



HAL
open science

Identification des interactions positives entre bactéries lactiques en fermentation de jus de soja

Olivier Harle

► **To cite this version:**

Olivier Harle. Identification des interactions positives entre bactéries lactiques en fermentation de jus de soja. Alimentation et Nutrition. Institut Agro, Rennes, 2020. Français. NNT : . tel-03135726v1

HAL Id: tel-03135726

<https://hal.inrae.fr/tel-03135726v1>

Submitted on 9 Feb 2021 (v1), last revised 1 Dec 2021 (v2)

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

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



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

THESE DE DOCTORAT DE

INSTITUT AGRO | AGROCAMPUS OUEST

ECOLE DOCTORALE N° 600

Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation

Spécialité : « *Stat/Modélisation en écologie, géosciences, agronomie et alimentation* »

Par

Olivier HARLÉ

Identification des interactions positives entre bactéries lactiques en fermentation de jus de soja

Thèse présentée et soutenue à AGROCAMPUS OUEST, Rennes, le 17/12/2020

Unité de recherche : INRAE, UMR1253 Science & technologie du lait & de l'œuf

Thèse N° : 2020-32 - D-92

Rapporteurs avant soutenance :

Stéphane Chaillou Directeur de recherche, INRAE MICALIS, France
Françoise Rul Chargée de recherche, INRAE MICALIS, France

Composition du Jury :

Président : Michel Gautier Professeur, INSTITUT AGRO|AGROCAMPUS OUEST, France
Examineurs : Marion Dalmasso Maître de conférences, UNIVERSITÉ DE CAEN NORMANDIE, France
 Rémy Cachon Professeur, AGROSUP DIJON, France
Dir. de thèse : Hélène Falentin Ingénieure de recherche, INRAE STLO, France

Invité :

Co-encadrants : Stéphanie Deutsch Chargée de recherche, INRAE STLO, France
 Jérôme Niay Partenaire entreprise, TRIBALLAT NOYAL, France

Remerciements

Il n'y a pas que les bactéries qui bénéficient d'interactions positives ! Je tiens à remercier ici toutes les personnes avec qui j'ai interagi positivement pendant cette thèse.

Je tiens à remercier les membres du jury. Merci aux rapporteurs, Stéphane Chaillou et Françoise Rul, aux examinateurs, Marion Dalmasso et Rémy Cachon et au président du Jury, Michel Gautier. Vous avez accepté d'apporter votre expertise afin d'évaluer mon travail et je suis sûr que j'en bénéficierai.

J'ai eu la chance d'avoir de nombreux interlocuteurs pendant cette thèse. Je remercie mes deux directeurs de thèse qui se sont succédés, Éric puis Hélène et tous mes co-encadrants, Stéphanie, Céline, Jérôme, Anne et Florence. Vous avez tous des expertises riches et beaucoup de savoirs. Vous m'avez tous beaucoup appris durant cette thèse. Je vous remercie tous pour votre bonne humeur et pour le temps que vous avez dédié à ma formation et à mon projet de thèse.

Cette thèse est le fruit d'une collaboration entre deux entités : Triballat Noyal et le laboratoire INRAE STLO.

Merci à Triballat Noyal, je remercie Olivier Clanchin et Solenn Douard qui ont manifesté leur intérêt pour cette thèse. Je remercie Ronan et Laure qui en ont suivi l'avancement lors des réunions de pilotage. Je remercie toute l'équipe R&D Ultra Frais de Triballat Noyal, les anciens qui ont accepté de sentir, goûter et juger tous les jus de soja fermentés que je leur ai apportés, Anne, Thomas, Maud, Marie-Eve, Marie-Thérèse, Chloé. Merci à Kilian qui a travaillé sur le développement de la coculture « d'application » via les nombreux essais pilotes qu'il a dû mener. Merci aussi à Florian, Baptiste et Jean-François qui ont rejoint l'équipe cette année. Merci encore à Gwenaëlle et Nadine pour leurs expertises et à tous les autres salariés de Triballat Noyal avec qui j'ai pu travailler pendant ces trois années de thèse.

Merci à l'INRAE STLO. Je remercie Yves Le Loir pour son accueil et le soin qu'il prend à diriger l'UMR STLO. Merci à l'ensemble du STLO pour votre accueil, votre sympathie, et tous ces goûters, pauses et échanges que j'ai pu avoir avec vous. Merci à Jessica, Sébastien et Michel pour votre soutien logistique, à Laurence, Danielle, Nathalie et Céline pour votre aide administrative et l'organisation des STLOpen Days. Merci à Anne pour ton accueil et la bibliographie que tu partages. Merci à Rachel pour tes ateliers doctorants. Merci à Marie-Hélène, Valérie, Julien pour l'accueil dans vos bureaux à la fin de la première crise Covid. Merci à Sylvie et Aurélie pour les news informatiques et les collaborations. Merci à Gwénaële et Marie-Bernadette pour leurs aides et leurs expertises des analyses biochimiques, merci à la plateforme lait et à Gaëlle pour m'avoir aidé à traiter du jus de soja. Merci à toute l'équipe

du CIRM-BIA, particulièrement Victoria et Marie-Noëlle pour leurs disponibilités, leurs expertises et leur accompagnement dans l'utilisation du robot de criblage, des tests PCR, des observations au microscope et merci à Anne-Sophie pour sa bonne humeur. Merci aussi à toute l'équipe Microbio pour le partage de leur expertise, je pense à Lucie, Sergine, Gwenaël, Valérie, Nadejda, Emeline et Sandrine. Merci aux autres membres du STLO que j'ai croisé régulièrement au cours de ces trois années, à l'équipe ISF-PL, Saïd, Thomas, Pascaline, Florence, Valérie et Stéphane pour l'animation Sci&Tech STLO, à l'équipe BN, Didier, Olivia, Jordane, Juliane et Steven, à l'équipe SMCF Cécile, Éric, Romain, Luca, à l'équipe PSM, Geneviève, Fabienne, Nadine et Maksym.

Merci à tous les doctorants et post-doctorants, Houem, Floriane, Natayme, Elma, Alexia, Fanny, François, Manon H., Manon G., Amira, Maëllis, Linda, Fillipe, Nassima, Carlos, Vinicius, Alberto, Julien, Louis, Antoine, Dimitri, Brenda, Lucas, Élise, Ousmane, Wenfan, Mahesh, Marine, Stefano, Guilherme, Ming et Léa.

Merci encore à Monique Zagorec, Véronique Broussolle et Marion Dalmasso qui ont constitué mon comité de suivi individuel. Les échanges ont été riches et vos conseils précieux.

Enfin, cette thèse est pour moi la conclusion de mes études. Je tiens donc aussi à remercier toutes les personnes qui y ont contribué. Je remercie particulièrement ma famille, HARLÉ et NOSSEK, mes amis Rennais, Strasbourgeois, Parisiens etc. mes professeurs, formateurs, maîtres de stages et toutes les autres personnes qui ont contribué à la réussite de mon parcours.

Avant-propos

Ce travail de thèse a été conduit dans le cadre d'une convention CIFRE (Convention industrielle de formation par la recherche). Cette thèse constitue un rapprochement de deux entités : l'équipe de microbiologie du laboratoire INRAE UMR Science et technologie du lait et de l'œuf (STLO) et l'équipe de recherche et développement du service Ultra Frais de Triballat Noyal (TN).

L'équipe de microbiologie de l'UMR STLO, associée au Centre International de Ressources Microbiennes dédié aux Bactéries d'Intérêt Alimentaire (CIRM-BIA, <https://www6.inrae.fr/cirm/Bacteries-d-Interet-Alimentaire>), étudie la biodiversité des bactéries d'intérêt alimentaire et les fonctionnalités qui y sont associées. L'ambition du STLO est de comprendre le fonctionnement de bactéries fermentaires se développant en communauté dans des matrices alimentaires, laitières ou végétales et ce, dans la perspective de délivrer des connaissances pour piloter et fonctionnaliser ces communautés.

La société Triballat-Noyal (TN) est une entreprise familiale basée à Noyal-sur-Vilaine en Bretagne depuis 1951. L'entreprise allie tradition et innovation pour développer ses marchés positionnés dans les domaines de l'alimentation biologique, des fromages, de la nutrition et du végétal. TN propose une offre de divers produits végétaux via deux marques : Sojade, dédiée aux réseaux de distribution biologique et Sojasun, dédiée aux réseaux de distribution conventionnelle. L'entreprise commercialise en France et en Europe ses produits frais, fermentés ou non (desserts) à base de soja, de chanvre, de riz ou d'avoine.

Dans la perspective de toujours améliorer la qualité de ses produits, TN souhaite compléter sa gamme de spécialités fermentées au soja nature. Dans cette optique, TN recherche à mettre en œuvre un nouveau jus de soja et à développer un nouveau ferment, adapté à cette nouvelle matière première. Avec ce nouveau jus associé au nouveau ferment, TN souhaite améliorer les qualités nutritionnelles et organoleptiques de ses spécialités fermentées au soja nature.

Le rapprochement des deux entités STLO et TN répond à une ambition conjointe de développer la compréhension des associations de bactéries lactiques lors de la fermentation de matrices végétales. La vocation de ce travail de recherche est :

- d'étudier les capacités des bactéries lactiques à fermenter une matrice végétale (un jus de soja),
- de développer une stratégie d'association de bactéries lactiques,
- et enfin, d'étudier les bases moléculaires des interactions positives entre deux souches de bactéries lactiques en fermentation d'un jus de soja.

Ce travail a permis par ailleurs de mettre au point une coculture de bactéries lactiques (coculture dite « d'application ») qui est en cours d'industrialisation par TN.

