paracasei</i>	S2	MRS pH 5,5	1ml	En masse	30°C	24h

Deux échantillons ont été prélevés par répétition, le premier est prélevé à T0, immédiatement à la suite de l'inoculation. Le second est prélevé à la fin de la fermentation, c-à-d. à T final.

Le niveau de population ciblée à l'inoculation dans T0 était de 10^6 UFC/ml. Une gamme de dilutions sérielle a été réalisée. Les dilutions 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} ont été ensemencées en masse dans la gélose- en boîte de Pétri. Les boîtes ont été placées dans des étuves adaptées à la température de croissance des bactéries, 43°C ou 30°C. Les incubations ont été réalisées en condition aérobie pour les *Streptococcus* et en condition anaérobie pour les *Lactobacillus*. L'incubation dure 24h pour les *Streptococcus* et 24 à 48H pour les *Lactobacillus*. Une seule répétition est réalisée pour chaque dilution étant donné que le triplicat a été réalisé en amont lors de l'inoculation. Les dénombrements de fin de fermentation ont été réalisés dans les mêmes conditions. Dans ce cas le niveau de population ciblées était de 10^8 UFC/mL, une gamme de dilutions sérielles a également été réaliser pour un ensemencement des dilutions 10^{-6} , 10^{-7} et 10^{-8} .

Les unités formant colonies (UFC) ont été comptées sur chaque boîte de Pétri suite à l'incubation.

4. Règle de décision

La sélection du ou des ferments pour le projet a été effectuée en fonction de plusieurs critères.

- La phase de latence doit être la plus courte possible. Tous les ferments ayant une phase de latence supérieure à 3 heures ont été éliminés de l'étude car permettant le potentiel développement de germes de contamination.
- La phase d'acidification doit être la plus rapide possible, inférieure à 3 heures et doit aboutir à un pH inférieur au point isoélectrique des protéines de soja soit 4.6.
- La fermeté du gel est aussi déterminante dans la sélection du ferment. Le gel doit être le plus ferme possible afin de rendre possible des actions d'égouttage et de pressage subséquentes

Suite aux tests réalisés sur le jus de soja un ferment a été sélectionné et des tests de fermentation sur les autres matrices, farine, concentrât et isolat, ont été réalisés.

Partie 3 : Résultats

1. Cinétiques d'acidification

Cette première étude a pour objectif de suivre la fermentation du jus de soja en relevant les pH. Le jus est enrichi en saccharose pour permettre une fermentation par les bactéries lactiques et pouvoir ainsi produire de l'acide lactique qui va entraîner une baisse du pH. La figure 1 représente les cinétiques d'acidification réalisées par les différents ferments de l'étude. 4 ferments ont été testés : *Streptococcus thermophilus*+*Lactobacillus delbrueckii*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus casei*.

