



HAL
open science

Identification de souches bactériennes propioniques capables de produire des ingrédients fonctionnels ayant une activité antimicrobienne

Océane Simon, Stéphanie-Marie Deutsch

► To cite this version:

Océane Simon, Stéphanie-Marie Deutsch. Identification de souches bactériennes propioniques capables de produire des ingrédients fonctionnels ayant une activité antimicrobienne. Life Sciences [q-bio]. 2022. <hal-05591394>

HAL Id: hal-05591394

<https://hal.inrae.fr/hal-05591394v1>

Submitted on 14 Apr 2026

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.



Copyright - All rights reserved



MASTER II Microbiologie

Parcours : Bioprocédés microbiens

RAPPORT DE STAGE PRÉSENTÉ PAR :

Océane SIMON

SUJET :

Identification de souches bactériennes propioniques capables de produire des ingrédients fonctionnels ayant une activité antimicrobienne

Responsables du Stage :

Stéphanie-Marie DEUTSCH

Hélène FALENTIN

UMR STLO, 65 Rue de Saint-Brieuc, 35000 Rennes



Pierre GUICHEBARD

Diana, 7 All. Ermengarde d'Anjou, 35000 Rennes



2021-2022

Abréviations

ACP : Analyse en Composantes Principale

ANOVA : Analyse de la variance

EFSA: European Food Safety Authority

GRAS: Generally Recognized As Safe

QPS: Qualified Presumption of Safety

$Y_{m\ a/l}$: rendement massique acétate / lactate

$Y_{m\ p/l}$: rendement massique propionate / lactate

$Y_{\text{produit/substrat}}$: rendement molaire

Ratio P/A : ratio molaire propionate/acétate

Sommaire

Introduction.....	1
Matériel et méthodes	8
1. Matrices végétales étudiées	8
2. Critère de sélection des souches de bactéries propioniques	9
3. Conditions de culture de <i>Propionibacterium</i> spp.	9
4. Fermentation propionique des matrices lactofermentées	10
5. Suivi de pH et dénombrements bactériens	10
6. Dosage des acides organiques et des sucres du produit de fermentation.....	11
7. Évaluation de l'activité antimicrobienne <i>in vitro</i>	11
8. Analyses statistiques	12
Résultats.....	12
1. Caractérisation des matières premières lactofermentées	12
2. Sélection des souches de bactéries propioniques à cribler	13
3. Fermentation propionique du jus d'oignon lactofermenté	13
4. Fermentation propionique d'une purée de tomate lactofermentée.....	16
5. Analyse par statistique descriptive (ACP) des résultats	18
Discussion.....	20

Introduction

Les conservateurs, essentiels à la préservation des aliments transformés

L'altération par les microorganismes génère des quantités de nourriture perdue importantes. Ce n'est pas moins de 25% des denrées alimentaires produites qui sont jetés après leur récolte (Bondi et al., 2014). Ce type d'altération peut être observé à chaque étape de transformation et de stockage des aliments produits malgré les diverses mesures prises par les industriels pour limiter ce phénomène (HACCP, marche en avant, contrôle qualité...). C'est à la fois une perte économique pour les entreprises agro-alimentaires, une source considérable de déchets et un problème écologique majeur du fait du gaspillage des ressources naturelles et énergétiques. Les altérations se traduisent par un changement de couleur, de texture, des odeurs atypiques et des saveurs anormales rendant le produit indésirable au consommateur (L. Petruzzi et al., 2017). Les conservateurs alimentaires sont des substances minérales ou organiques qui permettent d'allonger la durée de conservation des aliments en les protégeant des altérations chimiques (oxydation) et microbiennes. L'utilisation des conservateurs est donc nécessaire pour assurer la qualité et la durée de vie des aliments transformés. Cependant, l'utilisation de certains conservateurs soulève des questions à propos de leur potentiel effet délétère sur la santé en raison de leur consommation journalière et sur le long terme (Silva et Lidon, 2016). Ces questions se traduisent par une méfiance et une inquiétude croissante des consommateurs envers les conservateurs de synthèse (créés par réaction chimique ou enzymatique).

Les consommateurs sont de plus en plus attentifs à leur alimentation et aux produits qu'ils achètent. Cette tendance se traduit en partie par une demande croissante d'aliments moins transformés, plus naturels et sans conservateur comme les produits « clean label ». Pour répondre à cette demande des consommateurs et plus particulièrement à la tendance « clean label », trouver des alternatives naturelles aux conservateurs de synthèse est donc essentiel pour les industriels.

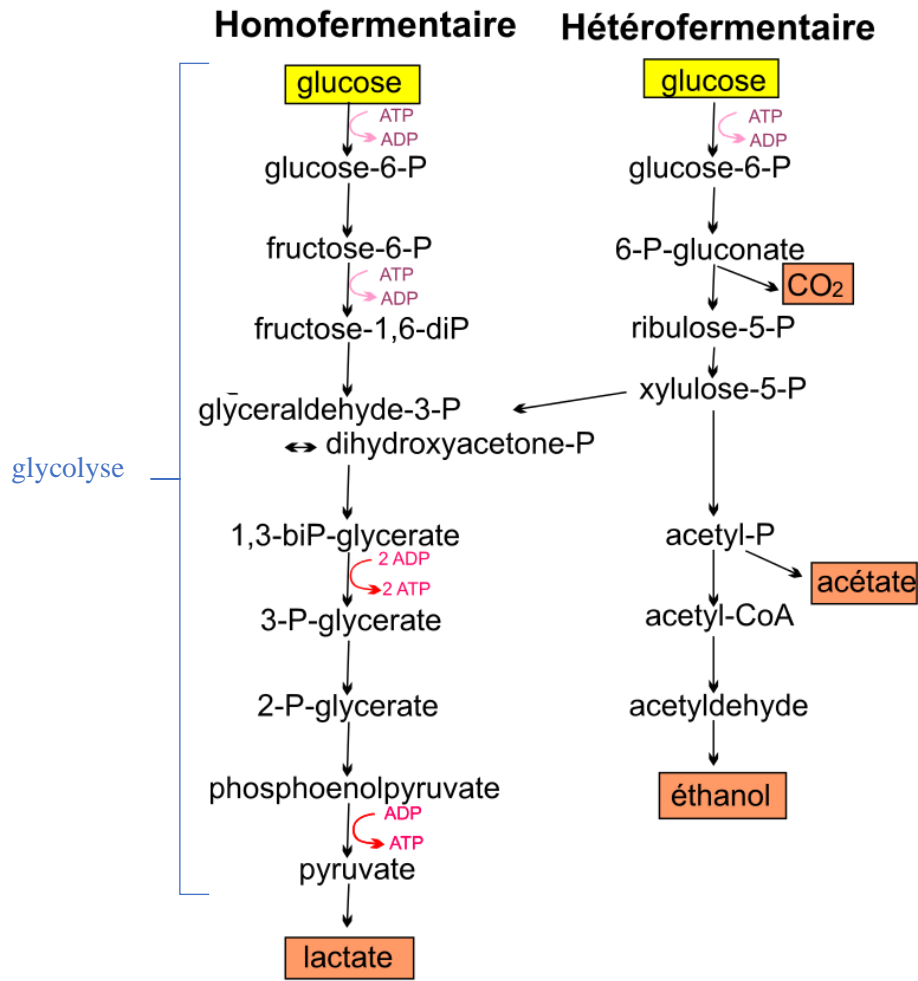


Figure 1 : Représentation simplifiée des métabolismes homofermentaire et hétérofermentaire chez les bactéries lactiques
 Source : DRIDER et PREVOST, 2009

Les alternatives aux conservateurs de synthèse pour répondre aux tendances de consommation

Plusieurs pistes sont étudiées pour identifier de nouvelles alternatives aux conservateurs. C'est par exemple le cas de l'introduction volontaire de micro-organismes antagonistes qui par compétition et production de métabolites limite la croissance d'autres microorganismes dans un aliment : la "biopréservation". Ce terme inclut plus globalement l'utilisation de microorganismes, des produits de fermentation, ou des métabolites dans le but d'étendre la durée de vie et/ou augmenter la sécurité d'un produit. Les principaux mécanismes d'action de la biopréservation sont l'antibiose (production de molécules antimicrobiennes) et la compétition pour les nutriments (Salas et al, 2017). Il est bien connu que les aliments fermentés sont plus sûrs et stables microbiologiquement. En effet, la fermentation a un double avantage, convertir les sucres potentiellement utilisables par d'autres microorganismes pathogènes ou d'altérations et produire des métabolites antimicrobiens. La fermentation est un procédé qui fait intervenir un microorganisme qui, de par ses enzymes, converti généralement des sucres en un composé réduit (un acide généralement), le plus souvent en anaérobie.

La biopréservation à l'aide de bactéries lactiques est actuellement la principale alternative aux conservateurs dans les aliments, laitiers ou non laitiers. Elle est très étudiée en raison de l'utilisation historique des bactéries lactiques dans les aliments fermentés et le statut GRAS (Generally recognized as safe) attribué à ces dernières par la FDA et QPS attribué par l'EFSA (EFSA Journal, 2020). Suivant la voie métabolique empruntée pour la production de lactate à partir de sucres, les bactéries lactiques peuvent être divisées en 2 groupes : homofermentaires et hétérofermentaires (figure 1).

Dans le cas de la fermentation homolactique, le lactate est le produit majoritaire de fermentation. Il est issu de la transformation du glucose en pyruvate par la glycolyse. Le pyruvate est ensuite réduit en lactate grâce à l'action de la lactate déshydrogénase (Eiteman et Ramalingam, 2015) (figure 1).

Cependant, dans des conditions défavorables comme en présence d'une faible disponibilité de glucose, les bactéries homofermentaires peuvent également produire de l'acide formique, de l'acétate, de l'éthanol et/ou du CO₂ par la voie de fermentation des acides mixtes (Mozzi et Vignolo., 2010).

Concernant la fermentation hétérolactique, le glucose est transformé par la voie des pentoses phosphates en xylulose-5-phosphate (pentose). Le pentose produit est clivé en glycéraldéhyde phosphate et en acétyl phosphate par une phosphocétolase. Le glycéraldéhyde phosphate emprunte la voie de la glycolyse pour former du pyruvate puis du lactate. L'acétyl phosphate est réduit en éthanol (figure 1). Cette fermentation est donc nommée hétérolactique car elle permet non seulement la production de lactate mais aussi d'éthanol, d'acétate et de CO₂ (Salminen et Von Wright, 2004).

Les produits de ces deux groupes de fermentation (lactate, acétate et CO₂) permettent la diminution du pH de l'environnement et ils ralentissent voire inhibent la croissance des autres microorganismes. Par exemple, *L. monocytogenes* peut être inhibée dans des produits végétaux par le lactate produit par *Lactobacillus plantarum* (Wilson et al, 2005). Les bactéries lactiques peuvent également produire lors de la fermentation d'autres acides (formique, phényllactique, caproïque), ainsi que du diacétyl et du peroxyde d'hydrogène. C'est le cas de *L. plantarum* 21B (isolé du levain de pain) qui produit de l'acide phényllactique et 4-hydroxy-phényllactique ayant une activité antifongique à large spectre (Lavermicocca et al., 2000).

Les bactéries lactiques sont aussi capables de produire des bactériocines comme la nisine, la lactacine ou encore la plantaricine (O'Sullivan et al, 2006 ; Gálvez et al., 2008). Les bactériocines sont des peptides produits par le ribosome des bactéries et ayant un effet antimicrobien. Leur biosynthèse dépend de facteurs variés : le pH, la température, la souche et la composition du milieu. L'effet bactéricide des bactériocines est généralement causé par la perméabilisation et la formation de pores dans la membrane de la cible (Kumariya et al., 2019).

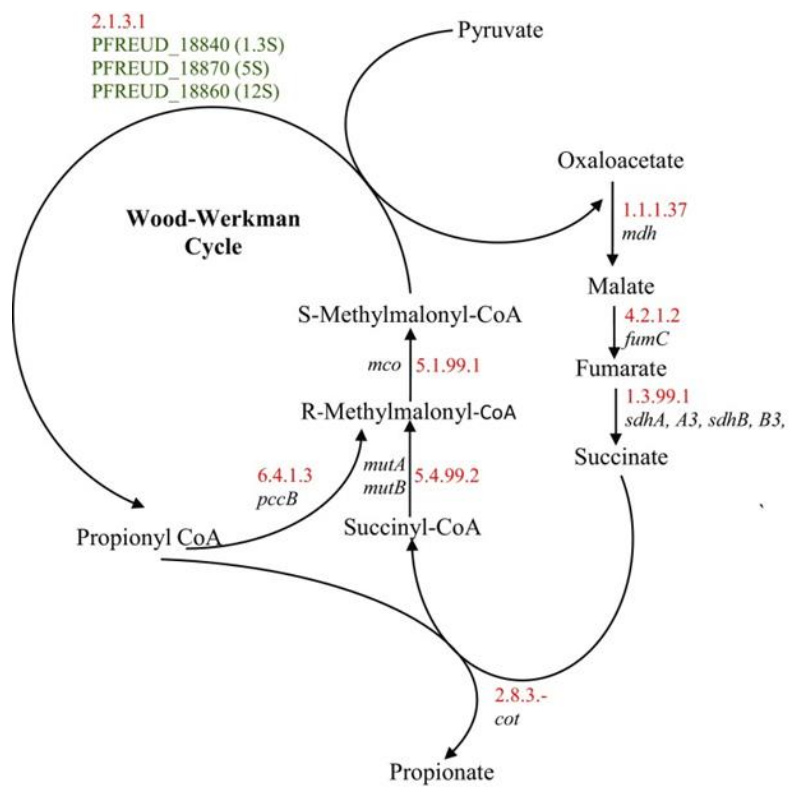


Figure 2 : Cycle de Wood-Werkman chez *P. freudenreichii*, conduisant à la production de propionate

Source : Falentin et al., 2010

Leur activité est souvent restreinte aux bactéries de genres ou d'espèces proches de celui de la bactérie productrice. Toutefois, les bactériocines des bactéries lactiques peuvent se révéler efficaces contre les bactéries pathogènes ou d'altérations (Dortu et Thonart, 2009). Par exemple, *L. plantarum* IB2 (isolé du inziangsang) produit une bactériocine à laquelle *S. aureus* S1 est sensible (Tamang et al., 2009).

Les bactéries propioniques sont, comme les bactéries lactiques, utilisées pour la fabrication de produits fermentés, en particulier l'emmental. Cependant, peu d'études s'intéressent à l'utilisation des bactéries propioniques pour la conservation des aliments autres que les produits laitiers. Au niveau législatif, *Propionibacterium freudenreichii* est classée comme GRAS (Generally recognized as safe) aux États-Unis et QPS (Qualified Presumption of Safety ou présomption d'innocuité reconnue) en Union européenne tandis qu'*Acidipropionibacterium acidipropionici* possède uniquement le statut QPS. Ces deux espèces de bactéries propioniques seront donc favorisées dans l'étude. De plus, les bactéries propioniques sont capables de synthétiser de l'propionate, une molécule qui inhibe la croissance des levures et des moisissures. Cet acide est utilisé en tant que conservateur dans certains produits de panification et pâtisserie. La majorité de sa production (environ 80%) est utilisée en alimentation humaine et animale (Piwowarek, Kamil et al, 2018). De plus, le propionate produit par les bactéries est considéré comme un conservateur naturel contrairement à celui obtenu par voie chimique et peut être inclus dans un produit "clean label".

Le propionate est produit par les bactéries propioniques grâce au cycle de Wood-Werkman. Une partie du succinate issu du cycle de Krebs est détourné de ce cycle et intègre le cycle de Wood et Werkman conduisant ainsi à la production du propionate. Le succinate réagit avec le propionyl-CoA pour former du propionate et du succinyl-CoA. Le succinyl-CoA est ensuite converti en méthylmalonyl-CoA par deux enzymes : une méthylmalonyl CoA mutase puis une méthylmalonyl racemase (figure 2).

Une réaction de transcarboxylation permet ensuite le transfert du groupe carboxyle du méthylmalonyl-CoA au pyruvate pour former de l'oxaloacétate et du propionyl-CoA (figure 2). Cette réaction est réalisée par une enzyme dépendante de la vitamine B8 ou biotine, la méthylmalonyl-CoA carboxytransferase.

Les bactéries propioniques sont aussi capables de produire des molécules inhibitrices de la croissance d'autres bactéries comme l'acétate, l'acide succinique et bien d'autres acides organiques et ce dans des proportions diverses suivant le substrat (Turgay et al., 2022). Elles peuvent également produire, selon les souches, du diacétyl (Lee et al., 1970) et des bactériocines qui ont une activité antimicrobienne comme décrit précédemment. Plus de recherches sont nécessaires pour évaluer les potentielles applications des souches de bactéries propioniques produisant des bactériocines. Néanmoins, il existe déjà sur le marché des conservateurs basés sur l'utilisation des bactéries propioniques. Par exemple, Inhibit 3600 Dairy™ (Mezzoni Foods) est un conservateur naturel obtenu par la fermentation contrôlée de petit lait avec *P. freudenreichii*.

La complémentarité des bactéries lactiques et propioniques

La co-culture des bactéries lactiques et propioniques montre de façon générale un effet antimicrobien supérieur en comparaison à chaque culture seule (Suomalainen and Mäyrä-Mäkinen, 1999). En effet, les bactéries propioniques et lactiques produisent des composés antimicrobiens variés ce qui rend leur co-culture un choix stratégique pour des applications de biopréservation (Smid et Lacroix, 2013).

Plusieurs stratégies ont été décrites pour associer bactéries lactiques et propioniques en vue d'augmenter le potentiel antimicrobien des produits de fermentation. Par exemple, des études antérieures ont démontré que la combinaison de bactéries lactiques et propioniques antifongiques augmentait l'inhibition des cibles fongiques par rapport aux souches en culture pure (El-Shafei et al., 2008; Fernandez et al., 2017; Schwenninger and Meile, 2004).

La fermentation avec une culture comportant des bactéries lactiques et propioniques est donc très étudiée sur les produits laitiers. Toutefois, seul un nombre limité d'études porte sur la co-fermentation des bactéries lactiques et propioniques dans les produits végétaux. Un mélange de culture de pré-fermentation composé de bactéries lactiques et propionique a montré son efficacité dans l'allongement de la durée de vie de pain de seigle et pain de blé au levain (Javanainen et Linko, 1993). Une autre étude a aussi été réalisée sur la co-fermentation des bactéries lactiques et propioniques sur le pain au blé (Tinzl-Malang et al., 2015). Les études sur la co-fermentation des bactéries lactiques et propioniques dans les produits végétaux sont donc peu nombreuses malgré la complémentarité de ces bactéries et le potentiel (nutritif mais aussi antioxydant et antimicrobien) des matrices végétales. Une autre stratégie à envisager est celle des fermentations successives avec des bactéries lactiques puis propioniques.