Table des matières

Remerciements	3
Avant-propos	5
Liste des abréviations	9
Liste des tableaux	9
Liste des figures	11
Introduction générale Contexte de la thèse	13
CHAPITRE 1. Étude bibliographique	15
I. Le soja	16
A. Description botanique	16
B. Composition, structure et propriétés physico-chimiques de la graine de soja	17
C. Les protéines du soja	17
D. Les composés carbonés du soja	18
E. Les lipides du soja	19
F. Les nutriments mineurs du soja	19
G. Utilisation du soja	20
II. Le jus de soja	20
A. Procédé de fabrication du jus de soja	21
B. Composition du jus de soja	22
C. Les caractéristiques organoleptiques du jus de soja	23
D. Les caractéristiques nutritionnelles	24
III. La fermentation lactique	25
A. Définition de la fermentation lactique	25
B. Origines de la fermentation lactique	26
C. Les bactéries lactiques (BL)	26
D. Le métabolisme des bactéries lactiques	27
1 Le métabolisme carboné	27
2 Le métabolisme azoté	33
3 La régulation des métabolismes carboné et azoté	39
4 Le potentiel d'oxydo-réduction	41
E. Adaptation et diversité des BL en fermentation	45
F. Intérêt des levains multi-souches	45
G. Les interactions bactéries-bactéries	46
1 L'amensalisme et l'antagonisme	47
2 Le commensalisme, le mutualisme	47
3 Le parasitisme	49
H. La sélection des BL	49
IV. La fermentation lactique du jus de soja	50
A. Diversité des études sur la fermentation lactique du jus de soja	50
B. Caractéristiques de fermentation des BL en jus de soja	52
1 L'acidification	52
2 Les caractéristiques de croissance des BL en jus de soja	52
3 Le catabolisme des sucres du jus de soja	54
4 Le système protéolytique des BL en jus de soja	58
5 Les études du métabolisme des BL en fermentation de jus de soja	59

C.	Bénéfices de la fermentation lactique de jus de soja.	61
1	Propriétés organoleptiques	61
2	Propriétés nutritionnelles.....	61
D.	Intérêt des levains multi-souches en fermentation de jus de soja.	62
V.	Conclusion	63
CHAPITRE 2.	Résultats et avancées de la thèse	64
I.	Objectifs et stratégie	65
A.	Question de recherche	65
B.	Stratégie.....	67
II.	Les profils métaboliques des BL en fermentation de jus de soja	69
A.	Introduction	69
1	La sélection du jus de soja étudié	70
2	Sélection des souches de BL étudiées	73
B.	Diversité des profils métaboliques des BL en fermentation de jus de soja : résumé de l'article	74
C.	Messages clés :.....	75
D.	Diversity of the metabolic profiles of a broad range of lactic acid bacteria in soy juice fermentation	76
E.	Conclusion	105
III.	Effets de l'association de bactéries lactiques sur les caractéristiques de la fermentation de jus de soja.....	106
A.	Introduction	106
B.	Matériels et méthodes	107
1	Stratégies d'associations et de criblage de la coculture « d'application »	107
2	Stratégies d'association et de criblage de la coculture « d'études »	109
C.	Résultats	110
1	Résultats d'essais d'associations de la coculture « d'application »	110
2	Résultats d'essais d'associations de cocultures « d'études »	113
D.	Discussion.....	114
IV.	Complémentarité métabolique entre <i>L. plantarum</i> CIRMBIA777 et <i>L. delbrueckii</i> CIRMBIA865 en fermentation de jus de soja.....	116
A.	Introduction	116
1	Contexte de l'étude.....	116
B.	Résumé de l'étude des métabolismes de <i>Ld865</i> et <i>Lp777</i> en fermentation de jus de soja.....	116
C.	Étude des complémentarités métaboliques de <i>Ld865</i> et <i>Lp777</i> en fermentation de jus de soja.	118
D.	Conclusion	138
V.	Bases moléculaires des interactions positives entre <i>L. plantarum</i> CIRM-BIA777 et <i>L. delbrueckii</i> CIRM-BIA865 en fermentation de jus de soja.....	139
A.	Introduction	139
B.	Conclusion	174
C.	Comparaison des composés volatils produits en mono- et coculture.....	175
1	Introduction.....	175
2	Matériel et méthodes	175
3	Résultats.....	175
4	Discussion	178
Chapitre 3.	Discussion générale, conclusions et perspectives.....	179
I.	Caractéristiques des BL en fermentation de jus de soja.....	180

II.	Associations de BL et interactions en fermentation de jus de soja	182
III.	Le stress des BL en fermentation de jus de soja	184
IV.	Perspectives.....	185
A.	L'amélioration de la fermentation lactique du jus de soja.....	185
B.	Comprendre les interactions entre BL en fermentation de jus de soja.	186
ANNEXES	188
A.	Caractéristiques des BL	188
B.	Diversité des jus de soja.....	193
C.	Grille d'analyse sensorielle	195
D.	196
E.	Métabolisme de <i>Lp777</i> et <i>Ld865</i> : galeries API® 50 CH.....	197
Bibliographie	198
Valorisation de la thèse	215
I.	Publication acceptée dans une revue internationale à comité de lecture.....	215
II.	Publications à soumettre dans des revues internationales	215
III.	Communications orales	215
IV.	Communication affichée	215

Liste des abréviations

AA :	Acide aminé
ADN ou DNA :	Acide DésoxyriboNucléique
ARN ou RNA :	Acide RiboNucléique
BL ou LAB :	Bactéries Lactiques
CIRM-BIA :	Centre International de Ressources Microbiennes – Bactéries d'intérêts Alimentaire
CO ₂ :	Dioxyde de carbone
CPG ou GC :	Chromatographie en phase gazeuse
EFSA :	European Food Safety Authority
Eh :	Potentiel d'oxydoréduction
FDA :	Food and Drug Administration
FSJ :	Fermented Soy Juice Jus de Soja Fermenté
GRAS :	Generally Recognized As Safe
HPLC :	Chromatographie Liquide à Haute Performance
O ₂ :	Dioxygène
ORP :	Potentiel d'oxydoréduction
INRAE :	Institut National de Recherche pour l'Agriculture et l'Environnement
IUPAC :	Union internationale de chimie pure et appliquée
MFA :	Analyse Factorielle Multiple
MS :	Spectrométrie de Masse
PCR :	Polymerase Chain Reaction
qPCR :	PCR quantitative
PDCAAS :	Score chimique corrigé de la digestibilité
QPS :	Qualified Presumption of Safety
SJ :	Jus de Soja
STLO :	Sciences et Technologies du Lait et de l'Œuf
TN :	Triballat Noyal
UFC ou CFU :	Unité Formant Colonie
UMR :	Unité Mixte de Recherche

Liste des tableaux

Tableau 1. Composition moyenne de jus de soja et de lait de vache.....	23
Tableau 2 : Caractéristiques des fermentations lactiques de jus de soja répertoriées dans la bibliographie.....	51
Tableau 3. Capacités d'acidification moyennes par espèce de BL en jus de soja.....	53
Tableau 4. Populations maximales moyennes atteintes par espèce de BL en jus de soja.	54
Tableau 5 Données de la bibliographie sur le catabolisme des sucres du jus de soja par espèce de BL.	58

Tableau 6. Caractéristiques des jus de soja HS et BS fournis par Triballat Noyal.....	71
Table 7. pH values, oligosaccharides, organic acids and isoflavone concentrations in soy juices after 10h of fermentation by 46 strains, means of duplicates inoculated at 1% v/v.....	82
Table 8. Volatile compounds identified in soy juices after 10h of fermentation with 46 lactic acid bacteria strains. (“FooDB,” ; “The Good Scents Company” 2019)	90
Tableau 9. Sélection des 15 souches retenues pour la réalisation de la coculture d'application.	108
Tableau 10. Sélection des 10 souches intéressantes pour la réalisation du consortium « d'études ».....	110
Tableau 11. Nombre d'associations parmi les 32 essais avec des notes ou un pH soit supérieures, égales, intermédiaires ou inférieures en coculture par rapport aux monocultures en fonction des différentes caractéristiques.....	111
Table 12. Oligosaccharides and organic acids concentrations in unfermented soy juice and in SJ fermentations at different pHs.	125
Table 13. Amino acids and nitrogenous compounds concentrations (in mg/L) in soy juice fermented with <i>Ld865</i> or <i>Lp777</i>	126
Table 14. Differential expression of <i>Ld865</i> and <i>Lp777</i> genes implicated in the metabolisms of carbohydrates, amino acids, cofactors and vitamins during fermentation of soy juice.....	128
Table 15. Oligosaccharides and organic acids concentrations in unfermented soy juice and in fermented soy juices at different pHs.	149
Table 16. Amino acids and nitrogenous compounds concentrations (in mg/L) in soy juice fermentations of <i>Ld865</i> and <i>Lp777</i> in monoculture and coculture.....	151
Table 17. Selection of genes differentially expressed with an adjusted pvalue < 0.05 in cocultured compared to monocultured FSJ at pH 6.5, 6.0 and 5.0 that are discussed in the study.	155
Tableau 18. Composés volatils identifiés dans les jus de soja non fermentés et fermentés par <i>L. plantarum</i> CIRM-BIA777 et <i>L. delbrueckii</i> CIRM-BIA865 en mono- et cocultures à 37°C.	176
Tableau 19. Comparaison des concentrations relatives en composés volatils identifiés en jus de soja non fermenté et fermentés par <i>L. plantarum</i> CIRM-BIA777 et <i>L. delbrueckii</i> CIRM-BIA865 en mono- et cocultures à 37°C.	177