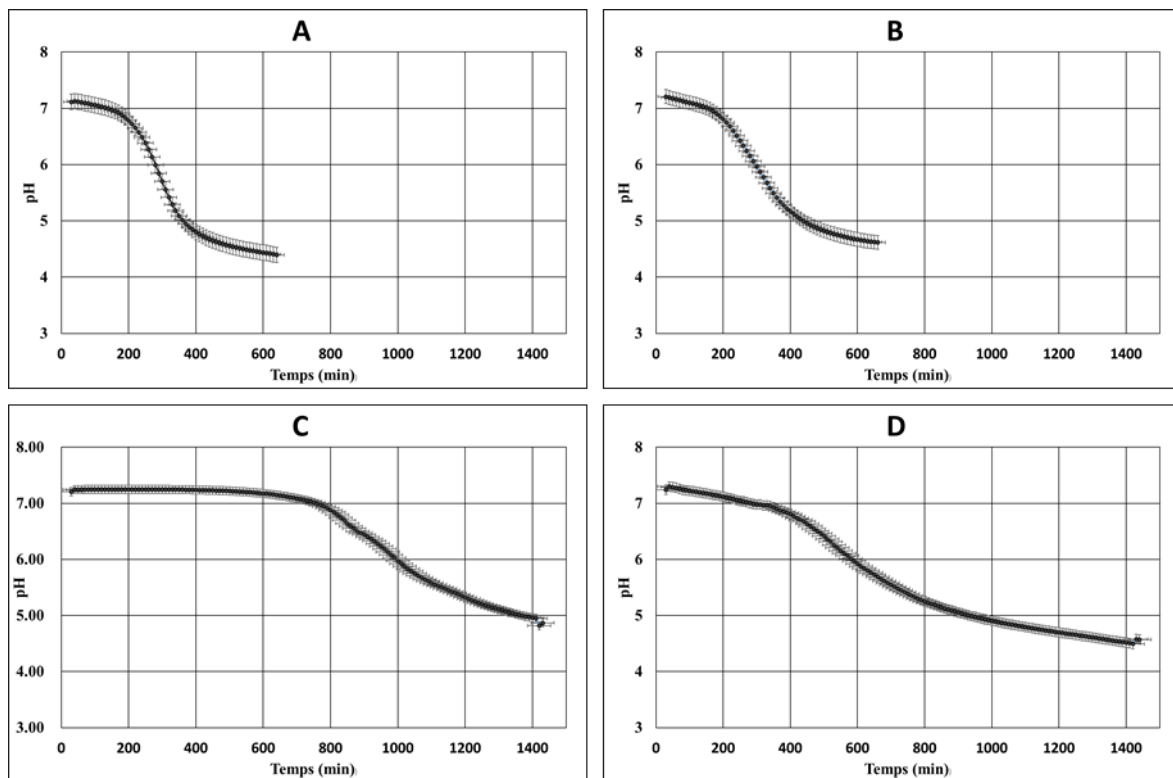


Figure 1 : Cinétiques d'acidification

A : Cinétique d'acidification de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* à 43°C B : Cinétique d'acidification de *Streptococcus thermophilus* à 43°C C : Cinétique d'acidification de *Lactococcus lactis* à 30°C D : Cinétique d'acidification de *Lactobacillus casei* à 30°C. Les fermentations ont été réalisées dans du jus de soja enrichis en saccharose à 10g/kg. Les cinétiques ont été enregistrées en utilisant un pH-mètre avec récupération de données.

Toutes les fermentations induisent une baisse du pH. Elles admettent toutes une allure de sigmoïde décroissante composée de trois phases distinctes. La première phase est une phase dans laquelle les variations de pH sont négligeables. Cette phase sera appelée phase de latence. La seconde phase est une phase de diminution importante du pH, appelée phase d'acidification. Enfin, la dernière phase est une nouvelle phase de stagnation du pH. Elle sera appelée phase de post-acidification-acidification.

La fermentation du jus de soja par le couple *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* (Figure 2A) a été enregistrée sur une période de 11 heures. La phase de latence est très courte, environ 1 heure. Lors de cette première phase 2, le pH ne varie pas : il reste à 7.11 +/-0.01. La phase d'acidification dure environ 4 heures. Sur cette période le pH chute de 2.1 unités, de 6.80 à 4.70. Sur cette même période, il est possible de déterminer la vitesse d'acidification du couple bactérien. Cette vitesse est de $1,349.10^{-2}$ unité de pH par minute, soit environ 1 unité de pH en 80 minutes. Elle a été calculée sur l'intervalle 6.5 - 5.5 correspondant à la partie exponentielle de la courbe. Le moment d'accélération de l'acidification entre ces phases dure environ 2 heures et le pH passe de 7.10 à 4.70, soit une baisse de 2.4 u pH. La phase de post-acidification commence à partir de la 10^{ème} heure à un pH de 4.40 +/-0.01. Le ralentissement de l'acidification fait la jonction entre l'acidification et la phase stationnaire et celui-ci couvre une période de 3 heures.

La seconde fermentation réalisée uniquement grâce à l'action des *Streptococcus thermophilus* (Figure 2B) et a duré 11 heures. La première phase de stagnation du pH, phase de latence, dure 40 minutes lors de laquelle le pH stagne autour de 7.20 +/-0.01. La phase d'acidification s'entend sur une période de 4.50 heures et passe d'un pH de 6.80 à 4.85, soit une diminution de 1.95 u pH. Sur cette période, il est possible de déterminer une vitesse d'acidification. Elle est calculée comme dans le précédent cas sur l'intervalle 6.5 - 5.5. Cette vitesse est de $9,37.10^{-3}$ unité de pH par minute soit la baisse d'une unité de pH en 120 minutes. Les deux premières phases sont séparées par un moment d'accélération de l'acidification commençant d'un pH à 7.19 jusqu'à 6.80, sur une période de 2.5 heures. La phase de stagnation du pH post-acidification commence au bout de 10 heures et 20 minutes de fermentation et reste à un pH de 4.60 +/-0.01. Le moment de ralentissement s'étend sur une période de 3.5 heures.

La pénultième fermentation est réalisée par *Lactococcus lactis* (Figure 2C). Celle-ci dure 24 heures. Il est possible de constater que la phase de latence est très longue. En effet, elle s'étend sur une période de 10 heures, avec un pH de 7.20 +/-0.02. Par la suite, le moment d'accélération de l'acidification fait baisser le pH de 7.20 à 6.80 en 3.5 heures. La phase d'acidification a permis de passer d'un pH de 6.80 à un pH de 5.30 en 6.5 heures. La vitesse d'acidification est calculée sur l'intervalle 6.5 - 5.5. Dans cette fermentation, elle est de 0.00429 ce qui représente la baisse d'une unité de pH en 4.17 heures. Le moment de ralentissement de l'acidification commence lorsque cette phase est terminée. Il est difficile, dans le cas de la fermentation avec *Lactococcus lactis*, de déterminer le passage dans la phase de stagnation de l'acidification car la période de l'enregistrement des pH est trop courte. Une variation trop importante de pH est observée pour conclure sur le début de cette dernière phase. Le fait est que l'enregistrement se termine sur un pH de 6.83.

La dernière fermentation de jus de soja fait intervenir l'action de *Lactobacillus casei* (Figure 2D). Elle a été enregistrée sur une période de 24 heures. La phase de pré-acidification s'étend sur une durée de 60 minutes à pH de 7.30 +/-0.01. Cette phase est directement suivie par l'accélération de l'acidification qui est dans ce cas, longue. En effet, cette accélération dure 6

heures pour passer de 7.30 à 6.70. La phase d'acidification lors de cette fermentation permet de faire chuter le pH de 6.71 à 5 en 8.34 heures. La vitesse d'acidification de cette phase est comme dans les précédents cas, calculée sur l'intervalle de pH 6.5 : 5.5. Dans ce cas, elle est de 0.00437 unité de pH par minute soit la baisse d'une unité de pH en 4 heures. Le moment de ralentissement de l'acidification commence à partir de 5.27 jusqu'à un pH de stagnation de 4.51 \pm 0.01. Le ralentissement se produit sur une période de 10 heures.