Les fermentations successives comme stratégie

Aucune étude sur les fermentations successives des bactéries lactiques et propioniques sur les matrices végétales n'a été répertoriée. Pourtant, les bactéries propioniques sont capables d'utiliser le lactate comme source de carbone et certaines espèces comme *P. freudenreichii* l'utilisent comme source de carbone préférentielle (Smid et Lacroix, 2013). L'hypothèse de travail de ce stage est une première fermentation des sucres contenus dans les extraits végétaux par les bactéries lactiques suivie d'une deuxième fermentation propionique utilisant le lactate produit lors de la première.

De surcroît, l'accumulation de composés issus de fermentations successives est une piste intéressante pour maximiser la production de composés antimicrobiens. Le potentiel antioxydant et antimicrobien des matrices végétales est également un élément à souligner et qui peut également apporter un gain d'activité antimicrobienne. La pertinence d'une stratégie de fermentations successives (lactique et propionique) pour le développement d'antimicrobien à partir de matrices végétales sera étudiée.

Il est à noter que pour croître, les bactéries propioniques ont non seulement besoin d'une source de carbone (sucres, acides, polyols) et d'azote (azote organique ou inorganique) mais aussi de microéléments (comme le fer, le magnésium, le cobalt, le manganèse, le cuivre) et des vitamines B8 et B5. Ces deux vitamines sont d'ailleurs des facteurs essentiels pour la croissance des bactéries propioniques (Stackebrandt et al., 2006 ; Falentin et al., 2010; Bourdichon et al., 2012). Ainsi, la matière première lactofermentée devra se composer de tous ces nutriments. Les conditions de fermentation (pH, température, O₂) seront aussi à maîtriser pour favoriser le développement des bactéries propioniques sur matrices végétales. Les conditions optimales de croissance pour les bactéries propioniques sont un pH proche de 7 et une température de 30°C. Elles se développent préférentiellement en anaérobiose mais sont toutefois aérotolérantes (Thierry et al., 2011). Ainsi les conditions de fermentation pour l'étude ont été définies comme tel : un pH égal à 6,5, une température d'incubation de 30°C et des conditions microaérophiles. La composition des matrices végétales lactofermentées n'étant pas totalement connue, des dosages concernant les acides aminés, les sucres et les acides seront nécessaires. Les métabolismes des espèces de bactéries propioniques dites laitières que sont : *A. thoenii* et *A. jensenii* ne sont pas décrits précisément dans la littérature.

Cette étude est issue d'une collaboration entre Symrise et l'INRAE. Les matrices étudiées dans cette étude seront le jus d'oignon et la purée de tomate car elles font parties des produits stratégiques de l'entreprise. De plus, l'oignon, en raison de ses propriétés antimicrobiennes décrites dans la littérature (Sagar et Pareek, 2020; Ye et al, 2013) est une matrice très intéressante à étudier. La purée de tomate est une matrice différente du jus d'oignon au niveau de la composition et de la texture. L'une des requêtes de l'entreprise étant de trouver des souches bactériennes polyvalentes pouvant s'adapter à différentes matrices, cette matrice est également utilisée. La question du stage est la suivante : **Peut-on produire des antimicrobiens par deux fermentations successives (lactique puis propionique) de matrices végétales ?**

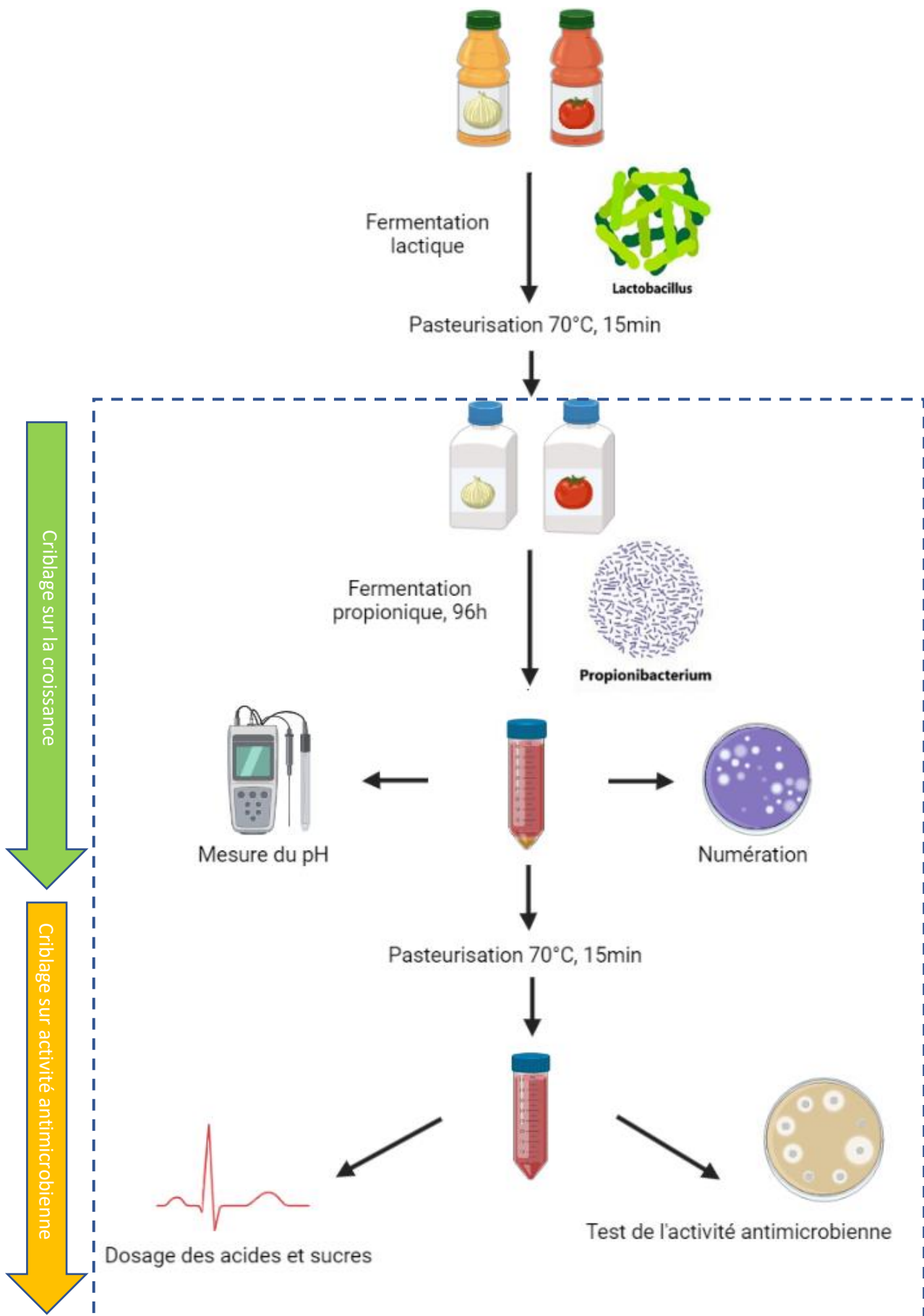


Figure 3: Méthode suivie pour l'identification des souches candidates (la partie encadrée en pointillé correspond à celle réalisée dans l'étude)

Pour cela, 20 souches de bactéries propioniques d'intérêt alimentaire ont été sélectionnées dans un premier temps selon leur espèce et leur métabolisme. Un premier criblage sur la croissance des souches dans les deux matrices végétales lactofermentées a été réalisé (figure 3). La croissance a été suivie par dénombrement sur boîte de Pétri et par enregistrement de l'acidification des matrices végétales. La population finale ciblée des bactéries propioniques devait être proche de 10^8 - 10^9 CFU/mL car un lien entre la population finale et la production d'antifongique a déjà été démontré (Salas, 2018). Ensuite, les produits de fermentation ayant atteint les plus hauts niveaux de population et la plus forte acidification ont été sélectionnés pour le criblage de l'activité antimicrobienne *in vitro* (figure 3). Les acides produits ont été dosés avant le test de l'activité antimicrobienne pour voir si une corrélation entre l'activité antimicrobienne et les proportions des acides organiques existait.

Matériel et méthodes

1. Matrices végétales étudiées

Deux matrices ont été retenues pour le projet : la purée de tomate et le jus d'oignon. La première fermentation faite avec les bactéries lactiques (*L. plantarum*) avait été préalablement réalisée par Bioprox, un prestataire de Diana. Les matrices ainsi lactofermentées ont été ensuite traitées thermiquement à 70°C pendant 15 minutes (afin d'éliminer la flore lactique), puis aliquotées en flacon de 5L et congelées par Bioprox. Avant leur mise en œuvre pour les fermentations propioniques, elles ont été traitées de la manière suivante :

- Un contrôle de la qualité microbiologiques des matrices lactofermentées a été réalisé : Des analyses microbiologiques sur la flore aérobie mésophile totale et les bactéries lactiques (*L. plantarum*) ont été réalisées afin de vérifier leur stérilité avant la mise en œuvre de fermentation propionique. Les analyses ont été réalisées en triplicat, et les boîtes de PCA et MRS ont été incubées respectivement en aérobiose et en anaérobiose pendant 48h à 37°C avant la lecture.

- Des analyses biochimiques portant sur la composition en sucres, acides organiques et acides aminés ont été menées en externe par un prestataire (Eurofins).
- Le pH a été remonté jusqu'à 6,5 ($\pm 0,1$) avec du NaOH 5M stérile.

2. Critère de sélection des souches de bactéries propioniques

Les 20 souches ont été sélectionnées à partir de la collection du CIRM-BIA, hébergée au sein du STLO. Les critères de choix ont été définis dans l'ordre de priorité suivant : la liberté de droit d'usage (1), le caractère non hémolytique (2), la capacité à métaboliser les sucres résiduels des matrices fermentées (3), le biotope d'origine (4). Le critère 1 est très important car l'entreprise a pour volonté d'exploiter industriellement la ou les souches bactériennes intéressantes. Le critère 2 a été défini car les souches seront utilisées en alimentaire. Le critère 5 permet de favoriser les souches issues d'un biotope végétal et supposément ayant une meilleure capacité à se développer dans les matrices végétales. Par ailleurs, lors d'une thèse précédemment réalisée au STLO, plusieurs souches de bactéries propioniques provenant du CIRM-BIA ont été testées pour leur activité antifongique sur substrat laitier. Les souches ne présentant pas d'activité antifongique sur des matrices lactières et celles mises en évidence comme actives mais déjà exploitées industriellement ont été éliminées.

3. Conditions de culture de *Propionibacterium* spp.

Les 20 souches de *Propionibacterium* spp. sélectionnées étaient conservées par le CIRM-BIA sous forme de stocks glycérolés à -80°C . Ces souches ont été repiquées (3%) en milieu YEL (Yeast Extract Lactate) comme proposé dans une étude (Malik et al, 1968). Les souches ont été cultivées dans des tubes de 10mL de YEL à 30°C sans agitation en condition microaérophile, puis elles ont été repiquées successivement deux fois (2%) avant d'être utilisées pour la fermentation des matrices végétales.

4. Fermentation propionique des matrices lactofermentées

Le jus d'oignon et la purée de tomate lactofermentés ont chacun été inoculés (2% v/v) avec les précultures des 20 bactéries propioniques sélectionnées. Les souches ont donc étéensemencées à $7,3 (\pm 0,5) \log \text{CFU/mL}$. Lors du criblage sur la croissance, la fermentation a été réalisée dans un volume de 5mL de substrats et à 30°C sans agitation en condition microaérophile pendant 96h ou plus si nécessaire. Le pH a été mesuré stérilement à 48h et à au temps final de fermentation. La numération a été réalisée uniquement en fin de fermentation (figure 3). Pour les tests d'activité antimicrobienne, des fermentations ont été réalisées dans les mêmes conditions, mais dans des volumes de 30ml. Pour les fermentations de 30 ml, les produits de fermentation ont été pasteurisés à 70°C pendant 15 min avant le dosage des acides organiques, des sucres résiduels et l'évaluation de l'activité antimicrobienne (figure 3).

5. Suivi de pH et dénombrements bactériens

Le pH a été suivi à 48 et/ou à 96h suivant le type d'essai avec un pH-mètre (S210, Mettler Toledo®). Des aliquots de 1 mL des jus fermentés par les différentes souches de bactéries propioniques ont été réalisés stérilement pour les mesures. Le pH-mètre était calibré avant chaque utilisation avec des solutions tampon pH 4 et 7.

Les dénombrements bactériens ont été réalisés à chaque fin de fermentation. Ils ont été effectués par micro-méthode (Baron et al., 2006). Cette méthode consiste à réaliser des dilutions de l'échantillon en série au $1/10^{\text{ème}}$ (jusqu'à 10^{-7}) dans un volume final de 200 μL . Un volume de 100 μL des dilutions appropriées est ensuite déposé dans chaque puits d'une plaque 6 puits, puis le milieu est coulé dans les puits. La méthode a été modifiée en utilisant à la place de la gélose YELA du PalProbiobac™ (Laboratoires Standa, Caen, France), un milieu sélectif favorisant la croissance de *Propionibacterium* spp. Les plaques ont ensuite été incubées pendant 7 jours à 30°C en anaérobiose (Anaerocult, Merck).

Les puits contenant entre 15 et 200 colonies ont été dénombrés. Le chiffre obtenu a été corrigé par le facteur de dilution correspondant.

6. Dosage des acides organiques et des sucres du produit de fermentation

Le dosage des acides organiques a été réalisé à l'aide d'un système chromatographique Dionex ICS – 6000 (ThermoFisher) équipé d'une colonne échangeuse d'anion (AS11-HC, ThermoFisher), d'un détecteur de conductivité et d'un suppresseur (ASRS 600). La phase mobile était une solution d'hydroxyde de potassium et l'élution a été réalisée en mode gradient. L'incertitude de la méthode est de 15% et en raison de problème de co-élution des acides acétique et lactique les résultats seront donnés à titre indicatif. La quantification des acides acétique et lactique n'étant pas exacte étant donné cette co-élution.

Le dosage des sucres a été réalisé à l'aide d'un système chromatographique UPLC Acquity HClass avec un détecteur à barrette de diodes équipé d'une précolonne XBridge BEH C18 VanGuard Cartridge et une colonne XBridge BEH Amide. Aucune précision n'a été apportée sur la préparation des échantillons et sur le mélange de solvant utilisé pour faire l'analyse par l'entreprise. L'incertitude de la méthode est de 10% avec une limite inférieure de quantification LLOQ = 250mg/L et une limite supérieure de quantification ULOQ = 7500mg/L.

7. Évaluation de l'activité antimicrobienne *in vitro*

L'évaluation de l'activité anti-microbienne des échantillons a été externalisée et réalisée par le prestataire Bactéries et Aliments (B&A, Saint-Nolff, France). Les cibles bactériennes sont *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Brochothrix thermosphacta* et *Carnobacterium maltomaticum*. Les cibles fongiques sont les suivantes : *Eurotium rubrum*, *Penicillium chrysogenum* (moisissures), *Zygosaccharomyces baillii*, *Candida zeylanoides* (levures). Ces cibles proviennent de la collection de B&A. Elles ont été conservées à -80°C pour bactéries et 4°C pour les levures et moisissures (Paul et al., 2015) dans des cryotubes glycérolés à 15%.

La méthode de dilution en gélose est utilisée pour évaluer l'activité antimicrobienne. Le produit de fermentation est ajouté dans les boîtes de Petri à différentes concentrations dans le milieu gélosé Mueller-Hinton : 10 ; 15 et 20% en condition stérile. Le milieu Mueller-Hinton a été supplémenté en sucre pour les levures et moisissures et en MRS à 10% pour les bactéries (Klare et al., 2005). Un volume de 4 μ L des suspensions, dont les concentrations sont connues, est déposé à la surface de la gélose pour chaque cible. La lecture pour l'activité antimicrobienne est réalisée à 24 et 48h pour les bactéries et à 72h pour les levures et moisissures. Un contrôle positif permettant de vérifier la croissance des cibles sur la gélose Muller-Hinton a été réalisé.

8. Analyses statistiques

Les analyses en composante principale (ACP) et de corrélation ont été réalisées à l'aide du logiciel R et des packages R factoshiny et Factominer.

Résultats

1. Caractérisation des matières premières lactofermentées

1.1 Qualité microbiologique

Aucune colonie n'a été observée sur les géloses MRS et PCA inoculées avec le jus d'oignon lactofermenté. La pasteurisation a donc détruit la population de *L. plantarum* issue de la fermentation lactique comme attendu. En revanche, une concentration de *L. plantarum* d'environ 5×10^3 UFC/mL a été mesurée sur gélose MRS dans la purée de tomate lactofermentée. Sur gélose PCA en revanche, aucune colonie n'a été observée. Un traitement thermique supplémentaire (75°C ; 30 min) a donc été appliqué sur la purée de tomate lactofermentée.