Liste des figures

Figure 1. Plante de soja, <i>Glycine maxima</i> 1 en fleurs et 2 en fruits. 3 Graine de soja (Protea, 2020).	17
Figure 2. Structure des oligosaccharides du soja (Sanada et al., 2009).	19
Figure 3. Procédé classique de fabrication du jus de soja (Harlé, 2020).	21
Figure 4. Variantes du procédé classique de fabrication du jus de soja (Harlé, 2020).	22
Figure 5. Résumé des métabolismes carbonés des bactéries lactiques.	29
Figure 6. Métabolisme du citrate des bactéries hétérofermentaires.	32
Figure 7. Le système protéolytique des BL et sa régulation.	36
Figure 8. Schéma de régulation et des méthodes d'analyses associées utilisées dans cette thèse pour l'étude des métabolismes d'une bactérie en monoculture dans le cadre d'un procédé de fermentation.	40
Figure 9. Mécanisme de réduction d'une molécule oxydante par (a) l'action de la thioredoxine et sa régénération par la thioredoxine réductase en présence de NADPH et (b) par l'action de la glutaredoxine réduite par 2 glutathions régénérées par la glutathion réductase. (repris de Ezraty et al., 2017)	44
Figure 10. Types d'interactions écologiques entre deux espèces en cocultures.	47
Figure 11. Représentation des interactions entre <i>S. thermophilus</i> et <i>L. delbrueckii</i> dans la fermentation du yaourt et les effets sur les caractéristiques du produit.	48
Figure 12. Les trois voies du catabolisme du saccharose des BL.	55
Figure 13. Schéma général de l'organisation du manuscrit de thèse.	66
Figure 14 Schéma de la stratégie de la thèse pour répondre aux questions : Quels sont les profils métaboliques des BL en fermentation de jus de soja ? Quelles sont les bases moléculaires des interactions positives entre BL en fermentation lactique de jus de soja? ...	69
Figure 15. Cinétiques de fermentation du jus de soja BS par 6 souches de BL.	72
Figure 16. Cinétique de fermentation du jus de soja BS, modifié ou non, par la souche de <i>L. plantarum</i> I2641. La fermentation a été réalisée à 37°C	73
Figure 17. Number of strains tested by species during the different steps of the present study.	79
Figure 18 : Acidification capacities of 276 strains of lactic acid bacteria, from 25 different species in a synthetic medium containing sucrose (M-suc), raffinose (M-raf), stachyose (M-sta) as the carbon source or in soy juice (SJ).	86
Figure 19. Multiple Factor Analysis (MFA) of oligosaccharides, acid concentrations and pH values in soy juices fermented for 10h by 46 strains of lactic acid bacteria.	88
Figure 20. Hierarchical clustering with a heatmap representation based on Ward's minimum variance method and a Euclidean distance metric of the relative concentrations of	

volatile compounds from 46 fermented soy juices obtained with strains of lactic acid bacteria, clustered in four groups, A, B, C and D. Green crosses notify a significantly higher concentration of volatile compounds in fermented soy juice ($p < 0.1$)	91
Figure 21. Notes moyennes et erreurs types données par le jury lors des analyses sensorielles des essais d'associations des souches.....	113
Figure 22 Cinétiques d'acidification du jus de soja par différentes cocultures composées de deux souches de BL et par les monocultures correspondantes.	114
Figure 23. Stratégie d'analyse des caractéristiques biochimiques et des séquences ARN transcrites pendant la fermentation de jus de soja.....	117
Figure 24. Fermentation of soy juice performed at 37°C by monoculture of <i>Lp777</i> or <i>Ld865</i>	124
Figure 25. Differential expression of <i>Ld865</i> and <i>Lp777</i> genes implicated in soy sugars degradation along soy juice fermentation in monoculture.	134
Figure 26. Fermentation of soy juice at 37°C by <i>Lp777</i> and <i>Ld865</i> in mono- and coculture.....	147
Figure 27. Sucrose consumption (A), lactic (B), acetic (C) and succinic acids (D) production of <i>Lp777</i> and <i>Ld865</i> in mono- and coculture through soy juice fermentation at 37°C.	150
Figure 28. Distribution of <i>Lp777</i> genes (red) and <i>Ld865</i> genes (yellow) up and downregulated in coculture compared to monoculture in soy juice fermentation.....	153
Figure 29. Fermentation of soy juice supplemented with methionine or cystine by <i>Lp777</i> or <i>Ld865</i> in monoculture.....	167
Figure 30. Phase contrast optical microscope observations (magnification x100) and representations of molecular bases of <i>Lp777-Ld865</i> positive interactions in soy juice coculture.	172

Introduction générale

Contexte de la thèse

Dans les pays occidentaux, les protéines de notre régime alimentaire sont constituées à 60% de protéines d'origines animales (principalement des produits de la mer, carnés, laitiers et ovoproduits) contre 40% de protéines d'origines végétales (céréales, légumineuses et autres fruits et légumes, "FAOSTAT" 2018). Un régime plus équilibré avec des apports en protéines à 50% d'origine animale et 50% d'origine végétale contribuerait à limiter les effets de notre alimentation sur l'environnement, tout en constituant une alimentation plus saine (Colombet et al., 2019; Guéguen et al., 2016; Springmann et al., 2018; WHO et al., 2007). Il semble donc nécessaire d'augmenter la part des protéines végétales dans notre alimentation.

Les légumineuses représentent une source de protéines végétales intéressantes. Les légumineuses ont cependant été mises de côté en raison de leurs défauts organoleptiques, de certains composés antinutritionnels ou des inconforts digestifs qu'elles peuvent apporter (Davin and Berot, 1996; Guillon and Champ, 2002). Des croyances et des comportements alimentaires amplifient également la diminution de la part des légumineuses de régimes alimentaires (de Gavelle et al., 2019)

Les légumineuses doivent donc être préférentiellement transformées avant d'être consommées, par fermentation par exemple. La fermentation de légumineuses par des bactéries lactiques représente un procédé de transformation durable et peu coûteux, capable de réduire ces défauts organoleptiques, nutritionnels et digestifs. Dans ce contexte, les desserts frais végétaux ou « yaourts végétaux » représentent une alternative intéressante aux produits laitiers de type yaourt (d'origine animale). Ces produits répondent à une demande pour une alimentation plus responsable et peuvent aussi répondre aux besoins des populations végétaliennes ou intolérantes au lactose. Le marché global des desserts « frais » végétaux ou « yaourts végétaux » est en croissance. Ce marché s'estimerait à 2,89 milliards de dollars en 2026 contre 0,87 milliards de dollars en 2017 et 0,56 milliards de dollars en 2015 (Hexasearch, 2019; LLP, 2020) malgré la persistance de défauts nutritionnels et organoleptiques.

Certaines légumineuses, comme le soja, sont fermentées depuis des siècles. Cependant, la fermentation lactique des légumineuses a été peu étudiée en comparaison de celle des produits laitiers. Des publications récentes présentent par ailleurs l'intérêt d'utiliser des cocultures (mélange de plusieurs espèces et/ou souches) plutôt que des monocultures afin d'améliorer les caractéristiques de produits végétaux fermentés et afin de répondre à des

contraintes industrielles, i.e. la durée de fermentation (Champagne et al., 2010; El Youssef et al., 2020; Garro et al., 2004; Lizardo et al., 2020; Wu et al., 2012; Yoon and Hwang, 2008). Le développement de levains mixtes, constitués de plusieurs souches d'une même espèce ou d'espèces différentes, est cependant complexe. Les résultats de fermentations végétales qui mettent en œuvre des souches en cocultures sont encore difficilement prévisibles du fait de notre faible compréhension des interactions microbiennes dans une matrice végétale (Tangyu et al., 2019). L'objectif de cette thèse est alors d'étudier le métabolisme de bactéries lactiques en mono- et coculture, lors de la fermentation d'une matrice végétale, un jus de soja biologique, afin d'en améliorer les qualités organoleptiques et nutritionnelles.

CHAPITRE 1. Étude bibliographique

Dans cette étude bibliographique, les caractéristiques du soja seront d'abord présentées (partie I). Les procédés de fabrication du jus de soja et ses caractéristiques seront ensuite développés (partie II). La fermentation lactique sera alors abordée, d'abord à travers le métabolisme des bactéries lactiques puis via les interactions bactériennes qui peuvent exister lors d'une fermentation (partie III). La dernière partie reprendra l'ensemble des connaissances actuelles, spécifiquement sur la fermentation du jus de soja (partie IV). Le Chapitre 2 débutera par la présentation des objectifs et de la stratégie de recherche, puis se poursuivra par la présentation des résultats et avancées de la thèse. Enfin, le Chapitre 3 discutera de manière générale ce travail de thèse et proposera des perspectives.

I. Le soja

Parmi les sources de protéines d'origine végétales, le soja (*Glycine maxima*) est une des plantes les plus intéressantes pour ses caractéristiques nutritionnelles, fonctionnelles et culturelles. Cette plante légumineuse originaire de la Mandchourie, au nord-est de la Chine, est cultivée depuis plus de 3000 ans. Elle a d'abord été cultivée comme engrais vert pour enrichir les sols (Doré and Varoquaux, 2006). Son extension en Asie s'accompagne d'une diversification de son usage, qui s'étend à diverses préparations alimentaires (miso, sauce soja, tempeh, tofu...). Rapportée en Europe au XVIIe siècle, son expansion s'est étendue à partir du XIXe siècle en Amérique du Nord et du Sud comme plante fourragère pour les animaux d'élevage (Roumet, 2001). Aujourd'hui, ce sont plus de 300 millions de tonnes de graines de soja qui sont produites chaque année dans le monde ("Statistics | SOPA," 2020). La graine de soja est la partie de la plante qui est exploitée, car il s'agit de la partie la plus intéressante sur les plans nutritionnel et fonctionnel (détaillés après la description botanique). En France, plus de 3 millions de tonnes de soja sont importés chaque année à destination de l'alimentation animale (Terres Univia, 2016). 260 000 tonnes de graines de soja ont par ailleurs été récoltées en France en 2015 et 400 000 tonnes en 2018. 20% de cette production française sont destinés à l'alimentation humaine : 25 000 tonnes pour les boissons, 1200 tonnes pour les produits traiteurs et 19 500 tonnes pour les desserts « frais » (France Agrimer, Terres Univia, IRI).

A. Description botanique

Le soja ou *Glycine maxima* est une plante herbacée annuelle, de la famille des Fabacées. L'appareil végétatif du soja comporte un port d'une hauteur de 30 à 150 cm et des feuilles alternes à trois folioles acuminées avec stipelles. Les fleurs isolées mesurent environ 2 mm et sont hermaphrodites et autogames. La fécondation est cléistogame (autofécondation avant même que la fleur ne s'ouvre). À maturité, le soja produit des gousses contenant 1 à 5 graines. Ces graines mesurent moins d'1 cm de diamètre. Ces graines sont composées de cotylédons (90% m/m), d'une enveloppe (7% m/m) et d'un germe (3% m/m, Figure 1. Plante de soja, *Glycine maxima* 1 en fleurs et 2 en fruits. 3 Graine de soja (Protea, 2020)Figure 1).