2. Texture

2.1 Analyse par textuométrie

L'étude de la texture par textuométrie a permis de caractériser le coagulum obtenu suite aux fermentations lactiques des jus de soja. Les gels sont testés selon les paramètres de la méthode présentée dans la partie 2 à savoir, à 4°C et à un pH de 4.50 \pm 0.1. Les résultats sont illustrés dans la figure 3.

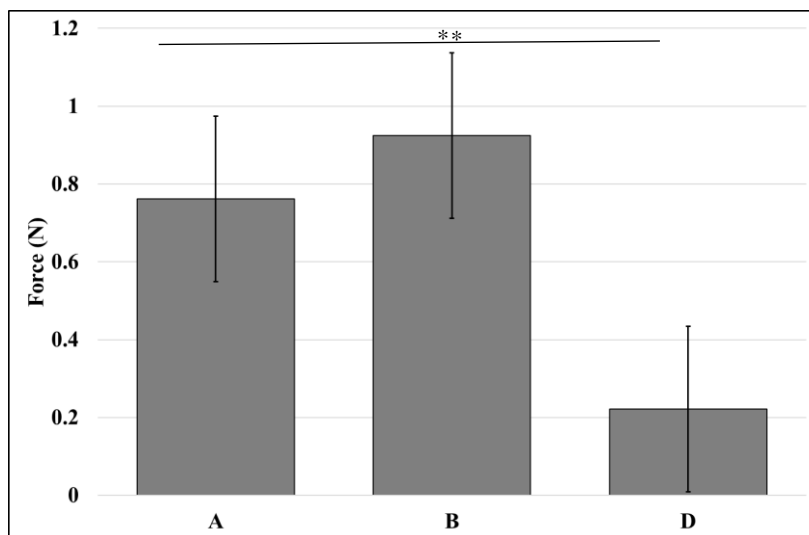


Figure 2: Caractérisation de la fermenté des gels

A : gel formé à partir de la fermentation de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii*. B : gel formé par la fermentation de *Streptococcus thermophilus*. D : gel formé par la fermentation de *Lactobacillus casei*. La fermenté est mesurée à 4°C avec un pH de 4.50 \pm 0.1 par un textuomètre TPA.

Les valeurs des fermetés mesurées ont été traitées pour être exploitées dans la figure ci-dessus. Chaque fermentation est traitée avec des outils statistiques qui permettent de conclure sur le fait que toutes les textures sont significativement différentes. Les données ont été traitées de la manière suivante. Dans un premier temps, les hypothèses de travail ont été fixées : H0, les textures des différentes fermentations sont identiques, $\mu(A)=\mu(B)=\mu(D)$ et H1, au moins une fermentation possède une texture différente des autres, avec un risque de 0.05 de rejeter H0 à tort.

Une analyse de variance (ANOVA) est utilisée pour comparer les variations causées par la modification du ferment utilisé par rapport aux variations non induites pas ce facteur. Cette analyse a permis de conclure sur le fait qu'au moins une des trois fermentations a une texture moyenne différente des deux autres. Pour aller plus loin, et déterminer quelles fermentations ont une texture moyenne différente, celles-ci ont été testées deux à deux, dans un premier temps afin de déterminer si leurs variances étaient égales ou non et par la suite grâce à un test STUDENT qui a permis de comparer les espérances des fermentations.

En somme, la fermentation réalisée par *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* a permis d'obtenir un gel avec une force de pénétration de 0.76N. La seconde fermentation réalisée par *Streptococcus thermophilus* seul, nécessite quant à elle une force de pénétration de 0.92N. Cette force est significativement supérieure à la première. La dernière fermentation testée nécessite une force de pénétration très inférieure aux deux premières, 0.22N.

Il est possible de constater que la fermentation réalisée par *Lactococcus lactis* n'est pas présente dans cette partie. En effet, comme il est possible de le voir sur l'étude des cinétiques, l'acidification de cette fermentation n'a pas permis d'atteindre le pH minimal requis pour pouvoir être testée selon la méthode évoquée plus haut dans ce rapport.

2.2 Analyse visuelle des gels

Visuellement les gels sont tous les quatre de la même couleur soit blanc cassé/beige. Leurs aspects sont lisses et homogènes. C'est au niveau de la fermeté que les divergences sont importantes. En effet, en observant les coagulums, les deux premiers (Figure 4A et 4B) sont des gels plus fermes et gardent bien leur forme suite à la découpe. En revanche, les derniers gels (Figure 4C et 4D) sont beaucoup plus mous et ont plus tendance à avoir un comportement qui va couler le long de la cuillère.