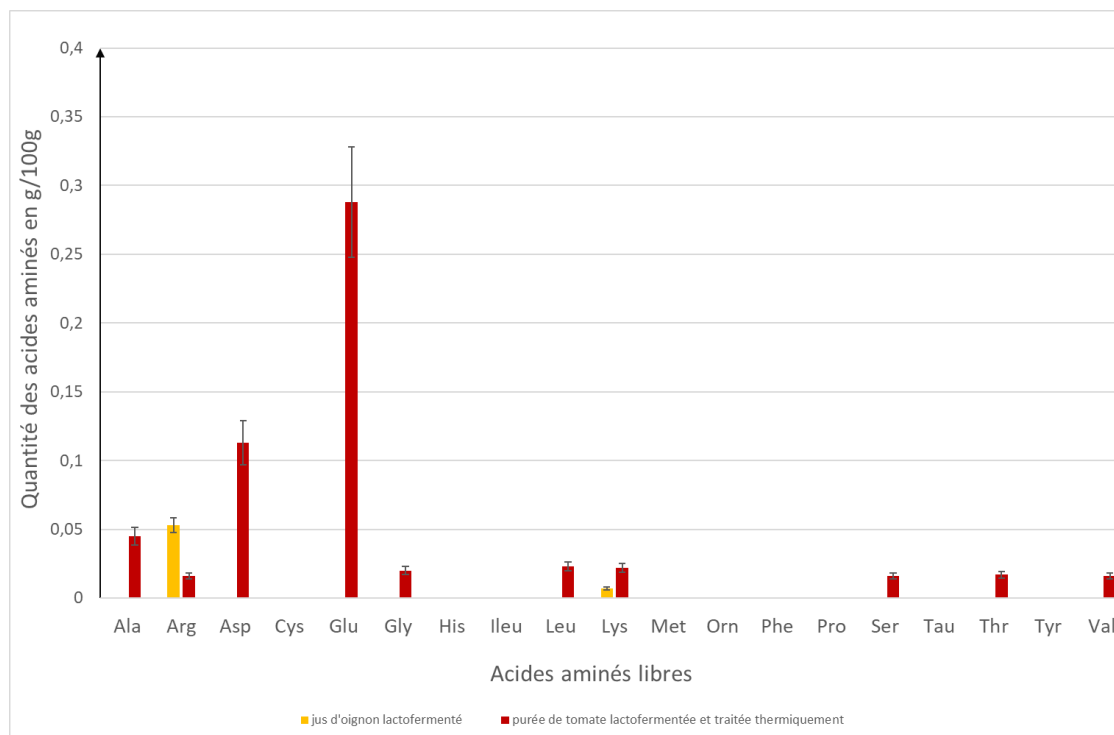


Figure 4 : Composition en acides aminés libres du jus d'oignon lactofermenté et de la purée de tomate lactofermentées et traitée thermiquement

Souches	Taxon	Autorisation_diffusion	Beta_hemolyse	D-fructose	D-glucose	D-saccharose	Biotope	Testé par L. Garnier
CIRM-BIA1536	Acidipropionibacterium jensenii	libre de droit	Negative	+	+	+	lait cru	#N/A
CIRM-BIA1657	Acidipropionibacterium jensenii	libre de droit	Negative	+	+	+	fromage (Ras)	#N/A
CIRM-BIA120	Propionibacterium freudenreichii	libre de droit	Negative	+	+	+	fromage (Gruyère)	#N/A
CIRM-BIA123	Propionibacterium freudenreichii	libre de droit	Negative	+	+	+	fromage au lait cru (Morbier)	#N/A
CIRM-BIA119	Propionibacterium freudenreichii	libre de droit	Negative	+	+	-	fromage (Gruyère)	#N/A
CIRM-BIA7	Propionibacterium freudenreichii	libre de droit	Negative	+	+	-	lait cru	#N/A
CIRM-BIA511	Propionibacterium freudenreichii	libre de droit	Negative	+	+	-	fromage (Gruyère)	#N/A
CIRM-BIA1408	Propionibacterium freudenreichii	libre de droit	Negative	+	+	-	fromage (Tilsitt)	#N/A
CIRM-BIA1414	Propionibacterium freudenreichii	libre de droit	Negative	+	+	-	fromage au lait cru (Morbier)	#N/A
CIRM-BIA1476	Propionibacterium freudenreichii	libre de droit	Negative	+	+	-	fromage (Cheddar)	#N/A
CIRM-BIA1991	Acidipropionibacterium acidipropionici	libre de droit	Negative	+	+	+	fromage (Ras)	#N/A
CIRM-BIA1993	Acidipropionibacterium acidipropionici	libre de droit	Negative	+	+	+	foin	#N/A
CIRM-BIA1994	Acidipropionibacterium acidipropionici	libre de droit	Negative	+	+	+	foin	#N/A
CIRM-BIA1998	Acidipropionibacterium acidipropionici	libre de droit	Negative	+	+	+	déchets	#N/A
CIRM-BIA2000	Acidipropionibacterium acidipropionici	libre de droit	Negative	+	+	+	foin	#N/A
CIRM-BIA2007	Acidipropionibacterium acidipropionici	libre de droit	Negative	+	+	+	eaux usées	#N/A
CIRM-BIA1653	Acidipropionibacterium acidipropionici	libre de droit	Negative	+	+	+	fromage de yak	#N/A
CIRM-BIA1766	Acidipropionibacterium acidipropionici	libre de droit	Negative	+	+	+	eaux usées	#N/A
CIRM-BIA1662	Acidipropionibacterium thoenii	libre de droit	Negative	+	+	+	fromage (Beaufort)	#N/A
CIRM-BIA1429	Acidipropionibacterium thoenii	libre de droit	Negative	+	+	+	lait cru	testé

Tableau 1 : Récapitulatif des caractéristiques des souches sélectionnées suivant les critères définis (Source : CIRM-BIA, UMR STLO, INRAE)

1.2 Composition en sucres et en acides

Les concentrations en glucose, fructose et saccharose dans le jus d'oignon lactofermenté sont respectivement de : 5,3 g/L ; 12,5 g/L et 6,5 g/L. La purée de tomate lactofermentée contient 4,3 g/L de glucose et 8 g/L de fructose. La concentration en lactate est de 8g/L dans le jus d'oignon lactofermenté contre 15,2 g/L dans la purée de tomate lactofermentée.

1.3 Composition en acides aminés

Le jus d'oignon contient moins de 0,08 g/100g d'azote total dont 0,053g/100g d'arginine libre et 0,007g/100g de lysine libre. La purée de tomate lactofermentée présente une teneur en azote total de 0.15 ($\pm 0,07$) g/100 g. Au total, 0,58g/100g d'acides aminés libres sont présents dans la purée de tomate. Pour plus de précisions, les résultats sont détaillés sur la figure 4.

2. Sélection des souches de bactéries propioniques à cribler

Les souches à tester ont été choisies dans les proportions suivantes selon leur espèce : 8 souches *P. freudenreichii*, 8 souches *A. acidipropionici*, 2 souches *A. thoenii* et 2 souches *A. jensenii*. Les espèces *P. freudenreichii* et *A. acidipropionici* ont été favorisées car elles ont le statut GRAS et/ou QPS. Les souches choisies pour le criblage sont listées dans le tableau 1 regroupant les critères décrits précédemment.

3. Fermentation propionique du jus d'oignon lactofermenté

3.1 Criblage sur la croissance des souches de bactéries propioniques dans le jus d'oignon lactofermenté

Le jus d'oignon lactofermenté n'a pas permis la croissance des 20 souches sélectionnées préalablement et ce, même après 168h. Quelle que soit la souche considérée, l'augmentation de population était très faible et non significative (erreur méthode = $\pm 0,5$ logCFU/mL) ou en déclin par rapport à la population initiale inoculée (Annexe 1). Malgré l'absence de division cellulaire, le pH a diminué de façon variable selon les espèces inoculées. Globalement, les souches d'*A. acidipropionici* ont le plus acidifié le jus d'oignon avec un delta pH max de 1,31 (Annexe 1).

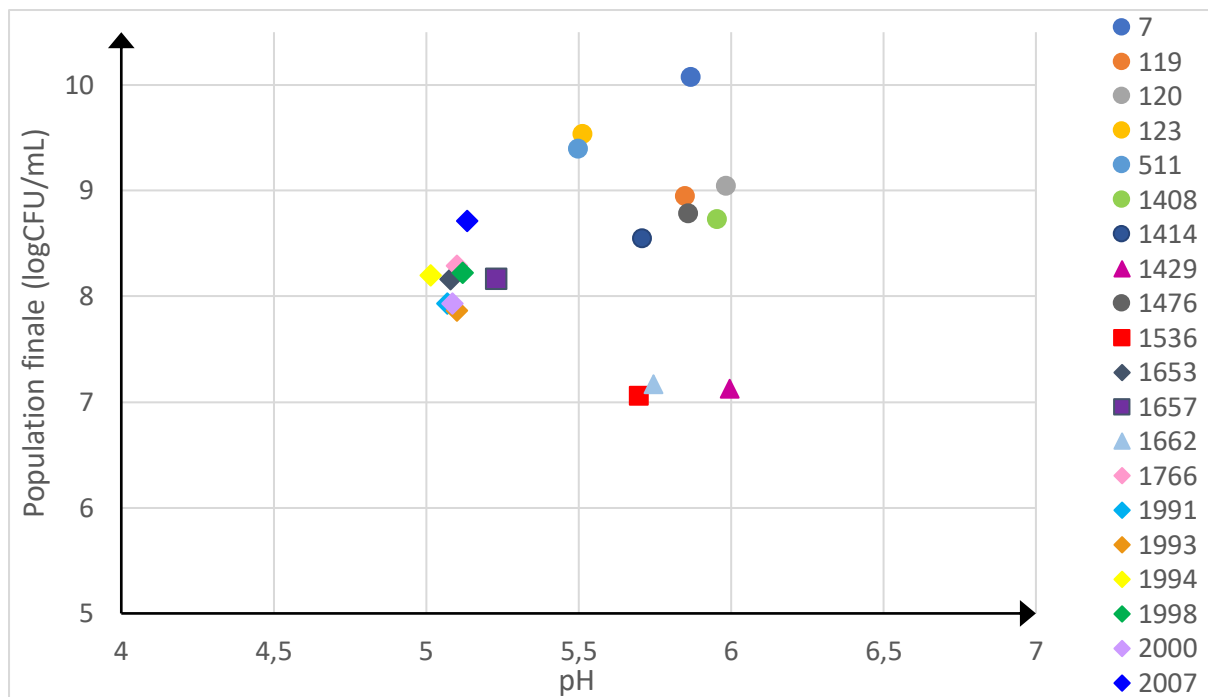


Figure 5 : Représentation simplifiée de la population finale des souches en fonction du pH pour la fermentation du jus d'oignon lactofermenté et supplémenté en extrait de levure (Données graphiques détaillées en annexe 2)

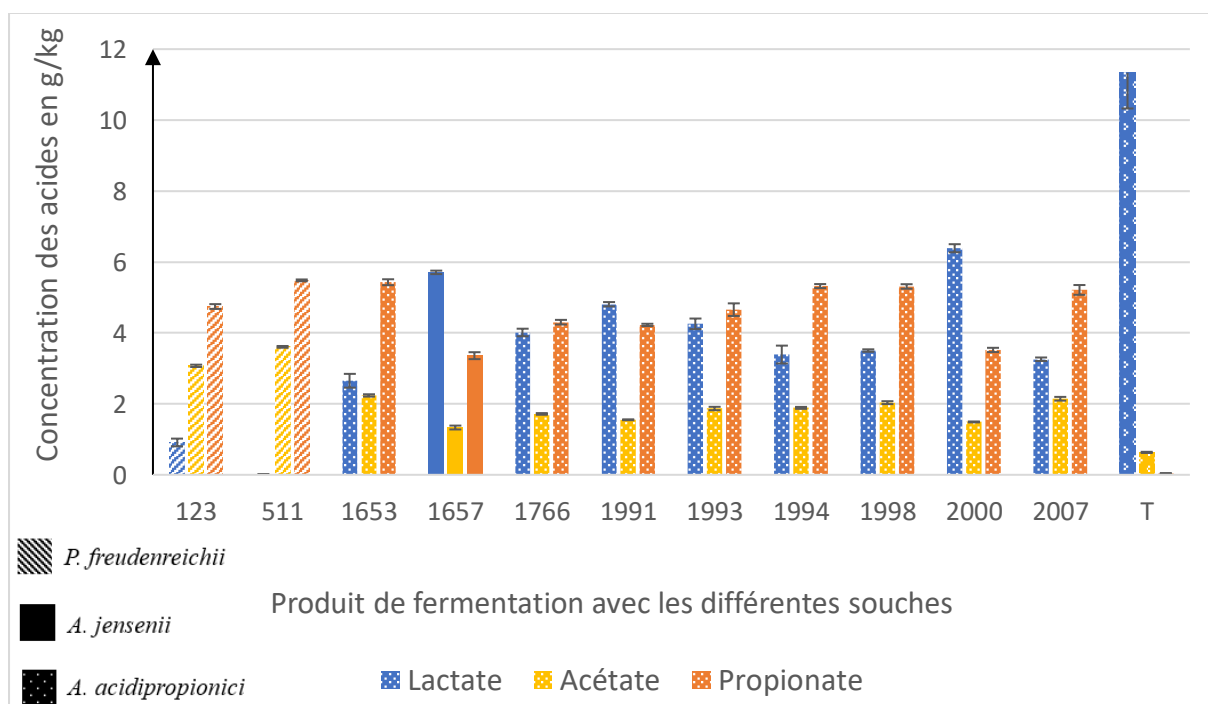


Figure 6 : Profil en acides organiques du jus d'oignon lactofermenté supplémenté avec de l'extrait de levure, puis fermenté avec les souches de bactéries propioniques sélectionnées. Le témoin (T) est constitué du même milieu, sans fermentation propionique.

La supplémentation en extrait de levure à 10g/L (Biokar) a permis une meilleure croissance et acidification pour toutes les souches sur 96h. L'apport en acides aminés et en vitamines permet donc la croissance des bactéries propioniques en jus d'oignon lactofermenté. Les souches sélectionnées pour le criblage de l'activité antimicrobienne sont donc les souches présentant le plus de croissance et d'acidification dans le jus d'oignon supplémenté en extrait de levure (figure 5). Les souches de l'espèce *P. freudenreichii* : CIRM-BIA123 et 511, de l'espèce *A. acidipropionici* : CIRM-BIA1653, 1766, 1991, 1993, 1994, 1998, 2000 et 2007 et la souche de l'espèce *A. jensenii* : CIRM-BIA1657, (11 souches au total) ont donc été sélectionnées pour tester l'activité antimicrobienne.

3.2 Criblage sur l'activité antimicrobienne dans le jus d'oignon lactofermenté

Les souches sélectionnées à l'issue du premier criblage (croissance et acidification) ont été mises en œuvre dans une nouvelle fermentation de jus d'oignon lactofermenté et supplémenté avec de l'extrait de levure.

3.2.1 Dosage des acides organiques

Le jus d'oignon lactofermenté et supplémenté en extrait de levure (non inoculé) contenait par kilo : 11,3 g de lactate, 0,6 g d'acétate et 0 g de propionate (figure 6). La concentration en lactate dans le jus d'oignon fermenté avec les bactéries propioniques variaient de 0,009 à 7,62 g/kg (figure 6). Cela est inférieur au témoin qui avait une quantité de lactate de 11,3g/kg. Les profils de mélange d'acides étaient très variés selon les souches utilisées. La quantité maximale d'propionate atteinte était de 5,48g/Kg de jus d'oignon (fermentation avec la souche CIRM-BIA511 ; espèce : *P. freudenreichii*). La quantité d'acétate produite était la plus importante dans les jus d'oignon fermentés par les souches de *P. freudenreichii* avec 2,97 et 2,44g/kg pour les souches CIRM-BIA123 et CIRM-BIA511 respectivement.

Souche	Espèce	$Y_{m\ p/l}$	$Y_{p/l}$	$Y_{m\ a/l}$	$Y_{a/l}$	ratio P/A des fermentations
123	<i>P. freudenreichii</i>	0,46	0,38	0,23	0,19	1,55
511	<i>P. freudenreichii</i>	0,48	0,40	0,26	0,22	1,47
1653	<i>A. acidipropionici</i>	0,63	0,52	0,18	0,15	2,69
1657	<i>A. jensenii</i>	0,60	0,50	0,12	0,10	3,82
1766	<i>A. acidipropionici</i>	0,59	0,49	0,15	0,12	3,16
1991	<i>A. acidipropionici</i>	0,65	0,54	0,14	0,12	3,66
1993	<i>A. acidipropionici</i>	0,66	0,55	0,17	0,15	3,00
1994	<i>A. acidipropionici</i>	0,67	0,56	0,16	0,13	3,38
1998	<i>A. acidipropionici</i>	0,68	0,56	0,18	0,15	3,02
2000	<i>A. acidipropionici</i>	0,71	0,59	0,17	0,14	3,27
2007	<i>A. acidipropionici</i>	0,65	0,54	0,19	0,16	2,75

Tableau 2 : Récapitulatif des rendements et du ratio P/A (propionate/acétate) pour les fermentations en jus d'oignon

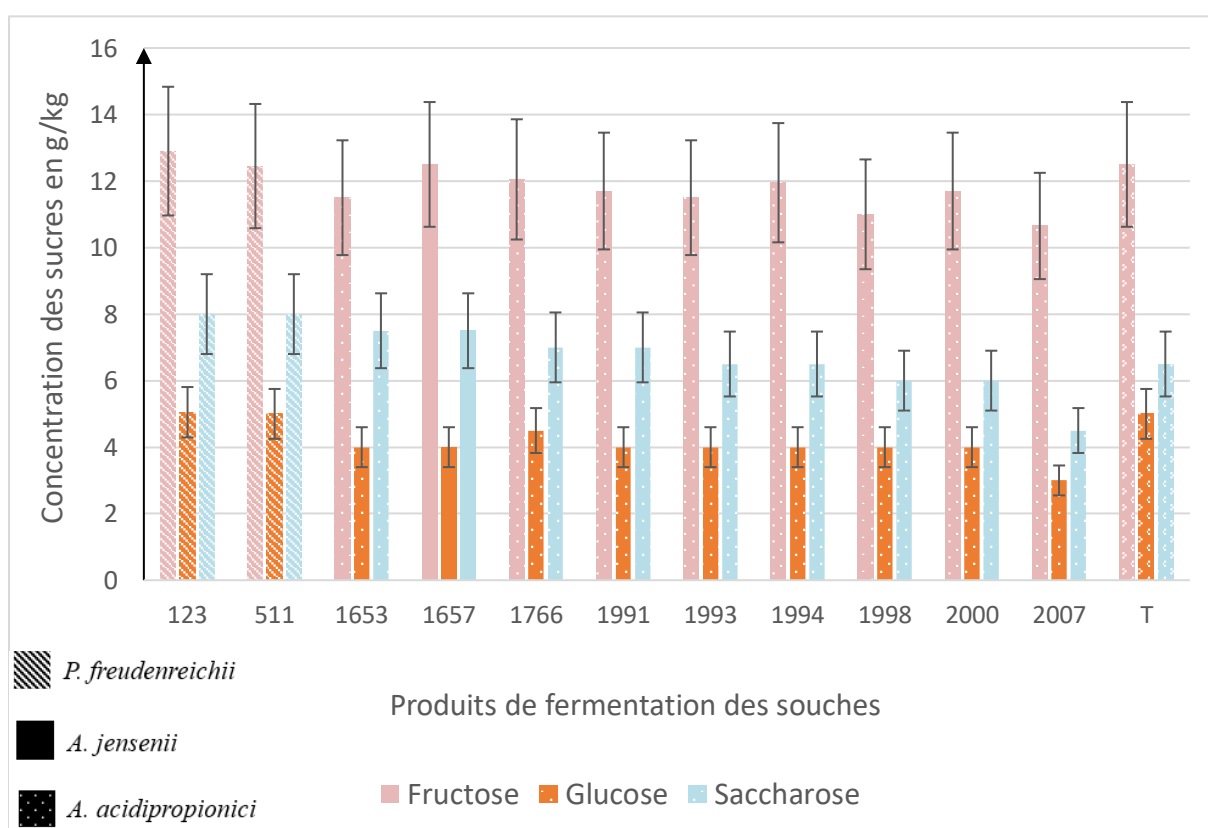


Figure 7 : Profil des sucres du jus d'oignon lactofermenté, supplémenté en extrait de levure et fermenté pendant 96h avec les souches propioniques sélectionnées. Le témoin (T) correspond au jus d'oignon lactofermenté supplémenté non inoculé.