Les légumineuses telles que le soja utilisent l'azote minéral du sol mais fixent également l'azote de l'air grâce à une symbiose avec des bactéries du sol (*Rhizobium*). Grâce à cette symbiose, la culture de soja nécessite peu d'engrais et améliore la composition azotée du sol, ce qui bénéficiera aux cultures suivantes (Doré and Varoquaux, 2006). Cela constitue un critère de choix pour le développement de sa culture.

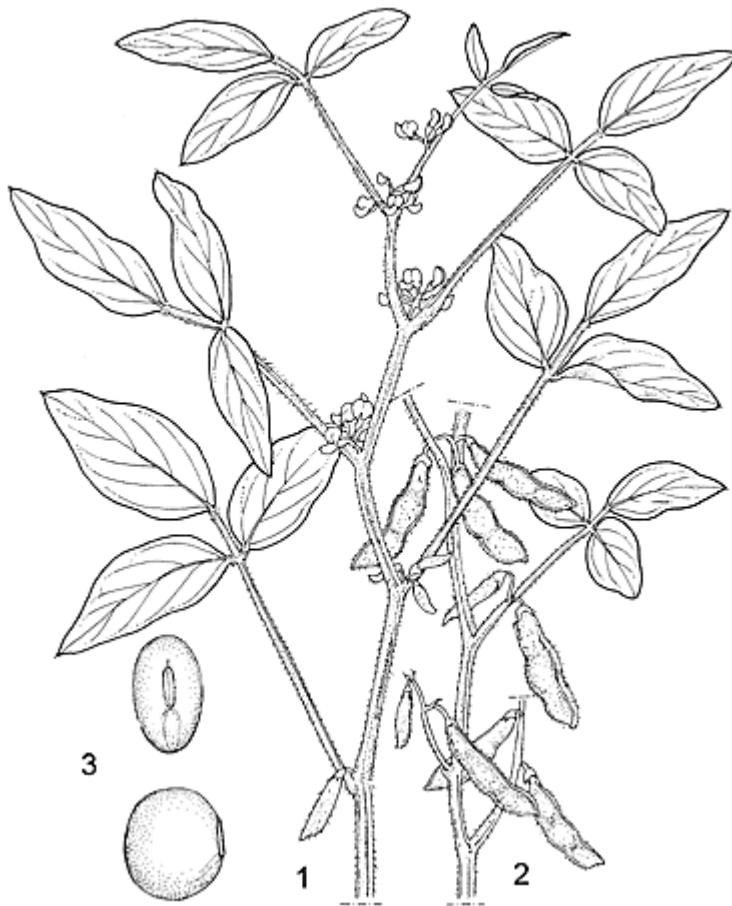


Figure 1. Plante de soja, *Glycine max* 1 en fleurs et 2 en fruits. 3 Graine de soja (Protea, 2020).

B. Composition, structure et propriétés physico-chimiques de la graine de soja

Les graines de soja sont composées de $37 \pm 4\%$ de protéines, de $21 \pm 1\%$ de glucides ($7 \pm 1\%$ de sucres totaux, moins d'1% d'amidon), $21 \pm 1\%$ de lipides et de $17 \pm 1\%$ de fibres (résultats en % de matière sèche). La graine de soja contient des acides gras insaturés, est dépourvue de cholestérol, est source de vitamines B9 et B1 et contient aussi de la vitamine C, du fer, du zinc, du calcium et des isoflavones (CIQUAL, 2017; USDA, 2019). La richesse protéique de la graine de soja en fait un produit de choix pour l'alimentation. Par mesure de simplification, la graine de soja est désignée par le terme "soja" dans la suite de ce document.

C. Les protéines du soja

Parmi les légumineuses, le soja possède les graines avec la plus haute teneur en protéines. De plus, la totalité des protéines de soja sont solubles dans l'eau ce qui en fait un critère de choix pour la fabrication de jus riches en protéines. Parmi ces protéines, le soja est

constitué de 10% d'albumines et de 90% de globulines (Guéguen and Lemarié, 1996). La fraction albumine est hétérogène. Elle est constituée d'enzymes qui ont un rôle physiologique dans la graine. La fraction globuline est plus homogène. Elle consiste en une réserve de carbone et d'azote divisé en plusieurs classes selon leur coefficient de sédimentation (11S et 7S). Par ailleurs, les globulines sont composées de polypeptides acides (α) et basique (β). Les polypeptides α sont plus sensibles aux modifications chimiques et enzymatiques car plus hydrophiles que les polypeptides β plus hydrophobes. La structure des protéines du soja dépend ainsi du pH et de la force ionique. À un pH supérieur à 7, plus de 80% des protéines du soja sont solubles dans l'eau. À un pH inférieur à 5, moins de 20% des protéines de soja sont solubles dans l'eau. L'ajout de sels et les traitements thermiques modifient également la solubilité des protéines de soja (Guéguen and Lemarié, 1996).

Les protéines de la graine de soja ont une valeur nutritionnelle intéressante, puisqu'elles couvrent et remplissent les besoins en acides aminés essentiels de l'homme (lysine, histidine, isoleucine, leucine, phénylalanine, tyrosine, thréonine, tryptophane et valine). Seules la méthionine et la cystéine sont limitantes (Lecerf and Fressin, 1995). On peut remarquer par ailleurs que la teneur en lysine est particulièrement élevée. Le soja constitue donc un bon complément aux protéines des céréales, déficitaires en lysine.

D. Les composés carbonés du soja

Le soja contient $21 \pm 1\%$ de glucides dont $7 \pm 1\%$ de sucres totaux.

Les sucres qui composent les sucres totaux du soja sont le saccharose (appelé aussi sucrose), le raffinose et le stachyose (Figure 2). Le saccharose est le sucre majoritaire. Il représente 50% de la masse des sucres totaux du soja. Il s'agit d'un dimère de glucose et de fructose liés par une liaison β -1,2. Le raffinose constitue 10% des sucres du soja. Il s'agit d'un trisaccharide composé de saccharose et de galactose liés par une liaison α -1,6. Le stachyose représente 40% des sucres du soja. Il s'agit d'un tetrasaccharide de raffinose et galactose liés également en α -1,6 (Mital and Steinkraus, 1979). Les liaisons β -1,2 sont hydrolysables par des invertases et les liaisons α -1,6 par des α -galactosidases (Figure 2). Il y a par ailleurs une faible quantité de verbascose, de glucose, fructose et galactose libres dans le soja.

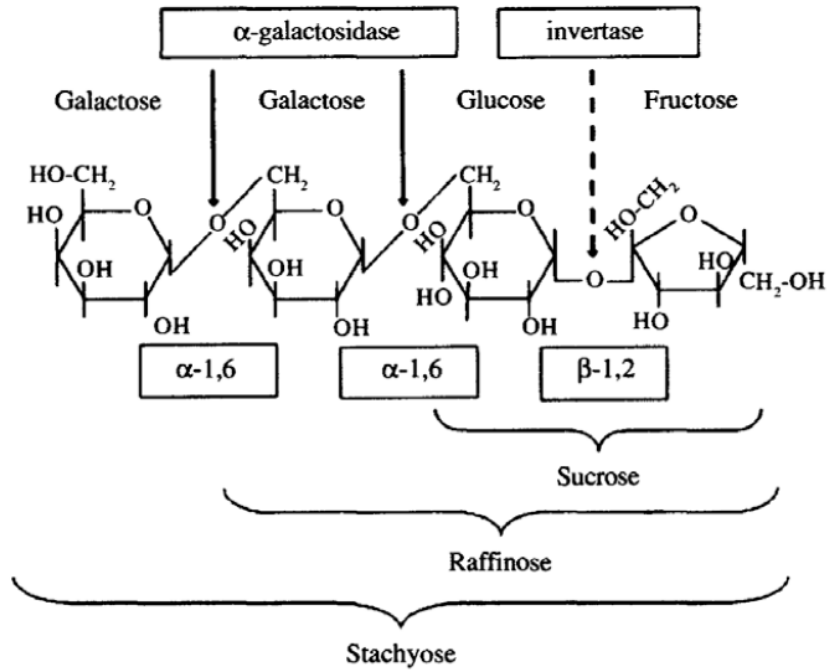


Figure 2. Structure des oligosaccharides du soja (Sanada et al., 2009).

La partie structurante de la graine est constituée des polysaccharides du cotylédon. Il s'agit d'arabino-galactanes et de polysaccharides acides. L'autre partie structurante constitue l'enveloppe de la graine. Celle-ci est constituée de pectine, de cellulose et d'hémicellulose (Karr-Lilienthal et al., 2005).

E. Les lipides du soja

Le soja est la deuxième légumineuse avec la plus haute teneur en lipides. Les lipides du soja sont principalement des triglycérides (99%). Les composants mineurs sont des acides gras libres, des phospholipides ou des lipides insaponifiables.

Pour rappel, les triglycérides sont constitués de glycérol lié à trois acides gras. La plupart des acides gras du soja sont insaturés. La moitié des acides gras est de l'acide linoléique. Environ 20% des acides gras du soja correspondent à de l'acide oléique puis par ordre décroissant, le soja contient de l'acide palmitique, linoléique et stéarique (Liu, 1997). Les acides linoléique et linoléique sont par ailleurs considérés comme essentiels car ils ne peuvent être synthétisés par les mammifères dont l'Homme.

F. Les nutriments mineurs du soja

Le soja peut contenir jusqu'à 5% en masse de minéraux. Le potassium est majoritairement présent suivi par le phosphore, le magnésium, le soufre, le calcium, le chlore

et le sodium. D'autres minéraux sont présents en dessous de 140 ppm , c'est le cas du fer, du zinc et de divers autres minéraux (Liu, 1997).

Les vitamines solubles dans l'eau du soja sont principalement la thiamine (B1), la riboflavine (B2), la niacine (B3), l'acide pantothénique (B5) et l'acide folique (B9). Les vitamines liposolubles du soja sont principalement des tocophérols (E). Les concentrations en β -carotène (A) et acide ascorbique (C) sont négligeables dans la graines mature mais mesurables lorsqu'elle est immature ou germée (Liu, 1997).

Enfin le soja peut également contenir plus d'1% d'acide phytique et de 0,1% à 0,3% d'isoflavones en équivalents aglycone (en % de matière sèche) (Liu, 1997).