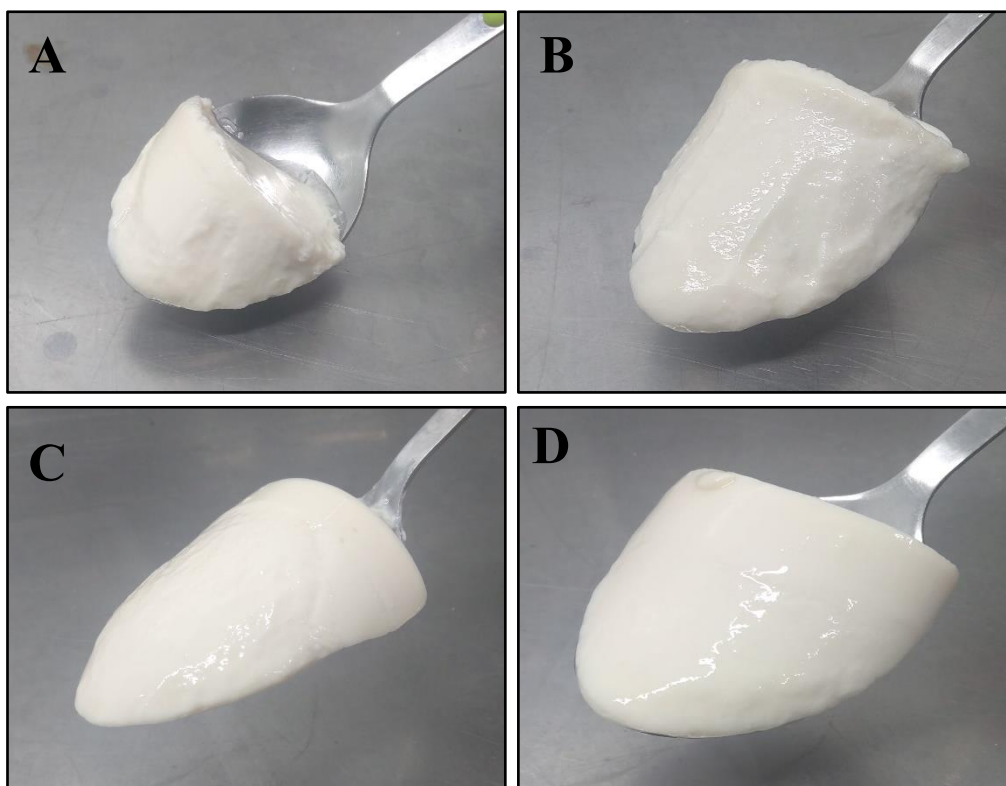


Figure 3 : Etude de la texture par analyse visuelle

A : Gel formé suite à la fermentation de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii*. B : gel formé suite à la fermentation de *Streptococcus thermophilus*. C : Gel formé suite à la fermentation de *Lactococcus lactis*. D : Gel formé suite à la fermentation de *Lactobacillus casei*. Les gels sont étudiés à 4°C.

3. Résultats microbiologiques

Cette étude a pour objectif d'évaluer la population bactérienne avant et après les fermentations. Pour confirmer la composition des ferments et constater une croissance et donc la responsabilité de l'acidification par une ou des bactéries désirées. Les résultats des dénombrements sont représentés dans la figure 4 ci-dessous. Pour qu'une différence de population soit significative, la différence entre les valeurs doit excéder 0.5 log10. Une différence inférieure nous place dans les erreurs admises par la méthode.