Les espèces de bactéries propioniques peuvent être classées suivant leur rendement massique $Y_{mp/l}$ de la manière suivante : *A. acidipropionici* ($Y_{mp/l} \approx 0,65$) > *A. jensenii* ($Y_{mp/l} = 0,60$) > *P. freudenreichii* ($Y_{mp/l} \approx 0,47$). Le classement pour le rendement $Y_{ma/l}$ est le suivant : *P. freudenreichii* > *A. acidipropionici* > *A. jensenii* (tableau 2). Le ratio P/A est supérieur à 2 pour les fermentations avec toutes les souches sauf celle de l'espèce *P. freudenreichii* (tableau 2).

3.2.2 Dosage des sucres

Concernant les fermentations du jus d'oignon lactofermentés, les sucres dosés (glucose, fructose, saccharose) n'ont pas une concentration significativement différente du témoin après 96h (figure 7). Seule la souche CIRM-BIA2007 (*A. acidipropionici*) a utilisé le glucose (différence significative observable). Les rendements calculés avec cette souche ($Y_{mp/l}$ et $Y_{ma/l}$) ne sont alors pas exacts car ils n'intègrent pas l'utilisation du glucose.

3.2.3 Analyse de l'activité antimicrobienne des jus d'oignon propiofermentés

Les témoins positifs réalisés lors des tests étaient conformes aux attentes. L'activité antimicrobienne des jus d'oignon fermentés successivement a été évaluée sur les cibles microbiennes décrites précédemment. Le témoin négatif, réalisé avec le jus d'oignon lactofermenté, supplémenté en extrait de levure mais non propiofermenté, n'inhibait aucune des cibles bactériennes à 24h et 48h (Annexe 3). Sur les onze échantillons de jus d'oignon fermentés avec les souches propioniques sélectionnées, cinq présentaient une activité antibactérienne à 24h sur certaines cibles lorsqu'ils étaient intégrés à 20% dans la gélose (Annexe 3). Aucun des échantillons n'inhibait toutes les cibles bactériennes. Les produits des fermentations successives ont donc permis un retard de l'altération de 24h selon les cibles par rapport aux témoins. Les réplicats n'étaient pas toujours répétables dans certains cas.

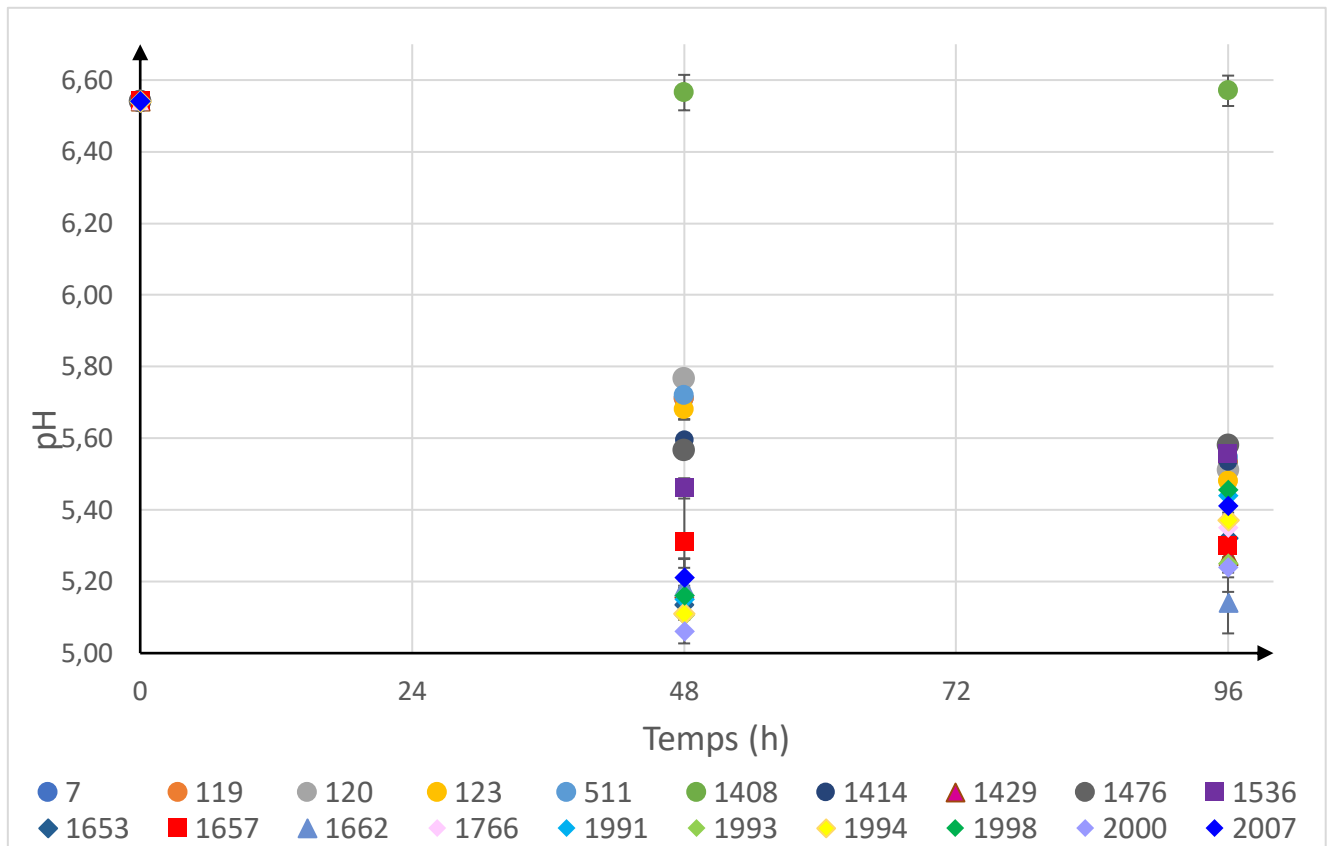


Figure 8 : Evolution pendant 96h du pH de la purée de tomate lactofermentée inoculée avec les différentes souches appartenant aux espèces *P. freudenreichii* (●); *A. thoenii* (▲); *A. jensenii* (■); *A. acidipropionici* (◆)

Les souches permettant d'obtenir un jus d'oignon avec une activité antibactérienne ayant le plus large spectre d'activité sont les suivantes par ordre décroissant de spectre d'activité : CIRM-BIA1998, CIRM-BIA1993, CIRM-BIA1994, CIRM-BIA511 et CIRM-BIA2007. Ce sont toutes des *A. acidipropionici* sauf la souche CIRM-BIA511 qui est une *P. freudenreichii*.

Seules certaines fermentations ont également été testées pour l'activité antifongique par le prestataire en raison d'un manque de temps de celui-ci. Ne sera présenté qu'une analyse restreinte aux souches CIRM-BIA511 (*P. freudenreichii*), CIRM-BIA1993, CIRM-BIA1994 et CIRM-BIA1998 (*A. acidipropionici*). La cible *Eurotium rubrum* s'est avérée la plus sensible aux jus d'oignon fermentés successivement, avec une inhibition à 48h pour toutes les concentrations mises en œuvre (Annexe 3).

Les jus fermentés avec les souches CIRM-BIA1993, CIRM-BIA1994 et CIRM-BIA1998 ont affecté également la croissance de *Penicillium chrysogenum* à 48h quand ils ont été introduits à 20% dans la gélose. Aucun des produits de fermentation testés ne s'est avéré efficace sur les cibles fongiques à 72h (Annexe 3).

Pour conclure, le jus d'oignon propiofermenté permet un retard du développement de certains microorganismes d'altération de 24h, dans nos conditions de test.

4. Fermentation propionique d'une purée de tomate lactofermentée

4.1 Criblage sur la croissance des souches dans la purée de tomate lactofermentée

Lors de la deuxième fermentation, toutes les souches propionique ont permis la diminution du pH d'environ une unité ou plus à 96h, sauf la souche CIRM-BIA1408 pour laquelle le pH n'a pas varié (figure 8). Les souches de l'espèce *A. thoenii* étaient celles ayant le plus acidifié la purée à 96h suivies par les souches d'*A. acidipropionici* et *A. jensenii*.

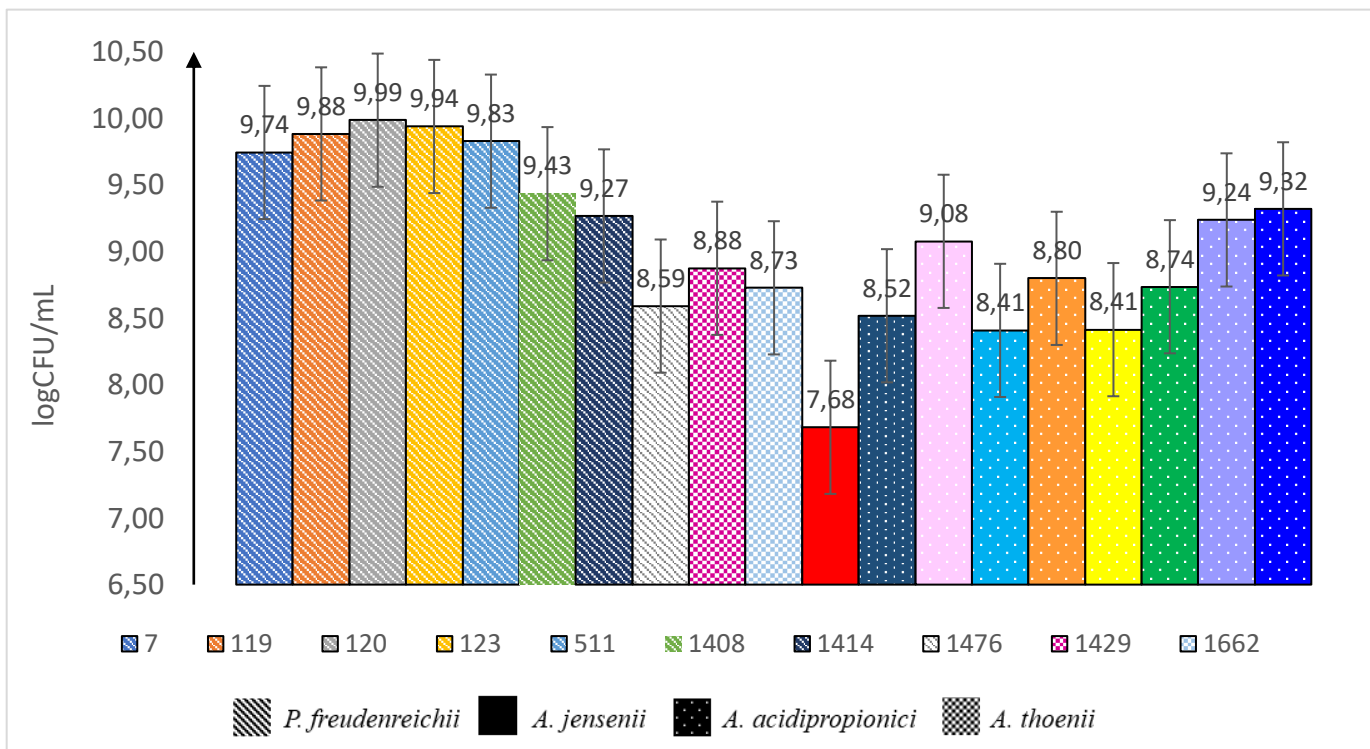


Figure 9 : Population finale atteinte par les souches après 96h de fermentation dans la purée de tomate

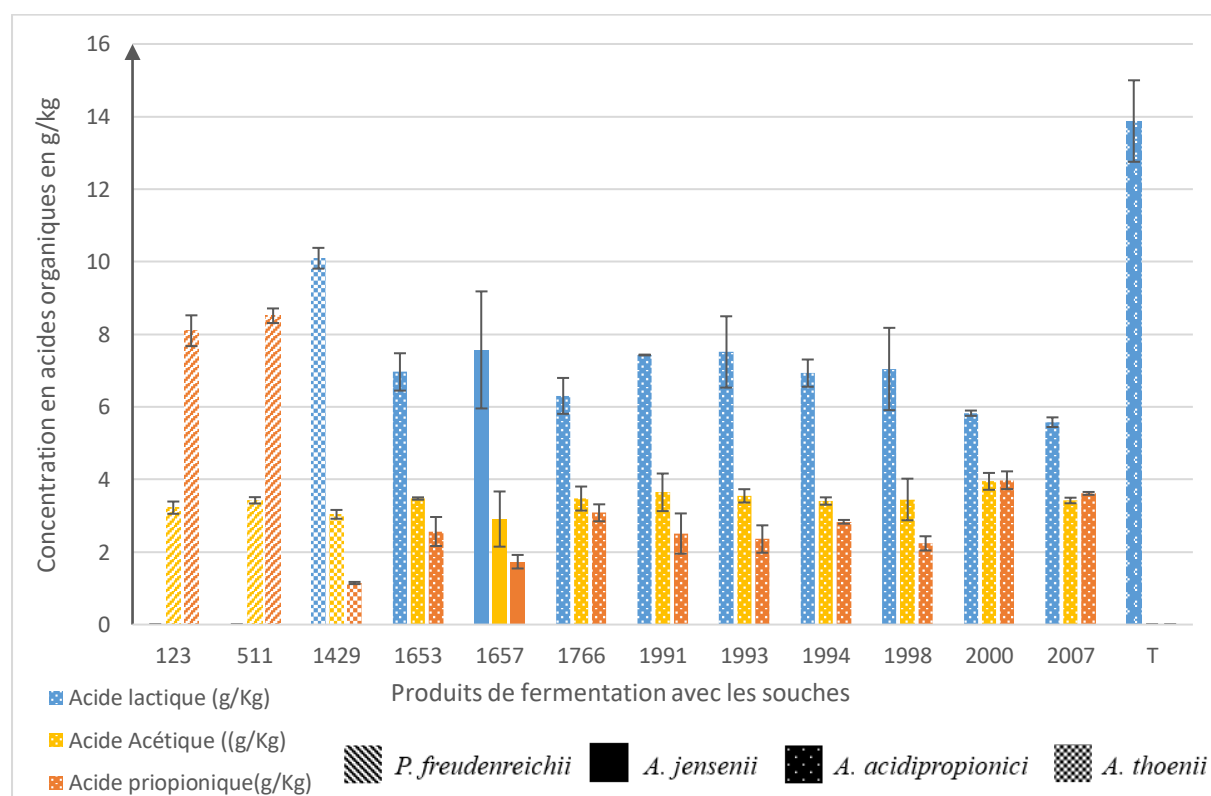


Figure 10 : Profil des acides organiques de la purée de tomate lactofermentée et fermentée avec les souches propioniques sélectionnées. Le témoin (T) est constitué du même milieu, sans fermentation propionique.

Concernant la population finale de bactéries propioniques après 96h de fermentation, des différences ont été observées suivant les souches et les espèces. Les souches appartenant à l'espèce *P. freudenreichii*, *A. acidipropionici* et *A. thoenii* ont atteint la plus forte population finale avec entre 8,4 et 10 log CFU/mL après 96h de fermentation (figure 9). La souche CIRM-BIA1657 (*A. jensenii*) n'a pas eu d'augmentation significative de population après 96h de fermentation et la souche CIRM-BIA1536 n'a pas pu être dénombrée. Malgré des différences observées avec le jus d'oignon lactofermenté, les mêmes souches propioniques que celles utilisées pour le criblage sur l'activité antimicrobienne seront testées sur la purée de tomate. La souche CIRM-BIA1429 (*A. thoenii*) a été rajoutée au portoir en raison d'une meilleure croissance sur la purée de tomate lactofermentée et pour diversifier les espèces criblées.

4.2 Criblage sur la production d'acides et l'activité antimicrobienne dans la purée de tomate lactofermentée

4.2.1 Dosage des acide organiques

La purée de tomate lactofermentée avant la fermentation propionique contenait par kilo : 13,9 g de lactate et une quantité d'acides acétique et propionique inférieure à la limite de détection. Le témoin présentait donc majoritairement du lactate comme attendu. Après 96h de fermentation avec les différentes souches, la quantité de lactate a bien diminué en comparaison avec le témoin. Les concentrations en lactate de ces fermentations variaient de 0 à 10,1 g/kg, ce qui est bien inférieur au 13,9 g de lactate/kg du témoin (figure 10). La quantité maximale de propionate atteinte était de 8,51 g/kg de purée de tomate (fermentation avec la souche CIRM-BIA511, esp *P. freudenreichii*). La quantité d'acétate produite était comprise entre 2,91 et 3,95 g/kg (figure 10). Les souches appartenant à l'espèce *P. freudenreichii* sont celles ayant consommées le plus de lactate. *A contrario*, la souche CIRM-BIA1429 (*A. thoenii*) a utilisé le moins le lactate.

Souches	Espèces	$Y_{m,p/l}$	$Y_{p/l}$	$Y_{m,a/l}$	$Y_{a/l}$	ratio P/A des produits de fermentations
123	<i>P. freudenreichii</i>	0,58	0,70	0,23	0,35	1,98
511	<i>P. freudenreichii</i>	0,61	0,74	0,25	0,38	1,96
1429	<i>A. thoenii</i>	0,30	0,36	0,80	1,23	0,30
1653	<i>A. acidipropionici</i>	0,37	0,45	0,50	0,77	0,58
1657	<i>A. jensenii</i>	0,27	0,33	0,46	0,70	0,47
1766	<i>A. acidipropionici</i>	0,41	0,49	0,46	0,70	0,70
1991	<i>A. acidipropionici</i>	0,39	0,47	0,57	0,86	0,54
1993	<i>A. acidipropionici</i>	0,37	0,45	0,56	0,85	0,52
1994	<i>A. acidipropionici</i>	0,41	0,49	0,49	0,75	0,66
1998	<i>A. acidipropionici</i>	0,33	0,39	0,50	0,77	0,51
2000	<i>A. acidipropionici</i>	0,49	0,59	0,49	0,75	0,8
2007	<i>A. acidipropionici</i>	0,44	0,52	0,41	0,63	0,83

Tableau 4 : Récapitulatif des rendements et du ration P/A (propionate/acétate) pour les fermentations en purée de tomate

Les espèces de bactéries propioniques peuvent être classées suivant leur rendement massique $Y_{mp/l}$ de la manière suivante : *P. freudenreichii* ($Y_{mp/l} \approx 0,60$) > *A. acidipropionici* ($Y_{mp/l} \approx 0,40$) > *A. thoenii* et *A. jensenii* (tableau 4). Le classement pour le rendement $Y_{m_a/l}$ est le suivant : *A. thoenii* > *A. acidipropionici* > *A. jensenii* > *P. freudenreichii* (tableau 4). Les ratios P/A sont très variés suivant les espèces et les souches.