G. Utilisation du soja

Du fait de cette composition riche, les graines de soja ont des utilisations diverses. Lorsqu'il est destiné à l'alimentation humaine, le soja non fermenté peut être consommé sous forme de jus, en tofu (du soja caillé qui ressemble à du fromage), en yuba (soja caillé déshydraté), germé ou bien en okara (part insoluble du jus de soja). Il peut être consommé tel quel, torréfié et/ou enrobé, sinon être réduit en farine et cuisiné. L'huile de soja ou ses protéines peuvent aussi être extraites afin d'être utilisées comme ingrédients ou additifs (comme la lécithine). Préparé, le soja peut donner des desserts frais, glacés ou être texturé afin de se substituer à de la viande.

Le soja peut aussi être soit lactofermenté de la même manière qu'un yaourt ou qu'un fromage. Il peut sinon être fermenté par d'autres bactéries, levures et/ou moisissures. Selon les ferments utilisés, on peut produire une pâte de soja (comme le miso), de la sauce soja, du tempeh, du natto, du sufu etc..

Dans notre étude, nous avons travaillé sur du jus de soja lactofermenté afin de réaliser un produit de type « yaourt » de soja. Le procédé de fabrication du jus de soja est présenté par la suite.

II. Le jus de soja

Des graines de soja et de l'eau sont les uniques ingrédients à l'origine du jus de soja (ou tonyu en japonais). Les premiers jus de soja auraient été réalisés en Chine durant le IIe siècle avant J.C, il est alors nommé doujiang, (Liu, 1997). En raison de son aspect, le jus de soja est parfois qualifié de « lait de soja », à tort puisque ce terme prête à confusion. Ce terme, ainsi que les termes dérivés de lait animal (« crème », « yaourt » etc.) sont d'ailleurs interdits depuis 1987 (Règlement (CEE) n° 1898/87 du Conseil du 2 juillet 1987 concernant la protection de la dénomination du lait et des produits laitiers lors de leur commercialisation, 1987).

A. Procédé de fabrication du jus de soja.

Le jus de soja est le produit d'un procédé impliquant diverses opérations unitaires telles que le trempage, le broyage, des traitements thermiques, des opérations de séparation et de mélange. Dans ce procédé, de nombreux paramètres influencent l'extraction pratiquée et donc la composition du jus obtenu.

Tout d'abord, les graines de soja peuvent être dépelliculées avant extraction (Figure 3.I). Cela va permettre de limiter le goût « vert » du produit. Ensuite, les graines de soja peuvent être trempées, lavées et/ou rincées (Figure 3.II). Cela peut être réalisé avec plus ou moins d'eau, en agitant ou non et durant une heure ou jusqu'à plusieurs jours. Les graines peuvent alors être broyées plus ou moins finement dans de l'eau avec un ratio eau/soja variant de 8:1 à 10:1 (Figure 3.III). Le broyat est alors séparé afin d'éliminer la pulpe de soja ou okara (part insoluble du soja, Figure 3.IV). Cette séparation est classiquement réalisée par filtration mais peut aussi être réalisée par centrifugation. Afin d'être conservé, le filtrat ou surnageant peut ensuite être pasteurisé à 80-120°C pendant quelques secondes (ou plusieurs dizaines de minutes selon la température) (Figure 3.V) (Davin and Berot, 1996; Liu, 1997). Le jus produit peut alors être consommé tel quel ou fermenté.

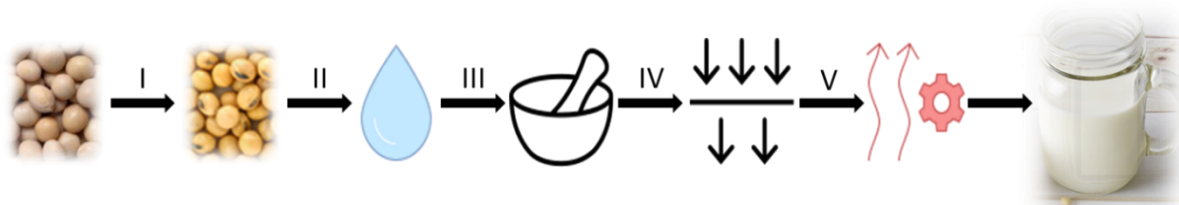


Figure 3. Procédé classique de fabrication du jus de soja (Harlé, 2020).

Cependant, certaines de ces étapes peuvent être modifiées ou réalisées dans un ordre différent afin d'améliorer le rendement et/ou la qualité du produit final. Le broyat peut par exemple être chauffé avant d'être filtré (Figure 4.VI). Cela améliore le rendement d'extraction, mais il y a alors un risque plus important de brûler le broyat et donc d'apporter des notes désagréables. Par ailleurs l'énergie de chauffe nécessaire est plus importante. Le broyage du soja peut aussi être réalisé à sec (Figure 4.VII). Cela produit une farine qui peut ensuite être hydratée. Le broyage peut être réalisé à chaud (entre 80 et 100°C) afin d'inactiver des lipoxygénases (Figure 4.VIII). Les graines de soja peuvent aussi être blanchies directement dans de l'eau chaude (Figure 4.IX). Diverses autres étapes peuvent encore être ajoutées au procédé afin d'améliorer le rendement et/ou la qualité du jus de soja. Le pH peut aussi être ajusté pendant le procédé. Du bicarbonate de soude est alors le plus souvent utilisé. Le pH du jus de soja est ensuite neutralisé par l'ajout d'une solution acide. Certaines étapes peuvent être réalisées sous vide ou sous pression. Le procédé industriel peut être réalisé de manière

discontinue (en mode batch) ou continue. Enfin, certains procédés ajoutent d'autres ingrédients tel que des stabilisants, des arômes, des vitamines, des minéraux, du sucre, de l'huile... (Davin and Berot, 1996; Liu, 1997).

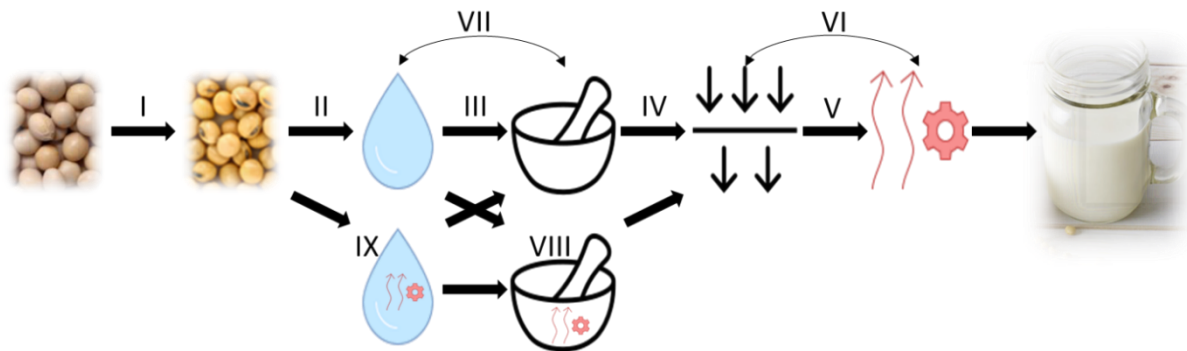


Figure 4. Variantes du procédé classique de fabrication du jus de soja (Harlé, 2020).

B. Composition du jus de soja

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, le jus de soja résulte de nombreuses transformations de la graine. Par ailleurs, les compositions des graines de soja utilisées sont également différentes selon les variétés et les conditions de culture. La composition des jus de soja résultants peut donc être très variable (Annexe A et Tableau 1).

Le jus de soja peut contenir de 14 à 98 g/L de protéines (Davin and Berot, 1996; Mital and Steinkraus, 1979). Toutefois, dans le commerce, il est courant de standardiser le jus de soja afin que sa teneur en protéines se rapproche de celle du lait de vache. Le jus de soja peut contenir de 1 à 23 g/L de sucres totaux (Champagne et al., 2009; Hati et al., 2014). À titre de comparaison, la composition du lait de vache varie de 29 à 43 g/L de protéines et de 44 à 53 g/L de lactose (Tableau 1) (Grappin et al., 1981; Memisi et al., 2011).

Tableau 1. Composition moyenne de jus de soja et de lait de vache (données du jus soja : moyennes extraites de l'Annexe B et données du lait de vache de (CIQUAL, 2017; Grappin et al., 1981; Liu, 1997; Memisi et al., 2011; USDA, 2019). La concentration en isoflavones correspond au total des équivalents aglycones d'isoflavones retrouvés du jus de soja.

	Jus de soja	Lait de vache
Protéines (en g/L)	36	32
Lipides (en g/L)	18	34
Acides gras saturés (%)	44	65
Acides gras insaturés (%)	56	35
Cholestérol (mg/L)	0	100
Glucides (en g/L)	29	46
Lactose	0	45
Saccharose	9.8	0
Raffinose	1.6	0
Stachyose	4.3	0
Fibres	10	0
Minéraux (en g/L)	5	7
Calcium	0,02	1,1
Phosphore	0,5	0,9
Potassium	1,2	1,4
Minéraux (en mg/L)		
Sodium	200	400
Fer	12	0,5
Vitamines (en mg/L)		
Thiamine (B1)	0,3	0,4
Riboflavine (B2)	0,2	1,6
Niacine (B3)	4	0,9
Isoflavones (mg/L)	100	0

C. Les caractéristiques organoleptiques du jus de soja

Le jus de soja présente des caractéristiques organoleptiques qui dépendent des différents composés présents et des traitements réalisés. La graine de soja crue a une saveur et une odeur de foin et des notes vertes, végétales, de haricot vert ou d'herbe, dues à des composés carbonylés (Davin and Berot, 1996). L'hexanal est reconnu comme le composé majoritairement responsable des notes vertes du soja. Le méthanal, la propanone (acétone)

et le pentanal participent également aux notes vertes du soja (Fujimaki et al., 1965). Ces composés et leurs caractéristiques sont retrouvés dans le jus de soja.