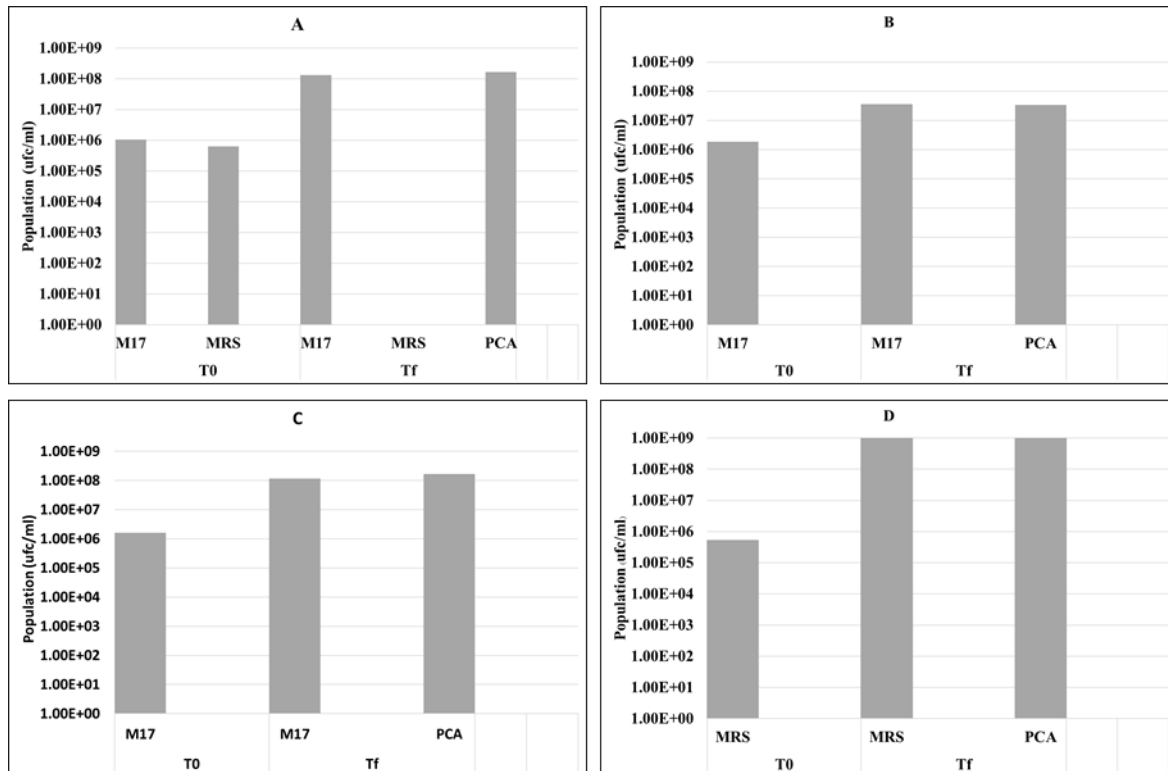


Figure 4: Evaluation des populations bactériennes avant et après la fermentation

A : Dénombrement des *Streptococcus thermophilus* sur M17, 43°C, des *Lactobacillus delbrueckii* sur MRS, 43°C, et de la FMAR sur PCA, 37°C. B : Dénombrement des *Streptococcus thermophilus* sur M17, 43°C, et de la FMAR sur PCA, 37°C. C : Dénombrement des *Lactococcus lactis* sur M17, 30°C, et de la Flore Mésophile Aérobie Revivifiable (FMAR) sur PCA, 37°C. D : Dénombrement de *Lactobacillus casei* sur MRS, 30°C, et de la FMAR sur PCA, 37°C. Les dénombrements ont été réalisés à T0 avant la fermentation et à Tf après la fermentation.

Dans la plupart des fermentations, la population bactérienne est plus importante en fin de fermentation qu'en début de fermentation. Il est donc possible d'observer une croissance bactérienne des différentes espèces étudiées dans cette étude.

L'évolution de la composition de la population, dans le cas de la fermentation du jus de soja par *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* (Figure 4A), varie entre le début de la fermentation et la fin. En effet, la population des streptocoques augmente avec une croissance de la population de 10² ufc/ml sur M17 supplémenté en lactose. La population initiale est de 10⁶ ufc/ml pour finir à une population de 10⁸ ufc/ml. La population de lactobacilles, quant à elle, n'augmente pas : elle a décré pour ne plus pouvoir être détectée selon

la méthode employée. La population de bactéries totales dénombrée sur PCA n'est pas différente de celle dénombrée sur M17 : la population est estimée à 10^8 Unités Formants Colonies (ufc)/ml.

Avec la fermentation de *Streptococcus thermophilus* seul dans le jus de soja, la population est estimée à 10^6 ufc/ml (Figure 4B). En fin de fermentation, à +11 heures après inoculation, la population est estimée à 10^8 ufc/ml. Le dénombrement des streptocoques sur M17 supplémenté en lactose a permis de mettre en évidence une croissance de la population de 10^2 ufc/ml. L'évaluation de la population bactérienne totale sur PCA n'est pas différente de l'évaluation de la population bactérienne sur M17, environ 10^8 ufc/ml.

La troisième fermentation a fait intervenir *Lactococcus lactis* cultivé sur M17 supplémenté en lactose (Figure 4C). Cette analyse a permis d'estimer la population de départ à t0, 10^6 ufc/ml. La population en fin de fermentation, à +24 heures, est estimée à 10^8 ufc/ml. La flore totale mésophile aérobie revivable cultivée sur PCA est en adéquation avec la flore de lactocoques cultivée sur M17. Elle est estimée à 10^8 ufc/ml.

L'analyse de la dernière fermentation (Figure 4D) a permis de mettre en évidence l'accroissement de la population de *Lactobacillus casei*. En effet la population initiale, en amont de la fermentation est estimée à 10^6 ufc/ml, population finale à +24 heures atteint 10^9 ufc/ml. Contrairement aux autres fermentations, celle-ci observe un accroissement plus important de la population bactérienne qui est de 10^3 ufc/ml.

Partie 4 : Discussion

En étudiant les cinétiques d'acidification présentées dans la partie précédente, il ressort que la fermentation qui induit la baisse la plus rapide du pH est celle réalisée par le couple *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii sub bulgaricus* (Figure 2A). Cette rapidité de développement et de synthèse d'acide lactique est due à une coopération des souches appelée dans ce contexte protocoopération. Cette coopération est la mise à disposition réciproque de facteurs promouvant la croissance des deux bactéries. En effet, *Lactobacillus delbrueckii* fournit des peptides et des acides aminés libres tandis que *Streptococcus thermophilus* est une source d'acide formique, folique et pyruvique et également une source de dioxyde de carbone (Jan et al. 2022).