4.2.2 Dosage des sucres

Concernant les fermentations en purée de tomate, le dosage des sucres n'a pas été réalisé.

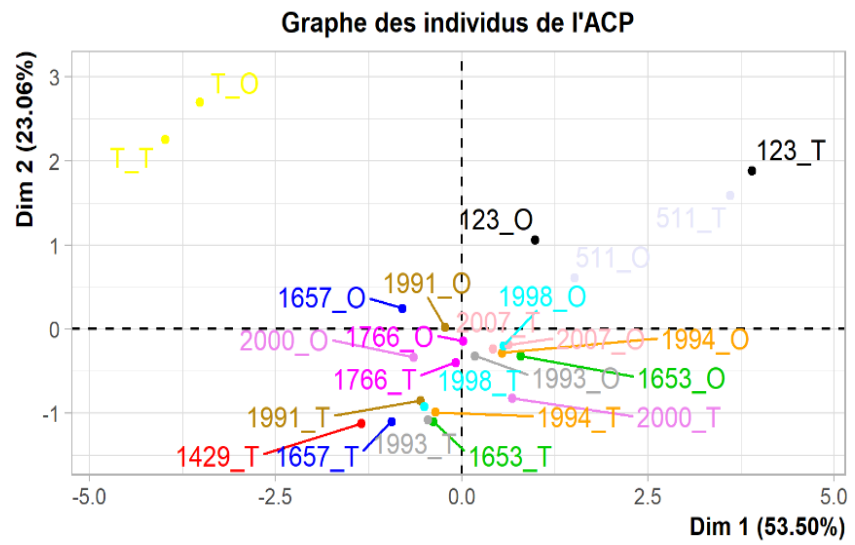
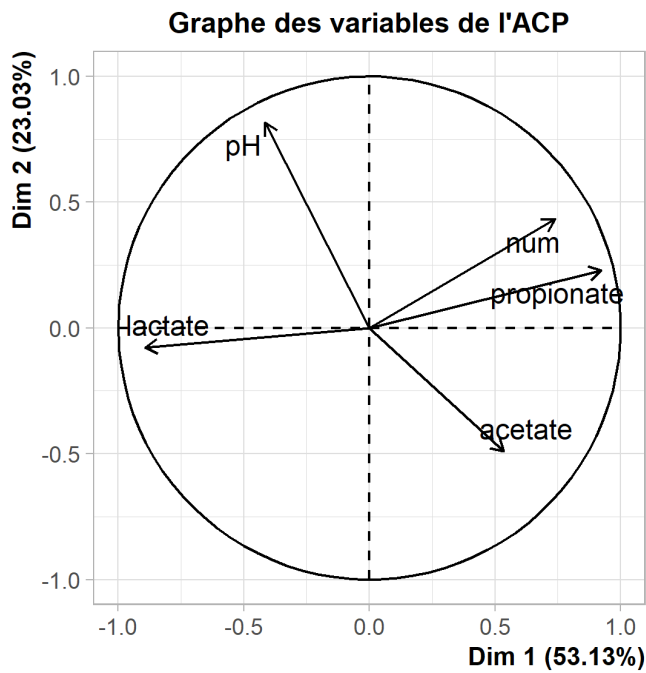
4.2.3 Analyse de l'activité antimicrobienne de la purée de tomate propiofermentée

L'analyse de l'activité antimicrobienne est en cours de réalisation par le prestataire B&A. Les résultats n'apparaîtront donc pas dans le rapport.

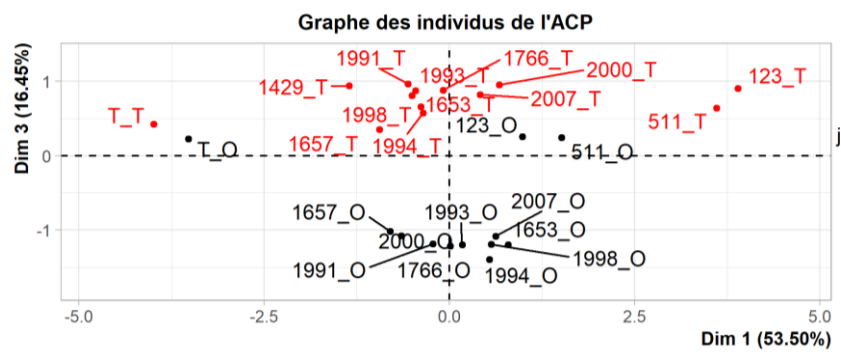
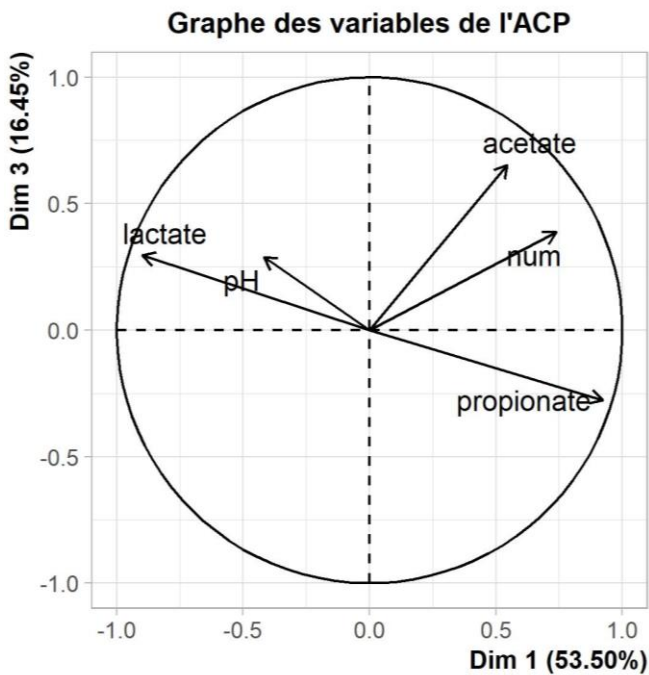
5. Analyse par statistique descriptive (ACP) des résultats

Les éléments pris en compte pour l'ACP sont les concentrations en acides organiques dosés, le pH à 96h, la population microbienne finale (num), l'espèce, la souche et la matrice. Les résultats concernant les acides aminés n'ont pas été utilisés car les dosages n'ont pas été réalisés en fin de fermentation et ni initialement sur le jus d'oignon supplémenté en extrait de levure. Toutes ces données ont été compilées pour être visualisées dans une analyse en composante principale (ACP).

(A)



(B)



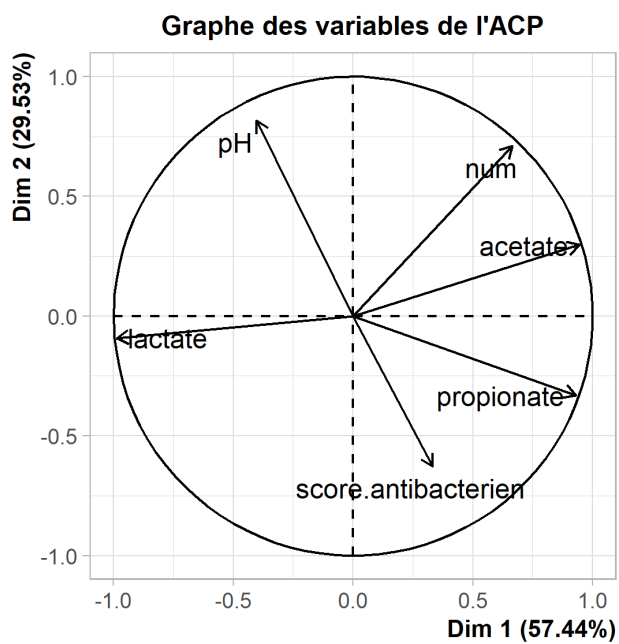
Matrice :

- oignon
- tomate

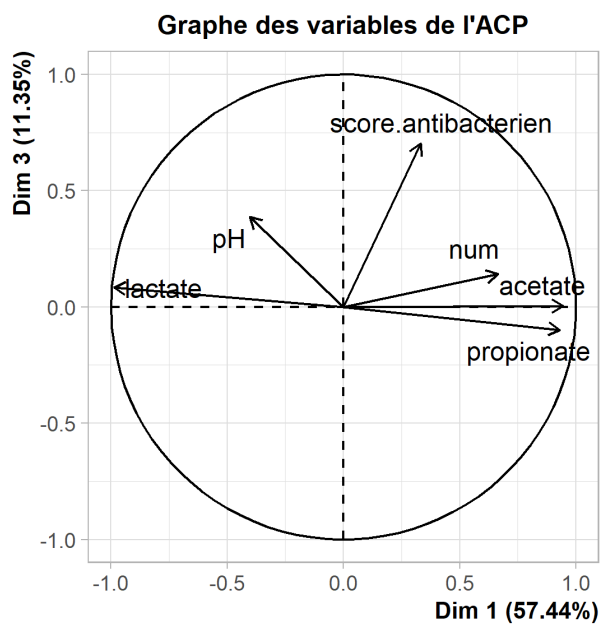
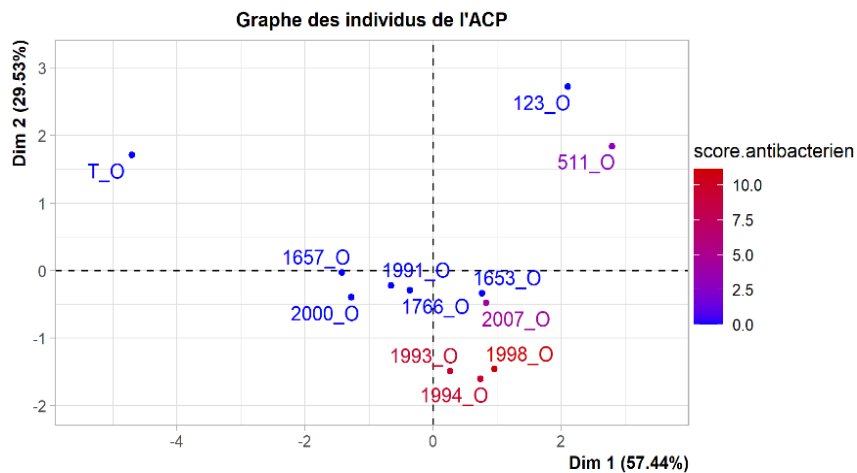
Figure 11 : Corrélation entre les concentrations en acides organiques, le pH et les populations finales atteintes. Analyse en Composante Principale (ACP) : (A) présentation des variables et des individus sur l'axe 1 et 2, (B) sur l'axe 1 et 3.

Sur la figure 11 (A), l'axe 1 explique 53,1 % et l'axe 2 explique 23,0 % de la variation. Ainsi, pour 9 variables et 25 individus, le plan de l'ACP résume bien l'information car le pourcentage d'inertie est de 76,1%, ce qui est supérieur à celui correspondant à l'indépendance entre les variables (46 %). La projection des variables sur le plan est bonne (\cos^2 proche de 1) sauf pour la concentration en acétate ($\cos^2 = 0,52$). L'axe 1 est expliqué par la concentration en lactate et l'axe 2 est le mieux expliqué par le pH. La concentration de propionate est négativement corrélée à la concentration en lactate. Cela est cohérent puisque le lactate est consommé par les bactéries pour produire du propionate. La population finale et la concentration en propionate sont des variables proches et corrélées positivement à l'axe 1. Moins il y a de lactate et plus la population finale et la concentration en propionate sont élevées. Le pH et la concentration en acétate sont opposés. La concentration en acétate affecterait le pH mais la mauvaise qualité de projection de cette variable sur le plan ne permet pas d'affirmer cette hypothèse. Sur la représentation des individus, on remarque que les matrices fermentées avec les deux souches CIRM-BIA123 et CIRM-BIA511 (*P. freudenreichii*) sont les fermentations ayant la plus faible concentration de lactate.

Sur la figure 11 (B), on voit que l'axe 1 explique 53.5 % de la variation et l'axe 3 explique 16.45 % de la variation. La projection des variables sur le plan est bonne (\cos^2 proche de 1) sauf pour le pH ($\cos^2 = 0,25$). L'axe 1 sépare les produits de fermentation selon leur concentration en lactate et l'axe 3 les séparent suivant leur concentration en acétate. L'ACP montre que la population finale et la concentration en acétate sont corrélées positivement. Si on observe la représentation des individus, on remarque que les 2 souches CIRM-BIA1991 et CIRM-BIA2000 sont celles ayant permis la plus forte concentration d'acétate dans la purée de tomate. L'axe de la concentration en acétate sépare les fermentations en deux, suivant la matrice, pour l'espèce *A. acidipropionici*.



(A)



(B)

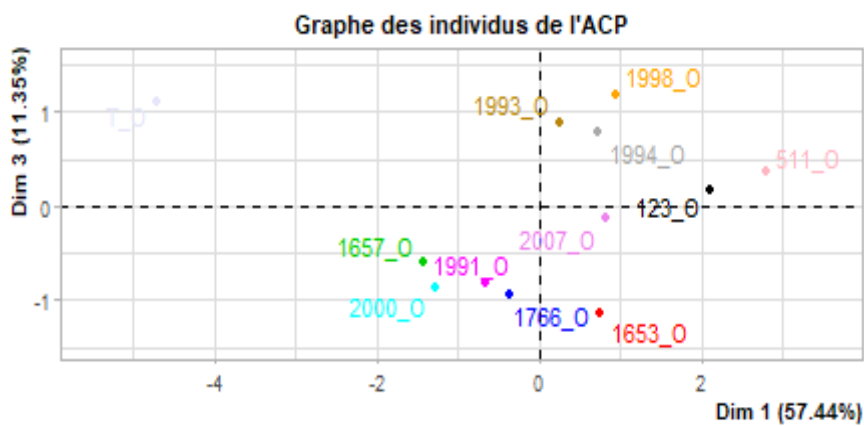


Figure 12 : Corrélation entre les concentrations en acides organiques, le pH, les populations finales atteintes et le score antibactérien du jus d'oignon. Analyse en Composante Principale (ACP) : (A) présentation des variables et des individus sur l'axe 1 et 2, (B) sur l'axe 1 et 3.

Une ACP a également été réalisée avec les données sur le jus d'oignon. Les éléments pris en compte pour l'ACP sont les concentrations en acides organiques dosés, le pH, la population microbienne finale (num), l'espèce, la souche et l'activité antibactérienne.

Sur la figure 12 (A), l'axe 1 explique 57,4 % et l'axe 2 explique 29,5% de la variation. Ainsi, le plan de l'ACP résume bien l'information. La projection des variables sur le plan est bonne (\cos^2 proche de 1) sauf pour le score antibactérien. L'axe 1 est expliqué par la concentration en lactate et l'axe 2 est le mieux expliqué par le pH comme précédemment. La concentration en propionate est opposée au pH. Les concentrations de propionate et d'acétate sont opposées à la concentration en lactate. Cela est cohérent puisque le lactate est consommé par les bactéries propioniques pour produire du propionate et de l'acétate. Sur la représentation des individus, on remarque que les matrices fermentées avec les souches CIRM-BIA1993, 1994 et 1998 (*A. acidipropionici*) sont les fermentations ayant le meilleur score antibactérien.

Sur la figure 12 (B), on voit que l'axe 1 explique 57.44 % de la variation et l'axe 3 explique 11.35 % de la variation. Le score antibactérien expliquerait l'axe 3 mais il n'est pas bien projeté sur le plan.

Discussion

L'objectif était de savoir s'il était possible de produire des antimicrobiens par deux fermentations successives (une fermentation lactique puis propionique) de matrices végétales. Un premier criblage a été réalisé sur la croissance et l'activité métabolique (acidification) des 20 souches de bactéries propioniques testées dans le jus d'oignon et la purée de tomate.

Pour rappel, seul 1 souche sur 20 a pu croître et diminuer le pH sur le jus d'oignon lactofermenté. Une supplémentation en extrait de levure a permis de restaurer une croissance. En purée de tomate, 18 souches sur 20 ont eu une bonne croissance. Cela pourrait venir de la différence de composition en acides aminés des deux matrices.

La purée de tomate contient plus d'aspartate libre, de glutamate libre et d'alanine libre que le jus d'oignon (figure 4). Malgré les données sur les acides aminés des matrices végétales lactofermentées, on ne peut pas savoir lesquels sont indispensables.

L'acidification et la croissance varient selon les espèces pour les deux matrices lactofermentées. Les souches acidifiant le plus vite les matrices lactofermentées (purée de tomate et jus d'oignon supplémenté) appartiennent à l'espèce *A. acidipropionici* et celles atteignant les plus fortes populations appartiennent à l'espèce *P. freudenreichii*. Sur la purée de tomate lactofermentée, ce sont les souches d'*A. acidipropionici* qui ont acidifié plus rapidement (ΔpH max à 48h). La plus forte acidification pour *A. acidipropionici* pourrait s'expliquer par sa consommation de lactate qui est plus faible que pour *P. freudenreichii* pour la production de propionate et d'acétate. En effet, la substitution d'un acide (le lactate) par un autre acide (le propionate) lors de la fermentation propionique engendre une faible acidification. Les résultats sur les rendements massiques montrent qu'*A. acidipropionici* a un meilleur $Y_{mp/l}$ en jus d'oignon qu'en purée de tomate. On peut alors s'interroger sur l'utilisation par cette espèce d'un autre substrat que le lactate en purée de tomate.

Les souches ayant les meilleurs résultats d'acidification en jus d'oignon supplémenté sont : CIRM-BIA1653, 1994, 1991, 2000 (*A. acidipropionici*) tandis qu'en purée de tomate ce sont : CIRM-BIA1662, 1429 (*A. jensenii*), 2000 (*A. acidipropionici*) à 96h de fermentation. Les souches ayant la meilleure croissance pour le jus d'oignon supplémenté en extrait de levure sont : CIRM-BIA 119, 120, 123 (*P. freudenreichii*) tandis qu'en purée de tomate ce sont : CIRM-BIA 7, 123, 511 (*P. freudenreichii*). La population de bactéries propioniques et l'acidification du jus d'oignon ne sont donc pas corrélées. Cela peut s'expliquer par le remplacement du lactate par le propionate et l'acétate, des acides organiques au pKa plus faible que le lactate. On peut alors se demander quel indicateur est le plus pertinent.