Le jus de soja a un goût sucré qui dépend de sa teneur en saccharose. Il peut aussi être astringent du fait de la présence de polyphénols et amer en raison de la présence de certains peptides. Les traitements thermiques peuvent éliminer des notes vertes mais induire une réaction de Maillard entre les sucres et les acides aminés. Cela peut en contrepartie produire des cétones, des aldéhydes et des composés soufrés aux notes de haricot cuit, de grillé ou de brûlé (Davin and Berot, 1996). Par ailleurs, d'autres composés tels que le furan-2-pentyl peuvent être retrouvés dans le jus de soja. Ce composé est responsable de notes de haricot cuit.

Les modifications de structure des protéines influencent également la perception des caractéristiques organoleptiques du jus de soja. La protéolyse peut augmenter la perception de l'amertume (Canon et al., 2018). La présence d'un film gras peut diminuer la perception de l'amertume et de l'astringence (Martin et al., 2016). Enfin, l'ajout d'enzymes ou de microorganismes peut modifier les composés responsables des notes vertes (Davin and Berot, 1996). Des souches de *Streptococcus thermophilus* et de *Lactobacillus delbrueckii* ont par exemple pu dégrader de l'hexanal dans du jus de soja (Pinthong et al., 1980; Wang et al., 1974). L'amertume, l'astringence et les notes vertes d'un jus de soja ne sont pas appréciées des consommateurs et ne sont donc pas désirées (Kaneko et al., 2014).

D. Les caractéristiques nutritionnelles

La majorité des protéines de soja (95%) sont digestibles. Le score de digestibilité des protéines corrigé par l'apport en acides aminés (le PDCAAS) du soja est de 0,95. Les protéines du lait de vache ont le score maximal de 1 (World Health Organization, 2007). Cela provient du fait que les légumineuses sont plus pauvres en méthionine et en cystéine que le lait. La méthionine et la cystéine représentent 2.2% en masse des protéines des graines de soja contre 3.5% dans le lait (USDA, 2019).

Les oligosaccharides tels que le raffinose et le stachyose sont peu digestibles par l'homme. Ces oligosaccharides peuvent apporter des désagréments intestinaux et des flatulences (Guillon and Champ, 2002). Ils peuvent également avoir des effets prébiotiques (Li et al., 2013).

Les effets sur la santé des isoflavones du soja sont controversés. Une consommation régulière inférieure à 100 mg d'isoflavones de soja / personne / jour est bien tolérée et n'apporte pas d'effets positifs ni négatifs sur la santé (Munro et al., 2003; Zaheer and Humayoun Akhtar, 2017). Une méta-analyse récente de 114 publications révèle des effets davantage positifs que négatifs sur la consommation de soja et d'isoflavones (Li et al., 2020). Ces effets concerneraient cependant uniquement la consommation à long terme de plus de

100 mg d'isoflavones de soja / personne / jour (EFSA Journal, 2015; Li et al., 2020). Un apport de 100 mg d'isoflavones correspond à la consommation d'environ un litre de jus de soja.

Nous avons vu dans cette partie que le jus de soja était nutritionnellement intéressant du fait de sa richesse en protéines, en acides gras insaturés, en minéraux et en vitamines du groupe B. Il présente toutefois certains défauts qui peuvent être partiellement corrigés au moment du processus d'extraction du jus. La fermentation lactique peut permettre de corriger d'autres défauts, en abaissant la quantité d'isoflavones, d'oligosaccharides non-digestibles (raffinose et stachyose) ou des composés volatils responsables des notes vertes (hexanal et 2-pentylfuran). Enfin, d'après la littérature, la fermentation lactique grâce à l'acidification et à la synthèse de composés aromatiques par fermentation a déjà permis d'augmenter l'acceptabilité et l'hédonisme des « yaourts » au soja. La partie suivante présente dans sa globalité la fermentation lactique. La partie IV de ce chapitre fera un bilan plus spécifique de la fermentation lactique en jus de soja.

III. La fermentation lactique

La fermentation lactique est étudiée depuis plus d'un siècle. La littérature sur le sujet regroupe des milliers d'articles et livres scientifiques. Cette partie présente une synthèse permettant la compréhension des résultats de la thèse (présentés dans le CHAPITRE 2. Résultats et avancées de la thèse). Elle explique: la fermentation lactique, les bactéries lactiques, leurs métabolismes, la diversité de ces métabolismes et l'intérêt des levains multi-souches. Enfin, les interactions entre bactéries lactiques et les stratégies de sélection de bactéries coopérantes sont présentées.

Dans la sous-partie traitant des métabolismes des bactéries lactiques, seuls les métabolismes du carbone, de l'azote et de modulation du potentiel d'oxydoréduction sont développés. Les métabolismes des sucres spécifiques au soja seront cependant abordés dans la partie IV. (La fermentation lactique du jus de soja). Les métabolismes de l'azote et des vitamines mettent l'accent sur les auxotrophies de certaines espèces car elles peuvent représenter un frein conséquent à leurs usages en microbiologie alimentaire.

A. Définition de la fermentation lactique

La fermentation a pour intérêt premier de permettre la conservation de matières premières périssables, sans chaîne du froid. C'est un procédé biologique qui consiste en l'utilisation de bactéries lactiques afin de transformer les sources de carbone présentes en acide lactique. La matière première est ainsi transformée biochimiquement. La fermentation lactique contribue ainsi à l'acidification, à la production de composés d'arômes et à

l'épaississement. Ces transformations améliorent sa conservation, mais aussi ses qualités organoleptiques et nutritionnelles.

Les bactéries lactiques sont des microorganismes qui réalisent la fermentation. Comme Pelczar a pu le définir en 1986, les microorganismes peuvent être considérés comme des petites industries chimiques qui ont la capacité de transformer des bioressources à travers des chaînes métaboliques. Ces microorganismes peuvent être naturellement présents ou non dans une matière première. Le procédé de fermentation peut modifier l'ensemble des composés de l'aliment. Le microbiote des aliments peut contenir jusqu'à 10^{10} cellules par gramme et peut être composé de plusieurs centaines d'espèces différentes (Delbes et al., 2015). Les microorganismes qui composent ce microbiote peuvent être bénéfiques ou non.

De nombreuses matières premières peuvent être fermentées : lait, végétaux sous forme de jus ou non, viande, produit de la mer... La fermentation lactique représente la majorité des fermentations réalisées dans le monde (Tamang and Kailasapathy, 2010). Les caractéristiques organoleptiques et nutritionnelles développées par la fermentation dépendent de la composition de l'écosystème de fermentation (matière première et microorganismes) et des paramètres physicochimiques appliqués (température de fermentation et présence d'oxygène par exemple).

B. Origines de la fermentation lactique

Les aliments et boissons fermentées sont produits depuis plus de 10 000 ans de manière empirique. Aujourd'hui plus de 5000 aliments et boissons fermentés sont référencés et représentent 5 à 40% du régime alimentaire de l'Homme (Tamang and Kailasapathy, 2010). Les procédés de fermentations sont de plus en plus étudiés car ils intéressent de plus en plus les consommateurs.

C. Les bactéries lactiques (BL)

La fermentation lactique est réalisée par des bactéries lactiques (BL). Les BL résultent d'une évolution et d'une adaptation à diverses niches écologiques. Les niches alimentaires sont des milieux riches. L'évolution et la sélection des BL a conduit à une réduction de la taille de leurs génomes en éliminant les voies inutiles (Makarova and Koonin, 2007). Cela a permis aux BL de s'adapter à leur environnement riche et de devenir plus compétitives. L'ubiquité des BL dans les aliments fermentés est en partie explicable par cette adaptation réussie (Gänzle, 2015). Elles excellent dans l'utilisation rapide de sources de carbone et la production d'acide lactique mais sont en contrepartie moins adaptables à des milieux différents et plus sensibles au manque de nutriments (Gänzle, 2015). Les BL sont devenues auxotrophes pour de

nombreux acides aminés (Seefeldt and Weimer, 2000) et vitamines au cours de leur évolution (Ruiz-Barba and Jiménez-Díaz, 1994).

Les BL sont des Firmicutes, à Gram positif, non sporulantes. Elles peuvent avoir une forme de coques ou de bâtonnets (bacilles). Les BL sont généralement immobiles, catalase négatives et anaérobies facultatives. Elles recouvrent divers genres dont les principaux sont *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella*. Ces bactéries présentent divers métabolismes mais ont comme caractéristique commune de produire majoritairement de l'acide lactique à partir du substrat carboné qui leur est fourni. Parmi les BL, certaines espèces sont qualifiées de « sûres » pour la consommation humaine. En Europe, elles sont dites QPS (Qualified Presumption of Safety, c'est-à-dire à présomption d'innocuité reconnue) pour l'EFSA (European Food Safety Authority). Aux Etats-Unis, elles ont le statut GRAS (Generally Recognized As Safe) pour la FDA (Food and Drug Administration) en fonction des usages que l'on en fait. À noter, la classification des lactobacilles a récemment été modifiée (Zheng et al., 2020). Dans ce manuscrit, nous utiliserons les nouveaux noms.

D. Le métabolisme des bactéries lactiques

1 Le métabolisme carboné

La plupart des BL utilisent différents sucres et substrats carbonés pour leur croissance. Connaître le métabolisme carboné des bactéries permet de les sélectionner de manière pertinente en fonction de la composition du milieu que l'on veut fermenter. Le substrat carboné métabolisable doit être transporté dans le cytoplasme de la cellule afin d'y être métabolisé.

1.1 Le transport du substrat carboné

Trois classes de transporteurs de substrat carboné, dont les sucres, ont été décrits chez les bactéries lactiques : les transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette), les transporteurs PTS et les transporteurs secondaires (ou symports).

Les transporteurs ABC sont des transporteurs actifs qui nécessitent une hydrolyse de l'ATP (Adénosine Tri Phosphate) afin d'importer des substrats. Il existe divers transporteurs ABC dédiés au transport de manière spécifique de substrats tels que des sucres, mais aussi des acides aminés, des lipides, d'ions, de polysaccharides, de peptides etc. Ces ABC transporteurs sont capables d'importer ou d'exporter le substrat transporté (Poolman, 2002).