Cependant d'après les études de la population bactérienne, il s'avère que la population de *Lactobacillus* n'a pas augmenté de la même manière que celle de *Streptococcus thermophilus* lors de la fermentation (Figure 4A). En effet, il a été démontré que cette différence de croissance est explicable par le fait que *Lactobacillus* est incapable d'hydrolyser les protéines de soja pour réaliser des acides aminés libres nécessaires à sa croissance (Jan et al. 2022). De plus, les sources de carbone qu'utilise *Lactobacillus* sont le glucose et le fructose et non le saccharose, sucre choisi pour l'enrichissement des jus de soja lors de l'étude. Cet enrichissement défavorable peut également être une source de non croissance de la bactérie. Des observations par microscopie à fluorescence ont mis en évidence des différences de morphologie de *Lactobacillus* dans le lait de vache ou le jus de soja, tous les deux enrichis en peptone. Dans le lait, les bactéries se comportent de manière classique avec une morphologie de bacilles alors que dans le jus de soja, la morphologie des lactobacilles est plus segmentée avec des bacilles plus petits. De plus, les observations laissent sous-entendre un processus de division cellulaire inachevé (Jan et al. 2022). Pour aller plus loin, une étude protéomique par électrophorèse a révélé que le nombre de protéines est nettement plus important dans le jus de soja que dans le lait de vache. Cette étude complétée par une analyse des protéines par spectrométrie de masse identifie les protéines comme ayant un rôle dans la production d'énergie, dans le transport et le métabolisme des acides aminés et celui des glucides etc. Pour confirmer ce phénomène, dans le cadre de l'analyse menée par des ferments commerciaux, un dénombrement des *Lactobacillus* devra être réalisé avec une gamme de dilutions plus appropriée pour mettre en évidence les limites de croissance de cette bactérie dans le jus de soja. Il est possible de réaliser un parallèle entre *Lactobacillus delbrueckii* et *Lactobacillus casei*. Ces deux espèces bactériennes ont un métabolisme similaire. Dans le cas de la fermentation avec *Lactobacillus* seul, celui-ci ne bénéficie pas des apports en métabolites favorisant sa croissance provenant de *Streptococcus thermophilus* ce qui pourrait expliquer une cinétique d'acidification plus lente avec une phase de latence plus longue que dans la fermentation du couple *Lactobacillus* et *Streptococcus*. Une autre hypothèse peut expliquer cela. En effet, les souches bactériennes ne sont probablement pas les mêmes ce qui entraîne une variation dans le fonctionnement de la

cellule qui peut être à l'origine de la différence d'acidification. Un parallèle inverse peut être fait sur la fermentation avec *Streptococcus* seul. En effet, il est possible de constater que celui-ci réalise une cinétique d'acidification plus lente que lorsqu'il est couplé avec *Lactobacillus*. Même si cette dernière fermentation est tout de même rapide comparée aux deux dernières avec *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus casei*. Ceci suggère que les capacités d'adaptation de *Streptococcus* sont supérieures aux autres bactéries lactiques testées dans cette étude avec un métabolisme du saccharose et des protéines de soja supérieur.

La vitesse d'acidification peut avoir un effet sur la texture du produit fini. En effet, la vitesse d'acidification joue un rôle dans l'arrangement des protéines qui s'organisent de manière isolée puis en formant un gel. Lorsque l'acidification est rapide, ceci conduit dans le cas du lait de vache, à une floculation des micelles de caséines qui entraîne la formation d'un gel peu stable pouvant être granuleux, hétérogène. Dans le cas d'une coagulation lactique par fermentation, la baisse du pH est beaucoup plus progressive et entraîne un arrangement particulier des protéines qui conduit à la formation d'un gel stable et homogène (Jeantet et al. 2007). Ce parallèle ne peut pas être directement réalisé avec les fermentations dans le jus de soja étant donné que la nature biochimique des micelles de caséines du lait est différente de celle des protéines végétales après le traitement thermique UHT qui sont des protéines globulaires dénaturées.

Un autre facteur important pouvant influencer la texture et la fermeté des gels est la présence d'exopolysaccharides synthétisés par les microorganismes lors de la fermentation. Les exopolysaccharides, EPS, produits par les bactéries lactiques sont une source importante et naturelle d'alternative aux texturants utilisés par les fabricants. Ils ont des applications en tant que texturants émulsifiants (Rollán et al. 2019). Les espèces de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbruekii* ne sont pas dans la majorité des cas producteurs d'EPS ou en produisent dans de faibles proportions (Vanningelgem et al. 2004). À la vue de la différence de la fermeté des gels obtenus suite à la fermentation des jus de soja, la production d'EPS peut être une explication. Les analyses menées sur les jus de soja sont réalisées grâce à des ferments commerciaux. L'inconvénient de ce genre de ferment vient du fait que la précision d'assignation taxonomique des bactéries dans le ferment n'est précise que jusqu'à l'espèce et il n'est pas possible de remonter jusqu'à la souche de la bactérie qui est utilisée. L'interprétation des résultats est donc à relativiser ou bien à approfondir dans une autre étude. Cependant, il est possible de supposer que les deux fermentations qui utilisent *Streptococcus thermophilus* ne sont pas composées des mêmes souches et dans le cas de la fermentation avec seulement *Streptococcus thermophilus*, la bactérie possède la capacité à produire un type d'exopolysaccharide qui augmente la fermeté du gel produit.

Les articles de cette partie sur l'évaluation de la texture sont principalement basés sur le comportement bactérien dans le lait de vache qui est parfaitement documenté. Faire un parallèle entre le comportement de ces bactéries dans le lait de vache et ce jus de soja UHT commercial est probablement difficile.

Conclusion

Ce projet s'inscrit en amont du projet visant à comparer deux types de fromage fabriqués à partir de lait de vache et de substituts végétaux avec les mêmes caractéristiques physico-chimique et texturale. L'obtention de ces produits nécessite une coagulation des protéines du jus de soja pouvant être réalisée selon trois voies : l'addition de sels, l'utilisation d'enzymes ou la production d'acide par fermentation lactique.

L'objectif de cette étude était de déterminer si la voie de coagulation lactique, par fermentation était réalisable pour obtenir un produit qui deviendrait un substitut de fromage.

Pour conclure sur cette « fromageabilité » du jus de soja, des analyses ont été réalisées : cinétique d'acidification, dénombrement des micro-organismes, caractérisation de la texture des coagulums.