Les rendements massiques et les proportions en acides (P/A) ont également été étudié pour avoir une idée de l'activité métaboliques des souches testées. Les résultats sur les deux matrices végétales ont été regroupés par espèce.

P. freudenreichii

Les $Y_{mp/l}$ et $Y_{ma/l}$ des souches de *P. freudenreichii* utilisées pour fermenter le jus d'oignon (0,47 et 0,25) sont proches de ceux rapportés par Taniguchi et Tanaka : $Y_{mp/l}=0,6$ et $Y_{mac/l} = 0,3$ avec un milieu de culture contenant du lactate comme source de carbone (Taniguchi et Tanaka, 2004). Des résultats similaires sont obtenus en purée de tomate avec $Y_{mp/l}= 0,6$ et $Y_{ma/l} = 0,24$ (tableau 9). Les ratio P/A inférieurs à ceux rapportés dans la littérature (1,7 à 2,2 d'après Piveteau et de Vries et al.) pour les fermentations en jus d'oignon de cette espèce peuvent s'expliquer par les conditions microaérophiles. En effet, une étude a montré un ratio P/A de 1,56 lors de l'utilisation de YEL (source principale de carbone : lactate) en condition microaérophile (Dank et al., 2021). Ce phénomène n'a néanmoins pas été observé lors des fermentations en purée de tomate.

A. jensenii et A. thoenii

Les rendements et les ratios P/A des espèces *A. jensenii* et *A. thoenii* ne seront pas comparés à ceux de la littérature en raison du faible nombre d'études réalisées sur cette espèce dans un objectif de production de propionate.

A. acidipropionici

Les $Y_{mp/l}$ moyen en jus d'oignon et en purée de tomate d'*A. acidipropionici* sont respectivement : 0,65 et 0,4. Le rendement $Y_{ma/l}$ des souches d'*A. acidipropionici* en jus d'oignon varie de 0,14 à 0,19. Ces rendements sont cohérents à ceux de cette espèce dans la littérature (Lewis et Yang, 1992 ; Coral et al., 2008). Ce n'est pas le cas pour le rendement de cette espèce en purée de tomate, qui est bien supérieur à celui rapporté dans la littérature : $Y_{ma/l} = 0,5$ dans notre étude, contre $Y_{ma/l}= 0,16$ (Coral et al de 2008).

La matrice utilisée exercerait donc une influence sur la production en acétate pour l'espèce *A. acidipropionici*. Cet 'effet jus' est observable sur la production d'acétate (figure 11 B). Une autre voie métabolique que le cycle de Wood et Werkman serait utilisée suivant les matrices. Cela se confirme en comparant les ratio P/A des purées de tomates fermentées par cette espèce au ratio P/A de la littérature. En effet, le ratio P/A varie de 0,5 à 0,83 dans cette étude contre 2,1 à 3,1 quand les souches d'*A. acidipropionici* utilisent le lactate comme source de carbone (Lewis et Yang, 1992 ; Colombari et al., 1993). Chez *A. acidipropionici*, des variations du ratio P/A ont déjà été rapportés en fonction de la source d'azote utilisée (Lewis et Yang, 1992). Cela pourrait notamment s'expliquer par l'utilisation de l'aspartate pendant la fermentation du lactate. En effet, ce co-métabolisme provoque une diminution de la quantité de propionate produite ainsi que du ratio P/A (Thierry et al., 2011). Une analyse du génome annoté des souches permettrait de valider la présence des gènes codant pour l'internalisation de l'aspartate et la présence du gène de l'aspartase (aussi appelée aspartate ammonia-lyase), qui catalyse la désamination de l'aspartate (Turgay et al., 2022).

Après s'être assuré d'avoir une population bactérienne finale suffisante (proche de 10^8 - 10^9 cfu/ml) et d'un métabolisme actif, les matrices ont été fermenté avec les souches les plus performantes pour le test de l'activité antimicrobienne *in vitro*. Seule l'activité antimicrobienne des jus d'oignon successivement fermentés a pu être évaluée. Les jus d'oignon fermentés avec les souches CIRM-BIA1993, CIRM-BIA1994 et CIRM-BIA1998 (*A. acidipropionici*) sont ceux ayant présenté le plus large spectre d'activité antimicrobienne en étant introduit à 20% (m/m). Sur la représentation des individus de l'ACP concernant l'activité antibactérienne, on remarque que les jus fermentés avec ces mêmes trois souches ont le meilleur score antibactérien et le pH le plus faible. Le pH serait donc en partie responsable de l'activité antibactérienne. Pour différencier l'effet du pH et des acides, réévaluer l'activité antimicrobienne en neutralisant le pH serait nécessaire.

Ces même trois jus d'oignon fermentés avaient un ratio P/A proche de 3. Cependant, la fermentation avec la souche CIRM-BIA2007 (*A. acidipropionici*) présente une faible activité antibactérienne et ce malgré un ratio P/A proche de 3. La composition en acides ne serait donc pas la seule explication à l'activité antibactérienne des fermentations avec les souches CIRM-BIA1993, CIRM-BIA1994 et CIRM-BIA1998. Plus globalement, l'ACP ne suggère pas de corrélation entre les concentrations en acides dosés et l'effet antibactérien. L'activité antibactérienne des jus d'oignon fermentés ne serait peut-être pas dû à un des acides dosés mais pourrait être lié à un autre composé. Les bactériocines ou d'autres acides pourraient être en cause. Une synergie des composés antimicrobiens produits par la fermentation et des molécules antimicrobiennes déjà présentes dans l'oignon n'est pas à exclure.

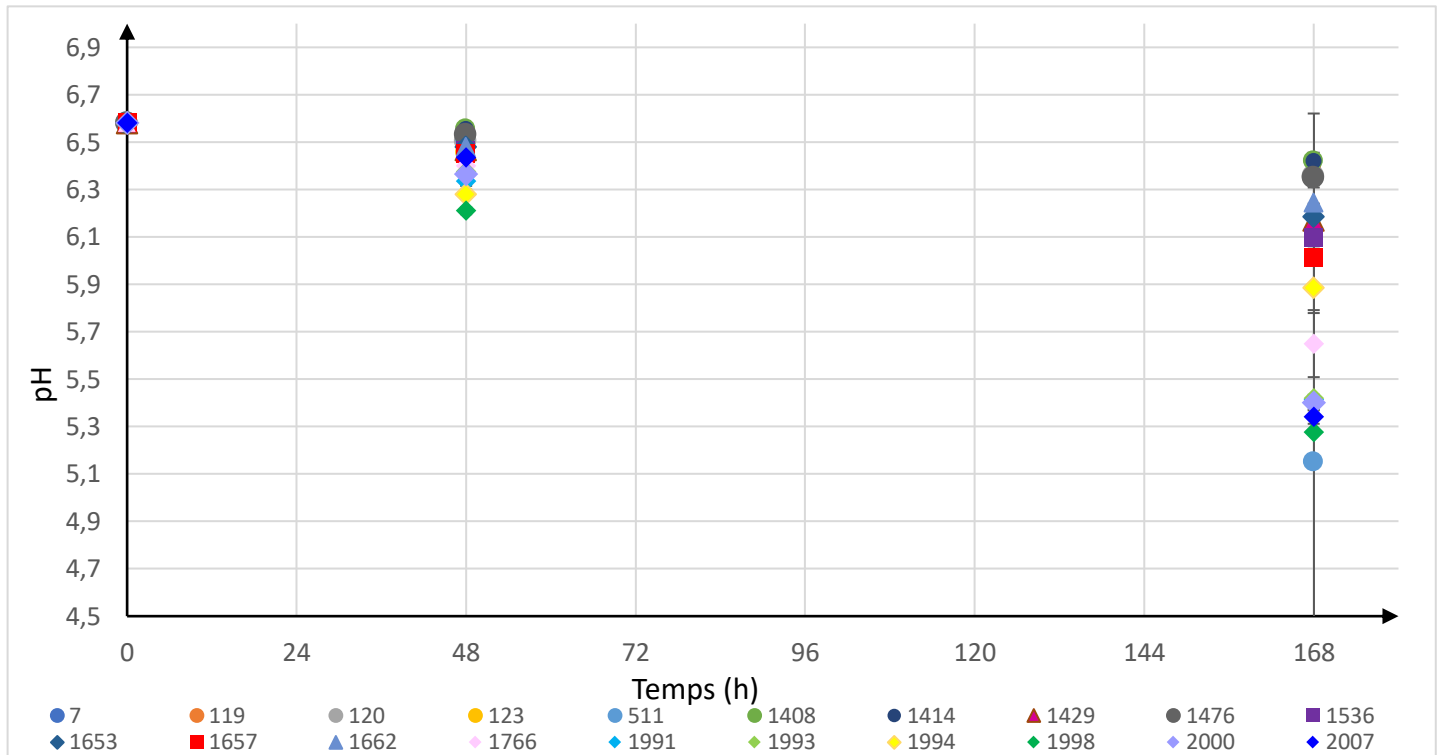
Ces résultats sont encourageants pour l'un des premiers travaux sur les doubles fermentations (lactique, propionique) de matrices végétales. Il est possible de produire des antimicrobiens à partir de matrices fermentées successivement. Néanmoins, le métabolisme des souches est dépendant de l'espèce et de la matrice mise en œuvre. Beaucoup de pistes de réflexion et d'expériences complémentaires sont à envisager mais les données sont parcellaires. Elles ne permettent pas de conclure sur l'influence de l'espèce des bactéries propioniques dans la production d'antimicrobien ou de comprendre les raisons d'une meilleure croissance ou de meilleurs rendements. Pour cela réaliser plus de répétitions sont nécessaires pour faire des ANOVA et confirmer l'effet de l'espèce sur le métabolisme des souches.

Doser plus de molécules candidates pouvant contribuer à l'activité antimicrobienne permettrait une étude plus fine des composés impliqués dans l'activité antimicrobienne. Pour valider ou invalider l'effet de l'acide sur l'inhibition, on pourrait ajouter les acides principaux (lactate, acétate, propionate) dans les matrices végétales un à un et faire des mélanges d'acides. Neutraliser les acides des produits des fermentations successives est aussi à envisager. Une réévaluation de l'activité antimicrobienne pourrait alors être réalisée.

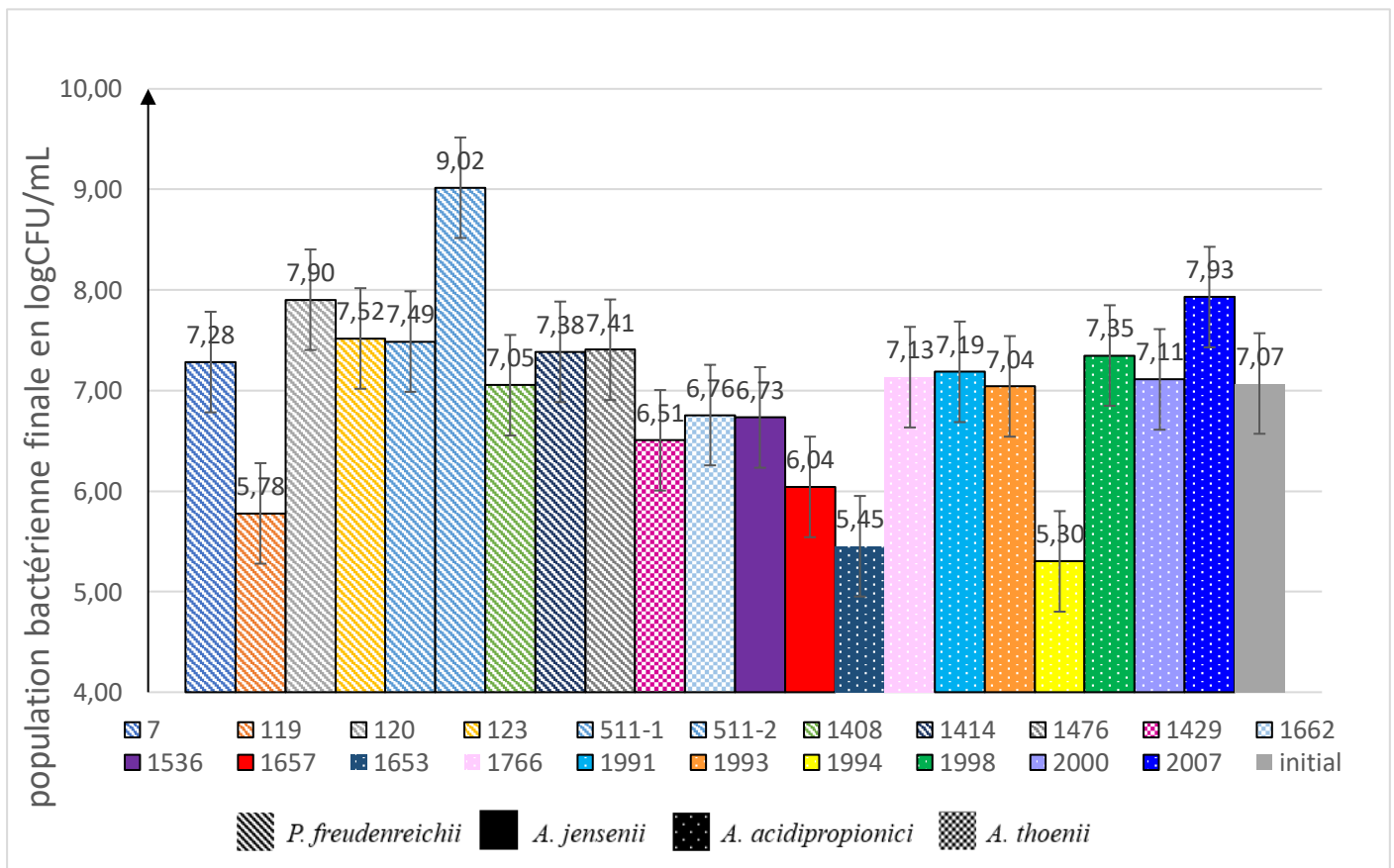
Une chute d'activité antimicrobienne indiquerait que le composé non introduit serait un élément clé, alors qu'une absence de variation de l'activité indiquerait que ce composé ne contribuerait pas à l'activité. En réalisant des fermentations dans des fermenteurs, avec des conditions de régulation contrôlées (pH, oxygène...), on pourrait augmenter leur répétabilité. D'après les résultats récents obtenus au laboratoire STLO sur lait, les bactéries propioniques produisent des quantités contrastées d'acide en fonction des souches et du niveau d'aérobiose (H. Falentin, communication personnelle). Une publication récente (Dank et al., 2022) suggère, une re-consommation des acides produits après épuisement du milieu en lactate. Pour maximiser la production de propionate, le lactate ne doit donc pas être limitant. Pour mieux connaître le métabolisme du lactate par les espèces de bactéries propioniques où il n'est ni élucidé ni détaillé (cas de *thoenii* et *jensenii*), on pourrait utiliser du lactate avec un carbone marqué et analyser les produits de fermentation en résonance magnétique nucléaire pour identifier les métabolites marqués. L'étude du génome associé aux molécules antimicrobiennes produites par une souche de bactérie propionique serait également un moyen d'associer les métabolismes clés avec la production d'antimicrobien. Pour connaître s'il existe un effet cumulatif des étapes (fermentation lactiques et propioniques) mises en œuvre, faire des dosages associés à des tests d'activité antimicrobienne sur les matrices puis les produits de la fermentation lactique et enfin sur les produits de la fermentation propionique est essentiel. Faire un dosage des acides aminés en fin de fermentation permettrait de suivre l'utilisation des acides aminés et d'évaluer l'effet de l'aspartate sur le métabolisme des bactéries propioniques en corrélant son utilisation avec la composition en acides des produits de fermentations finaux.

En conclusion ce travail préliminaire montre que la double fermentation lactique - propionique appliquée à des jus végétaux permet d'obtenir des fermentats présentant des activités antimicrobiennes intéressantes. Il reste maintenant à identifier plus finement les composés impliqués dans l'activité anti microbienne et à valider l'activité antimicrobienne dans des produits alimentaire.