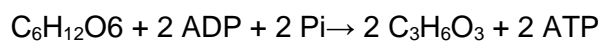
Les transporteurs PTS (systèmes phosphotransférase) couplent le transport et la phosphorylation du sucre. Ils utilisent du PEP (phosphoenol pyruvate) afin de transporter des hexoses ou des disaccharides. Les transporteurs PTS ne peuvent cependant pas transporter de pentoses (König et al., 2009).

Les transporteurs secondaires utilisent des flux de protons à travers la membrane afin de transporter des sucres. Le transport secondaire des sucres dépend alors du gradient de concentration de protons (Konings et al., 1995). Ces transporteurs peuvent transporter des sucres simples, des oligosaccharides et d'autres substrats carbonés comme du glycérol. L'entrée du sucre est couplée au nombre de protons excrétés qui dépend du pH externe et de la concentration en acide. Ce système de transport, tout comme les ABC transporteurs sont dépendants de l'énergie et requièrent une étape de phosphorylation du sucre transporté par une kinase ATP-dépendante une fois dans le cytoplasme (Raynaud, 2006).

Une fois internalisés, les sucres sont fermentés (catabolisés) par les BL via différentes voies métaboliques. Les voies utilisées dépendent des espèces et souches de BL et des conditions de fermentation (nature de la matière première et conditions physicochimiques). Selon qu'elles convertissent le glucose uniquement en acide lactique ou bien en acide lactique associé à d'autres métabolites, les bactéries lactiques peuvent être classées respectivement comme homofermentaires (par exemple *Streptococcus thermophilus* ou *Lactobacillus delbrueckii*) et/ou hétérofermentaires (comme *Lactiplantibacillus plantarum* ou *Limosilactobacillus fermentum* (Vos et al., 2009).

1.2 La voie homofermentaire

Divers sucres comme le glucose, le mannose, le fructose, le galactose, ou le saccharose qui entrent dans la composition du jus de soja peuvent être catabolisés par cette voie. La voie homofermentaire produit 2 moles de lactate et 2 ATP pour 1 mole de glucose consommée. Le bilan de la réaction s'écrit :



Le métabolisme homofermentaire emprunte toute la voie de la glycolyse. La glycolyse ou voie de Embden-Meyerhof est présente chez toutes les BL homofermentaires. Cette voie réduit une mole d'hexose en 2 moles de trioses-3-phosphates, converties en 2 moles de pyruvate en produisant 2 moles d'ATP (Figure 5a). Les BL fermentent ensuite le pyruvate selon les conditions de fermentation. Lorsque la source de carbone est abondante, les 2 moles de pyruvate produites sont métabolisées en 2 moles de lactate sans production d'ATP supplémentaire. Lorsqu'au moins 90% du glucose consommé est converti en lactate, le métabolisme est dit homolactique. Les pentoses ou le gluconate ne sont généralement pas métabolisés par les souches / espèces homolactiques obligatoires. Lorsque la source de carbone est limitante pour la croissance, certaines BL, capables d'utiliser la voie homofermentaire, peuvent diversifier les métabolites produits et on parle alors de voie hétérofermentaire facultative (Desmazeaud, 1983, Figure 5a.). C'est par exemple le cas de *Lactiplantibacillus plantarum* (Vos et al., 2009).

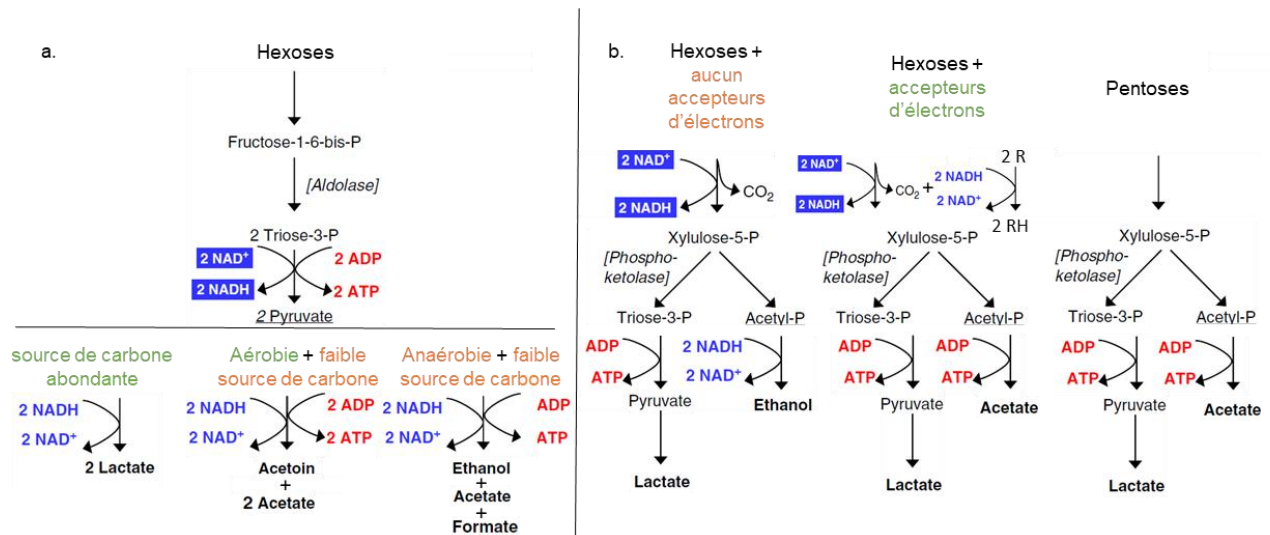


Figure 5. Résumé des métabolismes carbonés des bactéries lactiques (repris de Gänzle et al. 2015). a. Métabolisme des hexoses par la voie de Embden-Meyerhof ou glycolyse. Fermentation homofermentaire en présence d'une source de carbone abondante sinon fermentation mixte en aérobie ou en anaérobie. b. Métabolisme hétérofermentaire par la voie de la phosphokétolase. Voies des hexoses selon présence ou absence d'accepteurs d'électrons et voie des pentoses phosphates. NAD^+ : Nicotinamide adénine dinucléotide, ADP : Adénosine diphosphate

1.3 La voie hétérofermentaire

Certaines BL passent d'une fermentation homolactique à hétérofermentaire en fonction des conditions environnementales. Elles sont alors dites hétérofermentaires facultatives. Par exemple, certaines espèces sont homolactiques sur lactose. D'autres espèces sont dites hétérofermentaires strictes c'est-à-dire qu'elles produisent systématiquement d'autres métabolites que l'acide lactique, à savoir du CO_2 , de l'acide acétique et parfois de l'éthanol.

La voie hétérofermentaire permet de produire 1 mole d'ATP, 1 mole de CO_2 , 1 mole de lactate et soit 1 mole d'éthanol par mole d'hexose lorsqu'aucun accepteur d'électrons n'est disponible, soit 1 mole d'acétate par mole d'hexose en présence d'accepteur d'électrons (Figure 5). Le début de la voie est identique à celui de la fermentation homolactique. Puis le glucose-6-phosphate emprunte la voie oxydative de la voie des pentoses phosphates qui conduit à la formation de xylulose-5-phosphate. Une seule enzyme est spécifique à la voie hétérofermentaire. Il s'agit de la phosphokétolase qui convertit le ribulose-5-phosphate en glyceraldehyde-3-phosphate et acétyl-phosphate. L'utilisation d'accepteurs d'électrons peut permettre chez certaines BL comme *Oenococcus oeni* de convertir l'acétyl-phosphate en acétate plutôt qu'en éthanol (Unden et al., 2017). Certaines BL hétérofermentaires comme celles appartenant au genre *Fructobacillus* ne peuvent en revanche pas produire d'alcool déshydrogénase et ne fermentent pas le glucose en l'absence d'accepteurs d'électrons (Endo et al., 2018) (Figure 5).

Un intérêt de cette voie peut être la production d'acétate et d'éthanol qui présentent un intérêt antibactérien et antifongique. Ils contribuent cependant à une saveur aigre ou d'alcool

qui peut être jugée négativement d'un point de vue organoleptique si elle est trop importante (Gänzle, 2015). Les BL hétérofermentaires croissent cependant moins vite car elles ne produisent qu'un ATP par mole de glucose. La phosphorylation d'un disaccharide peut alors permettre à certaines BL hétérofermentaires d'économiser la dépense d'un ATP (Gänzle and Follador, 2012).

1.4 Le métabolisme mixte

La voie mixte emprunte la glycolyse et génère du pyruvate mais celui-ci est alors métabolisé par la pyruvate formate lyase ou la pyruvate déshydrogénase. Lorsque la source de carbone est limitante et en présence d'oxygène, une mole de pyruvate peut être utilisée pour produire une mole d'ATP, une mole d'acétate et une demi-mole d'acétoïne. C'est le cas de certaines souches de *Lactococcus* (Boumerdassi et al., 1996) et de *Lactobacillus* (Comasio et al., 2019; Lo et al., 2018; Tsau et al., 1992). Lorsque la source de carbone est limitante et en absence d'oxygène, 2 moles de pyruvates peuvent être utilisées pour produire 1 mole d'ATP, 1 mole d'acétate, 1 mole de formiate et 1 mole d'éthanol. (Figure 5a). C'est par exemple le cas pour certains *Lactococcus* et *Lactobacillus*; Vos et al., 2009).

D'autres facteurs comme un pH élevé, une température basse, le potentiel d'oxydoréduction (Koduru et al., 2017) ou la présence de certains métabolites peuvent aussi favoriser l'une des voies mixtes. La présence d'hème dans le substrat (les LAB sont auxotrophes en hème) peut par exemple induire la voie produisant de l'acétate et de l'acétoïne (Figure 5a, Gänzle, 2015).

1.5 Le métabolisme respiratoire

La présence d'hème et d'oxygène permet aussi d'induire la respiration chez certaines BL (certaines souches des genres *Leuconostoc* et *Lactococcus*) (Pedersen et al., 2012). Certaines BL (certaines souches de *S. thermophilus*, de *L. delbrueckii*, de *Lactobacillus acidophilus* ou de *Lactilactobacillus sakei*) ne peuvent pas utiliser la voie de la respiration. D'autres souches de *Lactobacillus*, de *Streptococcus* ou d'*Oenococcus* ne le peuvent qu'en présence d'oxygène, d'hème et de ménaquinone (vitamine K). Cette voie est donc très dépendante de l'environnement. Elle est cependant conservée puisqu'elle est très rentable en énergie et augmente le taux de survie des BL. Ce métabolisme consiste à ajouter à une fermentation homolactique, l'utilisation de pyruvate déshydrogénase, qui permet la production d'un NADH supplémentaire en présence d'oxygène ainsi que l'utilisation de NADH oxydases qui produit alors davantage d'accepteurs d'électrons (Pedersen et al., 2012).