Il ressort de ce rapport que les différents ferments commerciaux utilisés tout au long de l'étude ne se comportaient pas de la même façon dans le jus de soja. En effet, les cinétiques d'acidification sont différentes, le couple *S. thermophilus* et *L. delbrueckii* réalisait l'acidification la plus rapide avec la baisse d'une unité de pH en 80 minutes. Le gel obtenu suite à la fermentation par *S. thermophilus* seul donne la texture la plus ferme (0.96 N) d'après le test de pénétration. La fermentation réalisée par *S. thermophilus* seul possède une vitesse d'acidification qui répond aussi aux critères de sélection. Le choix du ferment porterait sur un de ces deux cocktails.

Les études de textures ont également mis en évidence que le gel obtenu par acidification due à la fermentation lactique n'était pas assez ferme pour espérer une transformation en un substitut de fromage. Dans le cadre du projet, les autres voies de coagulation seront étudiées pour ainsi former un gel pouvant être décaillé avant l'égouttage et l'affinage. La voie majeure envisagée pour poursuivre est la voie de la coagulation par les sels qui offre des perspectives de précipitation des protéines et de gélification qui pourrait convenir au projet. Ce type de précipitation au nigari ($MgCl_2$) est déjà utilisé massivement pour produire le tofu. Par contre, ajouter des ferments lactiques comme étudié améliorera l'aromatisation du produit fini et permettra d'améliorer la biopréservation.

La fabrication de substituts végétaux de fromage en utilisant le soja comme matière première principale est très peu étudié. Le travail mené dans ce projet représente donc un moyen de faire avancer les connaissances scientifiques et techniques de l'alimentation de demain.

Références

- Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, et al (2018) GenBank. *Nucleic Acids Res* 46:D41–D47.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx1094>
- Berk Z (1993) Technologie de production de farines alimentaires et de produits protéiques issus du soja. Food & Agriculture Org.
- Bintsis T (2018) Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS Microbiol* 4:665–684. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.665>
- Bolotin A, Quinquis B, Renault P, et al (2004) Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nat Biotechnol* 22:1554–1558.
<https://doi.org/10.1038/nbt1034>
- Castellano P, Belfiore C, Fadda S, Vignolo G (2008) A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Sci* 79:483–499.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.10.009>
- De Staercke P (1990) Le soja (culture). COTA, Bruxelles
- Dey PM, Dixon RA (1985) Biochemistry of storage carbohydrates in green plants. *Biochem Storage Carbohydr Green Plants*
- Di Cagno R, Coda R, De Angelis M, Gobbetti M (2013) Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiol* 33:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.003>
- Franke CM, Leenhouts KJ, Haandrikman AJ, et al (1996) Topology of LcnD, a protein implicated in the transport of bacteriocins from *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* 178:1766–1769.
<https://doi.org/10.1128/jb.178.6.1766-1769.1996>
- Fujita A, Sarkar D, Genovese MI, Shetty K (2017) Improving anti-hyperglycemic and anti-hypertensive properties of camu-camu (*Myrciaria dubia* Mc. Vaugh) using lactic acid bacterial fermentation. *Process Biochem* 59:133–140. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.05.017>
- Fuller R (1989) Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 66:365–378
- Gaspar P, Neves AR, Shearman CA, et al (2007) The lactate dehydrogenases encoded by the *ldh* and *ldhB* genes in *Lactococcus lactis* exhibit distinct regulation and catalytic properties – comparative modeling to probe the molecular basis. *FEBS J* 274:5924–5936.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06115.x>
- Gustaw K, Niedźwiedź I, Rachwał K, Polak-Berecka M (2021) New Insight into Bacterial Interaction with the Matrix of Plant-Based Fermented Foods. *Foods* 10:1603.
<https://doi.org/10.3390/foods10071603>
- Harlé O, Falentin H, Niay J, et al (2020) Diversity of the metabolic profiles of a broad range of lactic acid bacteria in soy juice fermentation. *Food Microbiol* 89:103410.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103410>
- Herman E (2005) Soybean Allergenicity and Suppression of the Immunodominant Allergen. *Crop Sci* 45:462–467. <https://doi.org/10.2135/cropsci2005.0462>