Annexe 1

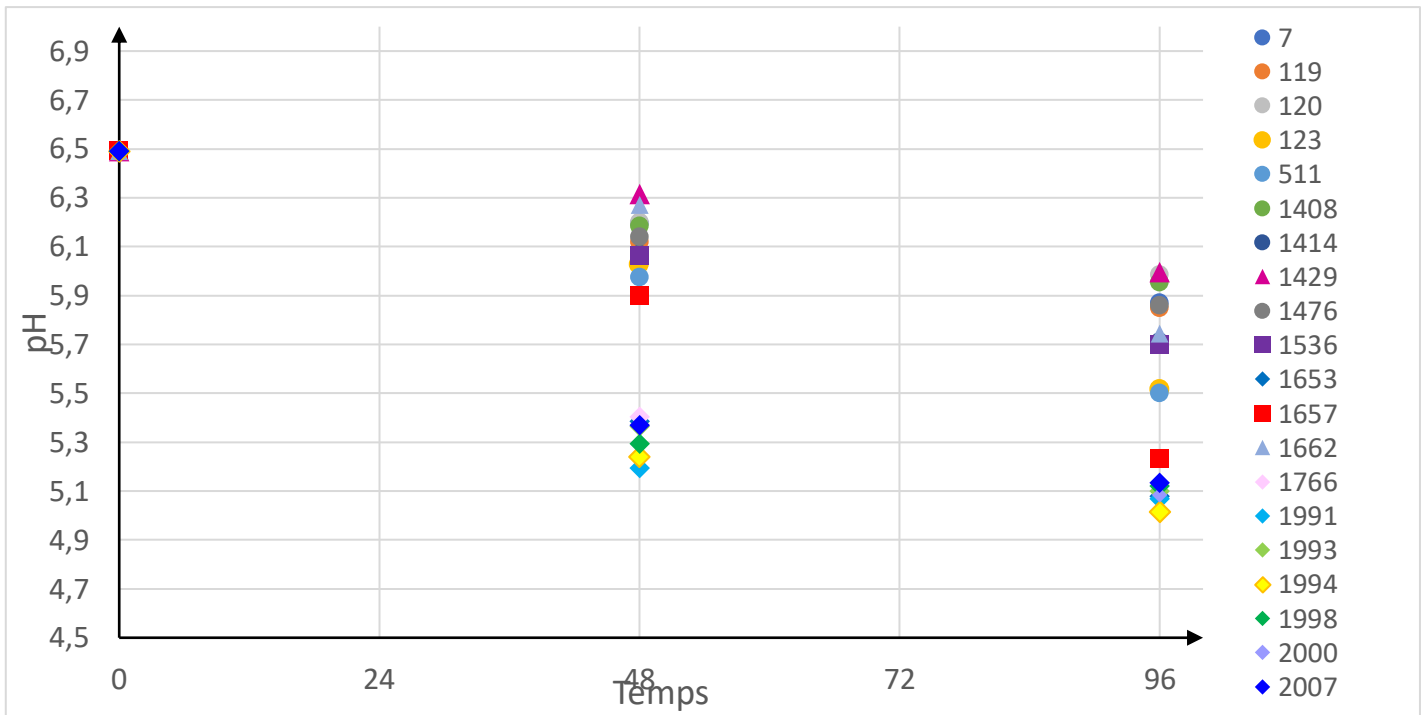


Evolution pendant 168h du pH du jus d'oignon lactofermenté inoculé avec les différentes souches appartenant aux espèces *P. freudenreichii* (●); *A. thoenii* (▲); *A. jensenii* (■); *A. acidipropionici* (◆)

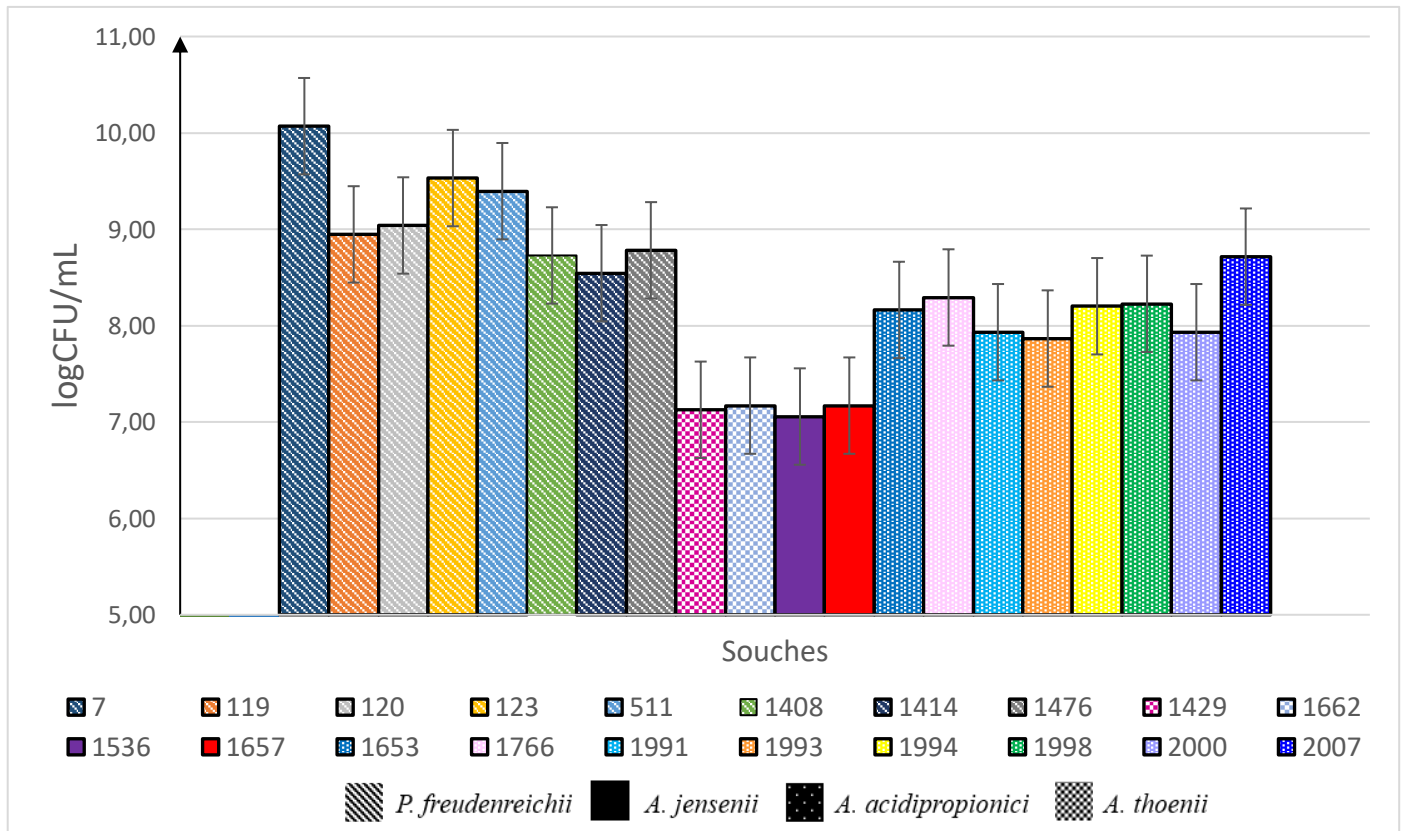


Population finale des différentes souches sélectionnées dans le jus d'oignon lactofermenté à t=168h

Annexe 2



Evolution pendant 96h du pH du jus d'oignon lactofermenté et supplémenté inoculé avec les différentes souches appartenant aux espèces *P. freudenreichii* (●); *A. thoenii* (▲); *A. jensenii* (■); *A. acidipropionici* (◆)



Population finale des différentes souches dans le jus d'oignon lactofermenté et supplémenté à t=96h

Population finale des différentes souches sélectionnées dans le jus d'oignon lactofermenté à t=168h

Annexe 3

N°	Letter	Growth time	<i>E. coli</i>			<i>S. aureus</i>			<i>Brochothrix thermosphacta</i>			<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>			Growth time	<i>C. zeylanoides</i>			<i>Z. bailii</i>			<i>E. rubrum</i>			<i>P. chrysogenum</i>																										
			10	15	20	10	15	20	10	15	20	10	15	20		10	15	20	10	15	20	10	15	20	10	15	20																								
T+		24	[Red]																								48	[Red]																							
T+		48	[Red]																								72	[Red]																							
123	A	24	[Red]																								48	[Red]																							
123	A	48	[Red]																								72	[Red]																							
123	B	24	[Red]																								48	[Red]																							
123	B	48	[Red]																								72	[Red]																							
511	A	24	[Red]																								48	[Red]																							
511	A	48	[Red]																								72	[Red]																							
511	B	24	[Red]																								48	[Red]																							
511	B	48	[Red]																								72	[Red]																							
1653	A	24	[Red]																								48	[Red]																							
1653	A	48	[Red]																								72	[Red]																							
1653	B	24	[Red]																								48	[Red]																							
1653	B	48	[Red]																								72	[Red]																							
1657	A	24	[Red]																								48	[Red]																							
1657	A	48	[Red]																								72	[Red]																							
1657	B	24	[Red]																								48	[Red]																							
1657	B	48	[Red]																								72	[Red]																							
1766-L	A	24	[Red]																								48	[Red]																							
1766-L	A	48	[Red]																								72	[Red]																							
1766-L	B	24	[Red]																								48	[Red]																							
1766-L	B	48	[Red]																								72	[Red]																							
1991-L	A	24	[Red]																								48	[Red]																							
1991-L	A	48	[Red]																								72	[Red]																							
1991-L	B	24	[Red]																								48	[Red]																							
1991-L	B	48	[Red]																								72	[Red]																							
1993-L	A	24	[Red]																								48	[Red]																							
1993-L	A	48	[Red]																								72	[Red]																							
1993-L	B	24	[Red]																								48	[Red]																							
1993-L	B	48	[Red]																								72	[Red]																							
1994-L	A	24	[Red]																								48	[Red]																							
1994-L	A	48	[Red]																								72	[Red]																							
1994-L	B	24	[Red]																								48	[Red]																							
1994-L	B	48	[Red]																								72	[Red]																							
1998-L	A	24	[Red]																								48	[Red]																							
1998-L	A	48	[Red]																								72	[Red]																							
1998-L	B	24	[Red]																								48	[Red]																							
1998-L	B	48	[Red]																								72	[Red]																							
2000-L	A	24	[Red]																								48	[Red]																							
2000-L	A	48	[Red]																								72	[Red]																							
2000-L	B	24	[Red]																								48	[Red]																							
2000-L	B	48	[Red]																								72	[Red]																							
2007-L	A	24	[Red]																								48	[Red]																							
2007-L	A	48	[Red]																								72	[Red]																							
2007-L	B	24	[Red]																								48	[Red]																							
2007-L	B	48	[Red]																								72	[Red]																							
T-O	A	24	[Red]																								48	[Red]																							
T-O	A	48	[Red]																								72	[Red]																							
T-O	B	24	[Red]																								48	[Red]																							
T-O	B	48	[Red]																								72	[Red]																							
T-L	A	24	[Red]																								48	[Red]																							
T-L	A	48	[Red]																								72	[Red]																							
T-L	B	24	[Red]																								48	[Red]																							
T-L	B	48	[Red]																								72	[Red]																							

Résultats de l'activité antimicrobienne des fermentations de jus d'oignon avec les souches de bactéries propioniques sélectionnées (en vert : inhibition des cibles, en rouge : croissance des cibles et en noir : non déterminé)

Bibliographie

- Aburjaile, Flavia Figueira, Marine Rohmer, Hugues Parrinello, Marie-Bernadette Maillard, Eric Beaucher, Gwénaële Henry, Aurélie Nicolas, et al. 2016. « Adaptation of *Propionibacterium Freudenreichii* to Long-Term Survival under Gradual Nutritional Shortage ». *BMC Genomics* 17 (1): 1007. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3367-x>.
- Ammar, Ehab M., Jessica Martin, Luiza Brabo-Catala, et George P. Philippidis. 2020. « Propionic Acid Production by *Propionibacterium Freudenreichii* Using Sweet Sorghum Bagasse Hydrolysate ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 104 (22): 9619-29. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10953-w>.
- Baron, Florence, Marie-Françoise Cochet, Wilfried Ablain, Noël Grosset, Marie-Noël Madec, Fabienne Gonnet, Sophie Jan, et Michel Gautier. 2006. « Rapid and cost-effective method for micro-organism enumeration based on miniaturization of the conventional plate-counting technique ». *Lait* 86 (3): 251-57. <https://doi.org/10.1051/lait:2006005>.
- Beena Divya, Jayakumar, Kontham Kulangara Varsha, Kesavan Madhavan Nampoothiri, Bindhumol Ismail, et Ashok Pandey. 2012. « Probiotic fermented foods for health benefits ». *Engineering in Life Sciences* 12 (4): 377-90. <https://doi.org/10.1002/elsc.201100179>.
- Björkroth, Johanna, et Joanna Koort. 2016. « Lactic Acid Bacteria: Taxonomy and Biodiversity ». In *Reference Module in Food Science*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00864-7>.
- Bondi, Moreno, Patrizia Messi, Prakash M. Halami, Chrissanthy Papadopoulou, et Simona de Niederhausern. 2014. « Emerging Microbial Concerns in Food Safety and New Control Measures ». *BioMed Research International* 2014: 1-3. <https://doi.org/10.1155/2014/251512>.
- Bourdichon, François, Serge Casaregola, Choreh Farrokh, Jens C. Frisvad, Monica L. Gerds, Walter P. Hammes, James Harnett, et al. 2012. « Food Fermentations: Microorganisms with Technological Beneficial Use ». *International Journal of Food Microbiology* 154 (3): 87-97. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.030>.
- Bücher, Carola, Johanna Burtscher, et Konrad J. Domig. 2021. « Propionic Acid Bacteria in the Food Industry: An Update on Essential Traits and Detection Methods ». *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 20 (5): 4299-4323. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12804>.
- Colomban, Agnès, Loïc Roger, et Patrick Boyaval. 1993. « Production of Propionic Acid from Whey Permeate by Sequential Fermentation, Ultrafiltration, and Cell Recycling ». *Biotechnology and Bioengineering* 42 (9): 1091-98. <https://doi.org/10.1002/bit.260420911>.
- Coral, Jefferson, Susan Grace Karp, Luciana Porto de Souza Vandenberghe, José Luis Parada, Ashok Pandey, et Carlos Ricardo Soccol. 2008. « Batch Fermentation Model of Propionic Acid Production by *Propionibacterium Acidipropionici* in Different Carbon Sources ». *Applied Biochemistry and Biotechnology* 151 (2-3): 333-41. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8196-1>.
- Corsetti, A., M. Gobetti, J. Rossi, et P. Damiani. 1998. « Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1 ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 50 (2): 253-56. <https://doi.org/10.1007/s002530051285>.
- Crow, Vaughan L. 1986. « Metabolism of Aspartate by *Propionibacterium Freudenreichii* Subsp. *Shermanii*: Effect on Lactate Fermentation ». *Applied and Environmental Microbiology* 52 (2): 359-65. <https://doi.org/10.1128/aem.52.2.359-365.1986>.
- Dank, Alexander, Oscar Mastrigt, Sjeff Boeren, Søren K. Lillevang, Tjakko Abee, et Eddy J. Smid. 2021. « *Propionibacterium Freudenreichii* Thrives in Microaerobic Conditions by Complete Oxidation of Lactate to CO₂ ». *Environmental Microbiology* 23 (6): 3116-29. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15532>.
- De Vries, Wytse, Willemina M. C. Van Wyck-Kapteyn, et A. H. Stouthamer. 1973. « Generation of ATP during Cytochrome-linked Anaerobic Electron Transport in Propionic Acid Bacteria ». *Microbiology*, Microbiology Society 76 (1): 31-41

Dellaglio, F., De Roissart, H., Torriani, S., Curk, M.C., et Janssens, D. 1994. « Caractéristiques générales des bactéries lactiques ». *Lorica Bactéries Lactiques* (Tome I) (25-70).

Dibner, J.J., et P. Buttin. 2002. « Use of Organic Acids as a Model to Study the Impact of Gut Microflora on Nutrition and Metabolism1 ». *Journal of Applied Poultry Research* 11 (4): 453-63. <https://doi.org/10.1093/japr/11.4.453>.

Dortu, C., et Philippe Thonart. 2009. « Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires ». *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 13: 143-54.

EFSA Panel on Biological Hazards (Nom), Kostas Koutsoumanis, Ana Allende, Avelino Alvarez-Ordóñez, Declan Bolton, Sara Bover-Cid, Marianne Chemaly, Robert Davies, Alessandra De Cesare, et Friederike Hilbert. 2020. « Scientific Opinion on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA (2017–2019) ». *EFSA Journal* 18 (2): e05966.

Eiteman, Mark A., et Subramanian Ramalingam. 2015. « Microbial production of lactic acid ». *Biotechnology Letters* 37 (5): 955-72. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1769-5>.

El-Safei, Kawther, Mona A. M. Abd El- Gawad, Nadia Dabiza, Osama Sharaf, et Baher Effat. 2008. « A Mixed culture of Propionibacterium Thoenii P-127, Lactobacillus Rhamnosus and Lactobacillus Plantarum as protective cultures in Kareish cheese. ». *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 58 (avril): 433-441.

Falentin, Hélène, Stéphanie-Marie Deutsch, Gwenaél Jan, Valentin Loux, Anne Thierry, Sandrine Parayre, Marie-Bernadette Maillard, et al. 2010. « The Complete Genome of Propionibacterium Freudenreichii CIRM-BIA1T, a Hardy Actinobacterium with Food and Probiotic Applications ». Édité par Niyaz Ahmed. *PLoS ONE* 5 (7): e11748. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011748>.

Faye, Therese, Anders Brede Dag, Thor Langsrud, F Nes Ingolf, et Helge Holo. 2004. « Prevalence of the Genes Encoding Propionicin T1 and Protease-Activated Antimicrobial Peptide and Their Expression in Classical Propionibacteria ». *Applied and Environmental Microbiology* 70 (4): 2240-44. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.2240-2244.2004>.

Faye, Therese, Helge Holo, Thor Langsrud, Ingolf F. Nes, et Dag A. Brede. 2011. « The Unconventional Antimicrobial Peptides of the Classical Propionibacteria ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 89 (3): 549-54. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2967-7>.

Fröhlich-Wyder, Marie-Therese, Hans-Peter Bachmann, et Michael Gerard Casey. 2002. « Interaction between Propionibacteria and Starter / Non-Starter Lactic Acid Bacteria in Swiss-Type Cheeses ». *Le Lait* 82 (1): 1-15. <https://doi.org/10.1051/lait:2001001>.

Gálvez, Antonio, Rosario Lucas López, Hikmate Abriouel, Eva Valdivia, et Nabil Ben Omar. 2008. « Application of Bacteriocins in the Control of Foodborne Pathogenic and Spoilage Bacteria ». *Critical Reviews in Biotechnology* 28 (2): 125-52. <https://doi.org/10.1080/07388550802107202>.

Gu, Zhong, Bonita A. Glatz, et Charles E. Glatz. 1998. « Effects of Propionic Acid on Propionibacteria Fermentation ». *Enzyme and Microbial Technology* 22 (1): 13-18. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(97\)00094-X](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(97)00094-X).

Guan, Ningzi, Long Liu, Hyun-dong Shin, Rachel R. Chen, Juan Zhang, Jianghua Li, Guocheng Du, Zhongping Shi, et Jian Chen. 2013. « Systems-level understanding of how Propionibacterium acidipropionici respond to propionic acid stress at the microenvironment levels: Mechanism and application ». *Journal of Biotechnology* 167 (1): 56-63. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.06.008>.

Hedayati, Rouhollah, Morteza Hosseini, et Ghasem D. Najafpour. 2020. « Optimization of semi-anaerobic vitamin B12 (cyanocobalamin) production from rice bran oil using Propionibacterium freudenreichii PTCC1674 ». *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 23 (janvier): 101444. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101444>.

Himmi, E. H., A. Bories, A. Boussaid, et L. Hassani. 2000. « Propionic Acid Fermentation of Glycerol and Glucose by Propionibacterium Acidipropionici and Propionibacterium Freudenreichii Ssp. Shermanii ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 53 (4): 435-40. <https://doi.org/10.1007/s002530051638>.

Holo, Helge, Therese Faye, Dag Anders Brede, Trine Nilsen, Inger Ødegård, Thor Langsrud, Johanne Brendehaug, et Ingolf F. Nes. 2002. « Bacteriocins of Propionic Acid Bacteria ». *Le Lait* 82 (1): 59-68. <https://doi.org/10.1051/lait:2001005>.

Honoré, Anders H., Stina D. Aunsbjerg, Parvaneh Ebrahimi, Michael Thorsen, Connie Benfeldt, Susanne Knøchel, et Thomas Skov. 2016. « Metabolic footprinting for investigation of antifungal properties of *Lactobacillus paracasei* ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408 (1): 83-96. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9103-6>.

Hugenschmidt, Selina, Susanne Miescher Schwenninger, et Christophe Lacroix. 2011. « Concurrent high production of natural folate and vitamin B12 using a co-culture process with *Lactobacillus plantarum* SM39 and *Propionibacterium freudenreichii* DF13 ». *Process Biochemistry* 46 (5): 1063-70. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.021>.