- Indasah I, Muhith A (2020) Local Microorganism From “Tape” (Fermented Cassava) In Composition and Its Effect on Physical, Chemical And Biological Quality in Environmental. IOP Conf Ser Earth Environ Sci 519:012003. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/519/1/012003>
- Jan G, Tarnaud F, Rosa do Carmo FL, et al (2022) The stressing life of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in soy milk. *Food Microbiol* 106:104042. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104042>
- Jeantet R, Croguennec T, Schuck P, Brule G (2007) *Sciences des Aliments 2- Technologie des Produits Alimentaires*. Tec & Doc Lavoisier
- Johnson LA, White PJ, Galloway R (2015) *Soybeans: Chemistry, Production, Processing, and Utilization*. Elsevier
- Karr-Lilienthal LK, Grieshop CM, Spears JK, Fahey GC (2005) Amino Acid, Carbohydrate, and Fat Composition of Soybean Meals Prepared at 55 Commercial U.S. Soybean Processing Plants. *J Agric Food Chem* 53:2146–2150. <https://doi.org/10.1021/jf048385i>
- Khalid K An overview of lactic acid bacteria
- Klaenhammer T, Altermann E, Arigoni F, et al (2002) Discovering lactic acid bacteria by genomics. In: Siezen RJ, Kok J, Abee T, Schafsma G (eds) *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications: Proceedings of the seventh Symposium on lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications, 1–5 September 2002, Egmond aan Zee, the Netherlands*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 29–58
- Krishnan HB (2000) Biochemistry and Molecular Biology of Soybean Seed Storage Proteins. *J New Seeds* 2:1–25. https://doi.org/10.1300/J153v02n03_01
- Liu JY, Li AH, Ji C, Yang WM (2009) First description of a novel *Weissella* species as an opportunistic pathogen for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in China. *Vet Microbiol* 136:314–320. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.11.027>
- McKay LL (2018) Roles of plasmids in starter cultures. In: *Bacterial starter cultures for foods*. CRC Press, pp 159–174
- Medic J, Atkinson C, Hurburgh CR (2014) Current Knowledge in Soybean Composition. *J Am Oil Chem Soc* 91:363–384. <https://doi.org/10.1007/s11746-013-2407-9>
- Mozzi F, Raya RR, Vignolo GM (2010) *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*. John Wiley & Sons
- Murphy PA (2008) 8 - Soybean Proteins. In: Johnson LA, White PJ, Galloway R (eds) *Soybeans*. AOCS Press, pp 229–267
- Naidu AS, Bidlack WR, Clemens RA (1999) Probiotic Spectra of Lactic Acid Bacteria (LAB). *Crit Rev Food Sci Nutr* 39:13–126. <https://doi.org/10.1080/10408699991279187>
- Obendorf RL, Zimmerman AD, Ortiz PA, et al (2008) Imbibitional Chilling Sensitivity and Soluble Carbohydrate Composition of Low Raffinose, Low Stachyose Soybean Seed. *Crop Sci* 48:2396–2403. <https://doi.org/10.2135/cropsci2007.12.0706>

- Oliveira AP, Nielsen J, Förster J (2005) Modeling *Lactococcus lactis* using a genome-scale flux model. *BMC Microbiol* 5:39. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-5-39>
- Orla-Jensen (1924) La classification des bactéries lactiques. *Le Lait* 4:468–474. <https://doi.org/10.1051/lait:19243627>
- Rollán GC, Gerez CL, LeBlanc JG (2019) Lactic Fermentation as a Strategy to Improve the Nutritional and Functional Values of Pseudocereals. *Front Nutr* 6:
- Salminen S, Wright A von (2004) *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, Third Edition. CRC Press
- T B (2018) Lactic acid bacteria: their applications in foods. *J Bacteriol Mycol Open Access* 6:. <https://doi.org/10.15406/jbmoa.2018.06.00182>
- Vaningelgem F, Zamfir M, Mozzi F, et al (2004) Biodiversity of Exopolysaccharides Produced by *Streptococcus thermophilus* Strains Is Reflected in Their Production and Their Molecular and Functional Characteristics. *Appl Environ Microbiol* 70:900–912. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.900-912.2004>
- Viana R, Yebra MJ, Galán JL, et al (2005) Pleiotropic effects of lactate dehydrogenase inactivation in *Lactobacillus casei*. *Res Microbiol* 156:641–649. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.02.011>
- Wang T, Hammond EG, Fehr WR (1997) Phospholipid fatty acid composition and stereospecific distribution of soybeans with a wide range of fatty acid composition. *J Am Oil Chem Soc* 74:1587–1594. <https://doi.org/10.1007/s11746-997-0082-4>
- Zarkadas CG, Gagnon C, Gleddie S, et al (2007) Assessment of the protein quality of fourteen soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] cultivars using amino acid analysis and two-dimensional electrophoresis. *Food Res Int* 40:129–146. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.08.006>
- Plus de protéines végétales, chiche ? In: INRAE Institutionnel. <https://www.inrae.fr/alimentation-sante-globale/proteines-vegetales>. Accessed 14 Feb 2023a
- Carbon Catabolite Repression and Global Control of the Carbohydrate Metabolism in *Lactococcus lactis* - ProQuest. <https://www.proquest.com/openview/f5f64ec6c92de3488878e38d35e99d24/1?pq-origsite=gscholar&cbl=18750&diss=y>. Accessed 13 Feb 2023b
- (2014) *Dairy Starter Cultures* Thomas Bintsis and Antonis Athanasoulas. In: *Dairy Microbiology*. CRC Press
- Lactic Acid Bacteria as Source of Functional Ingredients | IntechOpen. <https://www.intechopen.com/chapters/42328>. Accessed 15 Feb 2023c
- Gürsoy: Set type yoghurt production by exopolysaccharide... - Google Scholar. [https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Set%20type%20yoghurt%20production%20by%20exopolysaccharide%20producing%20Turkish%20origin%20domestic%20strains%20of%20Streptococcus%20thermophilus%20\(W22\)%20and%20Lactobacillus%20delbrueckii%20ssp.%20Bulgarius%20\(B3\)&author=A.%20G%C3%BCrsoy&author=F.%20Durlu-%C3%96zkaya&author=F.%20Yildiz&author=B.%20Aslim&publication_year=2010](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Set%20type%20yoghurt%20production%20by%20exopolysaccharide%20producing%20Turkish%20origin%20domestic%20strains%20of%20Streptococcus%20thermophilus%20(W22)%20and%20Lactobacillus%20delbrueckii%20ssp.%20Bulgarius%20(B3)&author=A.%20G%C3%BCrsoy&author=F.%20Durlu-%C3%96zkaya&author=F.%20Yildiz&author=B.%20Aslim&publication_year=2010). Accessed 15 Feb 2023d