Jan, Gwénaél, Annette Rouault, et Jean-Louis Maubois. 2000. « Acid stress susceptibility and acid adaptation of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* ». *Le Lait* 80 (3): 325-36.

Javanainen, P., et Y.-Y. Linko. 1993. « Mixed-culture Pre-ferments of Lactic and Propionic Acid Bacteria for Improved Wheat Bread Shelf-life ». *Journal of Cereal Science* 18 (1): 75-88. <https://doi.org/10.1006/jcrs.1993.1036>.

Jay, J M. 1982. « Antimicrobial properties of diacetyl ». *Applied and Environmental Microbiology* 44 (3): 525-32. <https://doi.org/10.1128/aem.44.3.525-532.1982>.

Jiménez-Díaz, R., R. M. Rios-Sánchez, M. Desmazeaud, J. L. Ruiz-Barba, et J.-C. Piard. 1993. « Plantaricins S and T, Two New Bacteriocins Produced by *Lactobacillus Plantarum* LPCO10 Isolated from a Green Olive Fermentation ». *Applied and Environmental Microbiology* 59 (5): 1416-24. <https://doi.org/10.1128/aem.59.5.1416-1424.1993>.

Klare, Ingo, Corala Konstabel, Sibylle Müller-Bertling, Rolf Reissbrodt, Geert Huys, Marc Vancanneyt, Jean Swings, Herman Goossens, et Wolfgang Witte. 2005. « Evaluation of New Broth Media for Microdilution Antibiotic Susceptibility Testing of *Lactobacilli*, *Pediococci*, *Lactococci*, and *Bifidobacteria* ». *Applied and Environmental Microbiology* 71 (12): 8982-86. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8982-8986.2005>.

Kumariya, Rashmi, Anita Kumari Garsa, Y. S. Rajput, S. K. Sood, Nadeem Akhtar, et Seema Patel. 2019. « Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria ». *Microbial Pathogenesis* 128: 171-77. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.002>.

Lavermicocca Paola, Valerio Francesca, Evidente Antonio, Lazzaroni Silvia, Corsetti Aldo, et Gobbetti Marco. 2000. « Purification and Characterization of Novel Antifungal Compounds from the Sourdough *Lactobacillus plantarum* Strain 21B ». *Applied and Environmental Microbiology* 66 (9): 4084-90. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.9.4084-4090.2000>.

Le Lay, Céline, Emmanuel Coton, Gwenaëlle Le Blay, Jean-Marc Chobert, Thomas Haertlé, Yvan Choiset, Nicolas Nguyen Van Long, Laurence Meslet-Cladière, et Jérôme Mounier. 2016. « Identification and Quantification of Antifungal Compounds Produced by Lactic Acid Bacteria and *Propionibacteria* ». *International Journal of Food Microbiology* 239 (décembre): 79-85. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.020>.

Le Lay, Céline, Jérôme Mounier, Valérie Vasseur, Amélie Weill, Gwenaëlle Le Blay, Georges Barbier, et Emmanuel Coton. 2016. « In Vitro and in Situ Screening of Lactic Acid Bacteria and *Propionibacteria* Antifungal Activities against Bakery Product Spoilage Molds ». *Food Control* 60 (février): 247-55. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.07.034>.

Lee, S. Y., E. R. Vedamuthu, C. J. Washam, et G. W. Reinbold. 1970. « Diacetyl production by *Propionibacterium shermanii* in milk cultures ». *Canadian Journal of Microbiology* 16 (12): 1231-42. <https://doi.org/10.1139/m70-207>.

Lewis, Vivian P., et Shang-Tian Yang. 1992. « Propionic Acid Fermentation by *Propionibacterium Acidipropionici*: Effect of Growth Substrate ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 37 (4). <https://doi.org/10.1007/BF00180964>.

Leyva Salas, Marcia, Jérôme Mounier, Florence Valence, Monika Coton, Anne Thierry, et Emmanuel Coton. 2017. « Antifungal Microbial Agents for Food Biopreservation—A Review ». *Microorganisms* 5 (3): 37. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030037>.

Leyva Salas, Marcia, (2018). Cultures antifongiques applicables comme ferments de bioprotection dans les produits laitiers : sélection, évaluation à l'échelle pilote et identification de composés supports de l'activité [Thèse de doctorat, Université de Bretagne occidentale - Brest, 2018]. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02080859/document>

Li, Xiang, Wenjuan Zhang, Li Ma, Sizhou Lai, Shu Zhao, Yinguang Chen, et Yanan Liu. 2016. « Improved production of propionic acid driven by hydrolyzed liquid containing high concentration of l-lactic acid from co-fermentation of food waste and sludge ». *Bioresource Technology* 220 (novembre): 523-29. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.066>.

Liu, Long, Yunfeng Zhu, Jianghua Li, Miao Wang, Pengsoon Lee, Guocheng Du, et Jian Chen. 2012. « Microbial Production of Propionic Acid from Propionibacteria: Current State, Challenges and Perspectives ». *Critical Reviews in Biotechnology* 32 (4): 374-81. <https://doi.org/10.3109/07388551.2011.651428>.

Mintel. 2019. « France: 1,000 Internet Users Aged 16+, New Zealand: 1,000 Internet Users Aged 18+, Vietnam: 1,000 Internet Users Aged 18+ ». Lightspeed/Mintel, New Zealand: Dynata/Mintel, Vietnam: Rakuten Insight/Mintel. 2019. https://data.mintel.com/databook/global-consumer-july-2020-food-drink-july-2020/?Q8_pin=group-1&Q7_pin=group-1&Q11_pin=group-1&country=30&country=50&country=56#Q6.

Mozzi, Fernanda, et Graciela M. Vignolo. 2010. *Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications*. John Wiley & Sons.

O'Sullivan, L., E.B. O'Connor, R.P. Ross, et C. Hill. 2006. « Evaluation of live-culture-producing lactacin 3147 as a treatment for the control of *Listeria monocytogenes* on the surface of smear-ripened cheese ». *Journal of Applied Microbiology* 100 (1): 135-43. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02747.x>.

Parizzi, Lucas P, Maria Carolina B Grassi, Luige A Llerena, Marcelo F Carazzolle, Verônica L Queiroz, Inês Lunardi, Ane F Zeidler, et al. 2012. « The Genome Sequence of *Propionibacterium Acidipropionici* Provides Insights into Its Biotechnological and Industrial Potential ». *BMC Genomics* 13 (1): 562. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-562>.

Patrick, Sheila, et Andrew McDowell. 2015. « *Propionibacterium* ». In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-29. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00167>.

Paul, Jai, K.L. Tiwari, et S.K. Jadhav. 2015. « Long Term Preservation of Commercial Important Fungi in Glycerol at 4°C ». *International Journal of Biological Chemistry* 9 (février): 79-85. <https://doi.org/10.3923/ijbc.2015.79.85>.

Petruzzi, Leonardo, Maria Rosaria Corbo, Milena Sinigaglia, et Antonio Bevilacqua. 2017. « Chapter 1 - Microbial Spoilage of Foods: Fundamentals ». In *The Microbiological Quality of Food Foodborne Spoilers*, édité par Maria Rosaria Corbo, Milena Sinigaglia, et Antonio Bevilacqua, 1-21. Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100502-6.00002-9>.

Piveteau, Pascal. 1999. « Metabolism of Lactate and Sugars by Dairy Propionibacteria: A Review ». *Le Lait* 79 (1): 23-41. <https://doi.org/10.1051/lait:199912>.

Piwozarek, Kamil, Edyta Lipińska, Elżbieta Hać-Szymańczuk, Marek Kieliszek, et Iwona Ścibisz. 2018. « *Propionibacterium* Spp.—Source of Propionic Acid, Vitamin B12, and Other Metabolites Important for the Industry ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 102 (2): 515-38. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8616-7>.

Quesada-Chanto, A., A. G. Schroeder, A. C. Schmid-Meyer, J. A. López, M. M. Silveira, et R. Jonas. 1997. « Organic Acid Production by *Propionibacterium Shermanii*: Effect of PH, Temperature and Vitamin-Nitrogen Source ». *Zeitschrift Für Naturforschung C* 52 (3-4): 193-96. <https://doi.org/10.1515/znc-1997-3-410>.

Richoux, R., et J. R. Kerjean. 1995. « Caractérisation technologique de souches pures de bactéries propioniques : test en minifabrication de fromages à pâte cuite ». *Le Lait* 75 (1): 45-59. <https://doi.org/10.1051/lait:199514>.

Riordan, James F. 1979. « Arginyl residues and anion binding sites in proteins ». *Molecular and Cellular Biochemistry* 26 (2): 71-92. <https://doi.org/10.1007/BF00232886>.

Sagar, Narashans Alok, et Sunil Pareek. 2020. « Antimicrobial Assessment of Polyphenolic Extracts from Onion (*Allium Cepa* L.) Skin of Fifteen Cultivars by Sonication-Assisted Extraction Method ». *Heliyon* 6 (11): e05478. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05478>.

- Salminen, Seppo, et Atte Von Wright. 2004. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. CRC Press.
- Schwenninger, Susanne Miescher, et Leo Meile. 2004. « A Mixed Culture of *Propionibacterium Jensenii* and *Lactobacillus Paracasei* Subsp. *Paracasei* Inhibits Food Spoilage Yeasts ». *Systematic and Applied Microbiology* 27 (2): 229-37. <https://doi.org/10.1078/072320204322881853>.
- Settanni, Luca, et Aldo Corsetti. 2008. « Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation ». *International Journal of Food Microbiology* 121 (2): 123-38. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.09.001>.
- Silva, Maria, et Fernando Lidon. 2016. « Food Preservatives - An Overview on Applications and Side Effects ». *Emirates Journal of Food and Agriculture* 28 (6): 366. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2016-04-351>.
- Smid, Eddy J, et Christophe Lacroix. 2013. « Microbe–Microbe Interactions in Mixed Culture Food Fermentations ». *Current Opinion in Biotechnology* 24 (2): 148-54. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.11.007>.
- Stackebrandt, Erko, Cecil S. Cummins, et John L. Johnson. 2006. « Family Propionibacteriaceae: The Genus *Propionibacterium* ». In *The Prokaryotes: Volume 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*, édité par Martin Dworkin, Stanley Falkow, Eugene Rosenberg, Karl-Heinz Schleifer, et Erko Stackebrandt, 400-418. New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/0-387-30743-5_19.
- Sun, Zhihong, Jie Yu, Tong Dan, Wenyi Zhang, et Heping Zhang. 2014. « Phylogenesis and Evolution of Lactic Acid Bacteria ». In *Lactic Acid Bacteria: Fundamentals and Practice*, édité par Heping Zhang et Yimin Cai, 1-101. Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-8841-0_1.
- Suomalainen t h and mäyrä-mäkinen a m (1999), ‘Propionic acid bacteria as protective cultures in fermented milks and breads’, *Lait* 79, 165–174.
- Talarico, T L, et W J Dobrogosz. 1989. « Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri* ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 33 (5): 674-79. <https://doi.org/10.1128/AAC.33.5.674>.
- Tamang, Jyoti Prakash, Buddhiman Tamang, Ulrich Schillinger, Claudia Guigas, et Wilhelm H. Holzapfel. 2009. « Functional properties of lactic acid bacteria isolated from ethnic fermented vegetables of the Himalayas ». *International Journal of Food Microbiology* 135 (1): 28-33. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.016>.
- Taniguchi, Masayuki, et Takaaki Tanaka. 2004. « Clarification of Interactions among Microorganisms and Development of Co-culture System for Production of Useful Substances ». In *Recent Progress of Biochemical and Biomedical Engineering in Japan*, 35-62. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/b94191>.
- Tarnaud, Florian, Floriane Gaucher, Fillipe Luiz Rosa do Carmo, Nassima Illikoud, Julien Jardin, Valérie Briard-Bion, Fanny Guyomarc’h, Valérie Gagnaire, et Gwénaél Jan. 2020. « Differential Adaptation of *Propionibacterium Freudenreichii* CIRM-BIA129 to Cow’s Milk Versus Soymilk Environments Modulates Its Stress Tolerance and Proteome ». *Frontiers in Microbiology* 11 (décembre): 549027. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.549027>.
- Thierry, Anne, Stéphanie-Marie Deutsch, Hélène Falentin, Marion Dalmasso, Fabien J. Cousin, et Gwénaél Jan. 2011. « New Insights into Physiology and Metabolism of *Propionibacterium Freudenreichii* ». *International Journal of Food Microbiology* 149 (1): 19-27. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.026>.
- Tinzl-Malang, Saskia Katharina, Peter Rast, Franck Grattepanche, Janice Sych, et Christophe Lacroix. 2015. « Exopolysaccharides from co-cultures of *Weissella confusa* 11GU-1 and *Propionibacterium freudenreichii* JS15 act synergistically on wheat dough and bread texture ». *International Journal of Food Microbiology* 214 (décembre): 91-101. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.025>.
- Turgay, Meral, Hans-Peter Bachmann, Stefan Irmeler, Ueli von Ah, Marie-Therese Fröhlich-Wyder, Hélène Falentin, Stéphanie-Marie Deutsch, Gwénaél Jan, et Anne Thierry. 2022. « Bacteria, Beneficial: *Propionibacterium* Spp. and *Acidipropionibacterium* Spp. » In *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 34-45. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.23016-3>.
- Turgay, Meral, Hélène Falentin, Stefan Irmeler, Marie-Therese Fröhlich-Wyder, Marco Meola, Simone Oberhaensli, et Hélène Berthoud-dit-Gallon Marchand. 2022. « Genomic rearrangements in the *aspA-dcuA* locus of

Propionibacterium freudenreichii are associated with aspartase activity ». *Food Microbiology* 106 (septembre): 104030. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104030>.

Wilson, A.R., D. Sigeo, et H.A.S. Epton. 2005. « Anti-bacterial activity of Lactobacillus plantarum strain SK1 against Listeria monocytogenes is due to lactic acid production ». *Journal of Applied Microbiology* 99 (6): 1516-22. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02725.x>.

Wood, Harland G. 1981. « Metabolic Cycles in the Fermentation by Propionic Acid Bacteria ». In *Current Topics in Cellular Regulation*, édité par Ronald W. Estabrook et Paul Srere, 18:255-87. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-152818-8.50021-9>.

Xie, Chong, Rossana Coda, Bhawani Chamlagain, Minnamari Edelmann, Pekka Varmanen, Vieno Piironen, et Kati Katina. 2021. « Fermentation of Cereal, Pseudo-Cereal and Legume Materials with Propionibacterium Freudenreichii and Levilactobacillus Brevis for Vitamin B12 Fortification ». *LWT* 137 (février): 110431. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110431>.

Yang, Eun-Ju, Sang-In Kim, Sang-Yun Park, Han-Yeol Bang, Ji Hye Jeong, Jai-Hyun So, In-Koo Rhee, et Kyung-Sik Song. 2012. « Fermentation Enhances the in Vitro Antioxidative Effect of Onion (Allium Cepa) via an Increase in Quercetin Content ». *Food and Chemical Toxicology* 50 (6): 2042-48. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.03.065>.

Yang, Hopen, Zhongqiang Wang, Meng Lin, et Shang-Tian Yang. 2018. « Propionic Acid Production from Soy Molasses by Propionibacterium Acidipropionici: Fermentation Kinetics and Economic Analysis ». *Bioresource Technology* 250 (février): 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.016>.

Ye, Chun-Lin, De-Hui Dai, et Wei-Lian Hu. 2013. « Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Essential Oil from Onion (Allium Cepa L.) ». *Food Control* 30 (1): 48-53. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.07.033>.

Yee, Alyson L., Marie-Bernadette Maillard, Nathalie Roland, Victoria Chuat, Aurélie Leclerc, Tomislav Pogačić, Florence Valence, et Anne Thierry. 2014. « Great Interspecies and Intraspecies Diversity of Dairy Propionibacteria in the Production of Cheese Aroma Compounds ». *International Journal of Food Microbiology* 191 (novembre): 60-68. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.001>.

Yu, Yue, Xuan Zhu, Yubiao Shen, Huanghong Yao, Peiheng Wang, Kun Ye, Xiaofeng Wang, et Qing Gu. 2015. « Enhancing the vitamin B12 production and growth of Propionibacterium freudenreichii in tofu wastewater via a light-induced vitamin B12 riboswitch ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 99 (24): 10481-88. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6958-6>.

Zaunmüller, T., M. Eichert, H. Richter, et G. Uden. 2006. « Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 72 (3): 421-29. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0514-3>.

Résumé

La demande des consommateurs pour les produits « clean label » est croissante. L'utilisation d'ingrédients fermentés comme alternative aux conservateurs classiques est une solution à envisager. Le but de l'étude est de produire des composés antimicrobiens par fermentation de matrices végétales lactofermentées avec des souches de bactéries propioniques d'intérêt alimentaire. Un criblage portant sur la croissance de 20 souches de bactéries propioniques a donc été réalisé dans deux matrices végétales lactofermentées : du jus d'oignon supplémenté en extrait de levure et de la purée de tomate. Les souches les plus performantes en terme de croissance (acidification et augmentation de la population bactérienne) ont ensuite été sélectionnées pour fermenter les matrices végétales dont l'activité antimicrobienne *in vitro* a été évaluée. 4 échantillons de jus d'oignon ainsi testés présentent une activité antibactérienne et antifongique dont 3 qui présentent un large spectre d'activité (jus d'oignon fermenté avec *A. acidipropionici* CIRM-BIA1993, 1994 et 1998). Cette activité, plutôt faible, a été partiellement attribuée aux concentrations en acides organiques. En conclusion, ces résultats sont prometteurs et attestent de l'intérêt de fermentations successives avec des bactéries lactiques et propioniques sur des matrices végétales pour la biopréservation.

Mot-clé : Propionibacterium, fermentation, alimentaire, biopréservation.

Summary

Consumers demand for "clean label" products is growing. The use of fermented ingredients as an alternative to classic preservatives should be explored. The purpose of the study is to produce antimicrobial compounds with food-grade strains of propionic bacteria that can grow on lactofermented vegetable matrices. A screening based on growths of 20 strains of propionic bacteria was carried out in two lactofermented vegetable matrices: onion juice supplemented with yeast extract and tomato puree. The best performing strains in terms of growth (acidification and increase of bacterial population) were then selected and the matrices fermented by these strains were evaluated for their *in vitro* antimicrobial activity. Four samples of fermented onion showed antibacterial and antifungal activity, three of which showed a broad spectrum of activity (onion juice fermented with *A. acidipropionici* CIRM-BIA1993, 1994 and 1998). This rather low activity was partly attributed to organic acid concentrations. In conclusion, these results are promising and attest the interest of successive fermentations with lactic and propionic bacteria on vegetable matrices for biopreservation.

Key words: propionibacteria, fermentate, food, biopreservation.