1.6 Catabolisme des différentes sources de carbone

Les sucres autres que le glucose, comme le mannose, le galactose, le fructose, les di, tri ou oligosaccharides peuvent être catabolisés par des BL. La capacité à métaboliser ces

sucre dépend cependant de la souche. Le manuel de bactériologie Bergey's présente des tendances par espèces, i.e. 90% des souches de *S. thermophilus* sont capables de dégrader le saccharose. En ce qui concerne le raffinose, moins de 10% des souches de *L. delbrueckii* sont capables de le dégrader, mais de 11 à 89% des souches de *S. thermophilus* peuvent dégrader le raffinose (Annexe A) (Vos et al., 2009).

En résumé, les sucres simples (comme le glucose, le fructose, le xylose ou le galactose) sont directement catabolisés. Les sucres complexes nécessitent des hydrolyses préalables ou la présence d'une voie métabolique spécifique pour être catabolisés par les BL. Les di, tri ou oligosaccharides, comme le raffinose ou le stachyose présents dans le soja doivent être réduits en sucres simples. Comme présenté page 18, le raffinose et le stachyose peuvent être réduits par des invertases et α -galactosidases. Des souches de *L. cellobiosus*, *L. acidophilus*, *L. fermenti*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. curvatus*, *L. mesenteroides* et de *S. thermophilus* sont capables de réduire le raffinose et/ou le stachyose (Donkor et al., 2007; Hati et al., 2014; Mital and Steinkraus, 1975; T. R. Chen, 2011; Yoon and Hwang, 2008). 18

Le catabolisme du glucose et du fructose a déjà été présentés ci-dessus.

Le galactose est quant à lui catabolisé par des voies particulières ; chez les BL homolactiques comme *Lactobacillus helveticus* ou *L. johnsonii*, le galactose est transporté par un transporteur PTS, converti en galactose-6-P puis métabolisé par la voie du tagatose-6-phosphate. Chez les BL hétérolactiques comme certains *Lactobacillus* et l'ensemble des *Leuconostocaceae* (*Fructobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*), le galactose est transporté par une perméase et dans ce cas son catabolisme emprunte la voie de Leloir. Certaines BL ne peuvent en revanche pas métaboliser le galactose (Gänzle, 2015; Vos et al., 2009). Chez *Lc. lactis* les deux voies (Leloir et tagatose-6-phosphate) peuvent co-exister. La première est codée sur le chromosome et la deuxième est plasmidique (Orberg and Sandine, 1985; Rooijen et al., 1991).

Chez certaines bactéries, des acides peuvent aussi être utilisés comme source de carbone. Le lactate peut être métabolisé en acétate et en 1,2-propanediol ce qui peut conduire à une remontée du pH de l'aliment comme chez *L. buchneri* en levain panair (Zhang et al., 2010). Enfin, le métabolisme du citrate chez certains *Lactobacillus* et *Lactococcus*, peut induire la production d'ATP, de succinate, de lactate, d'acétate et d'éthanol ou d'acétoïne (Figure 6). La conversion de citrate en succinate permet de maximiser l'oxydation de cofacteurs. La conversion de citrate en acétate et éthanol via la pyruvate formate lyase permet la production d'un ATP. Enfin, le citrate peut être métabolisé en acétoïne afin de prévenir l'accumulation d'acidité. Cette réaction est favorisée à pH acide alors que la production de lactate est favorisée à pH neutre.

Le glycérol peut aussi être catabolisé par la voie de la glycérol kinase qui produit du propanediol, de l'acétate ou du butanediol (Doi, 2019). Le propanediol peut, en l'absence d'autres source de carbone, être métabolisé par certaines BL en propionate.

Le métabolisme carboné des BL, décrit ci-dessus, est donc différent selon les sources de carbones disponibles dans l'environnement et les conditions de fermentation. Cela conduit à des produits de fermentation variés qui peuvent avoir un impact sur les propriétés organoleptiques du produit fermenté final.

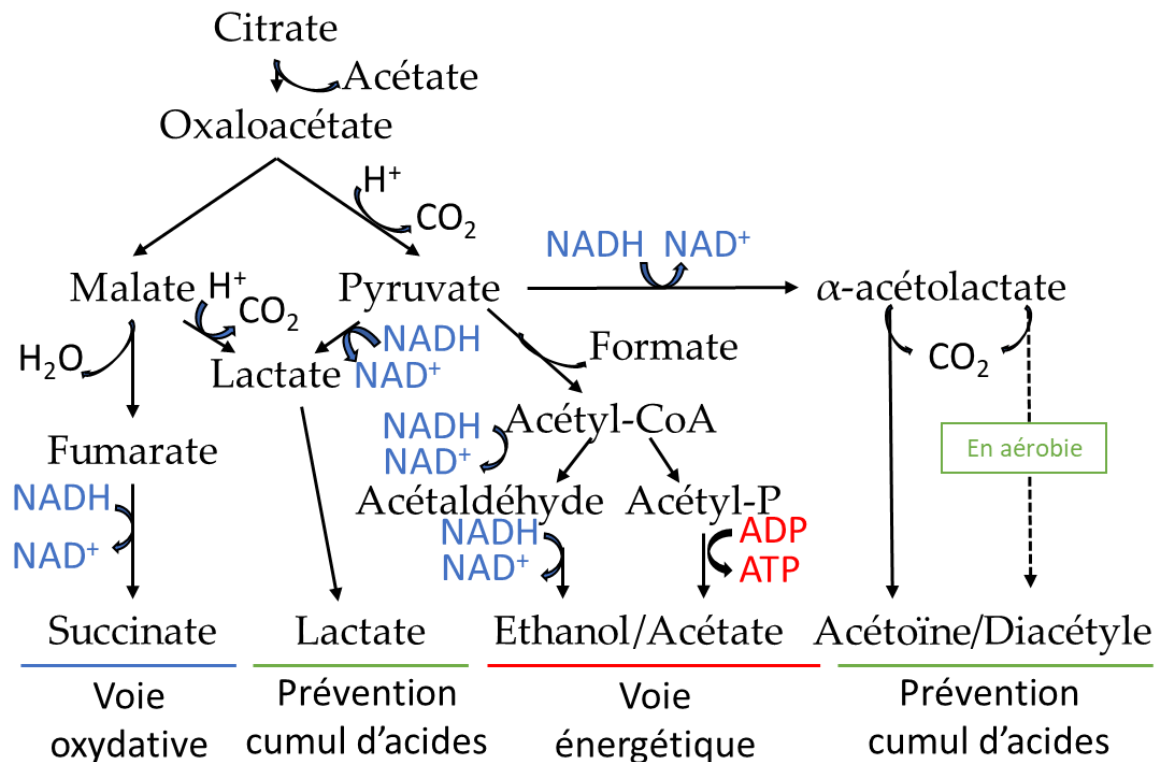


Figure 6. Métabolisme du citrate des bactéries hétérofermentaires. En milieu oxydant, le citrate peut être métabolisé en pyruvate sans consommer de NAD⁺. Afin de soutenir un métabolisme oxydant, le citrate peut être métabolisé en succinate. À pH acide, le citrate peut être métabolisé en lactate et acétoïne (ou diacétyle en présence d'O₂). Ou bien le citrate peut permettre de générer de l'ATP. (Gänzle, 2015).

1.7 La production de composés d'intérêt du métabolisme carboné

À pH acide et en présence d'oxygène, du butane-2,3-dione (ou diacétyle) responsable de l'arôme 'beurré', peut être formé par la dégradation non-enzymatique d'α-acétolactate. L'α-acétolactate est un intermédiaire dans la formation de l'acétoïne (Figure 6) (Gänzle, 2015).

1.8 La production d'exo-polysaccharides (EPS)

Divers polysaccharides comme le dextrane peuvent être produits par des bactéries lactiques comme *L. mesenteroides* (Zarour et al., 2017). Ces polysaccharides constituent des polymères carbonés qui peuvent être localisés dans la paroi, à la surface ou à l'extérieur de la

cellule. Les exo-polysaccharides (EPS) constituent l'ensemble des polysaccharides excrétés à l'extérieur de la cellule.

Les EPS peuvent avoir un rôle dans la protection de la cellule contre des conditions physiques, chimiques et biologiques (Zhou et al., 2019). Ils peuvent également présenter un intérêt fonctionnel, nutritionnel et organoleptique en industrie agroalimentaire (Zannini et al., 2016). L'intérêt majeur des EPS recherché dans le volet industriel de cette thèse est l'apport d'une texture épaisse.

a) Le métabolisme de biosynthèse des EPS

Il existe plusieurs mécanismes de biosynthèse des EPS. Les polymères peuvent être synthétisés à l'extérieur de la cellule par des transglycosylases (ou glycosucrases) comme pour *L. rhamnosus* GG (Lebeer et al., 2009). En présence de sucrose, les glycosucrases peuvent synthétiser des oligosaccharides pouvant avoir des poids moléculaires variables selon la souche de BL et les conditions. Pour la synthèse d'hétéropolysaccharides, des sous-unités d'EPS peuvent être synthétisées dans le cytoplasme par des enzymes de type glycosyltransférase, qui catalysent les liaisons successives de sucres nucléotidiques à la sous-unité en cours de construction. Les sous-unités sont ensuite exportées à travers la paroi, puis polymérisées à l'extérieur de la cellule.

b) La modulation de la biosynthèse d'EPS

La production d'EPS par les BL dépend de nombreux facteurs. Elle est d'abord dépendante de la souche de BL. Elle dépend aussi de la composition du milieu (source de carbone, d'azote et d'autres nutriments), des conditions physicochimiques (pH, température, oxygène) et la quantité produite varie selon la phase de croissance des bactéries (Zannini et al., 2016).

Une température de fermentation plus basse permettrait d'améliorer la production en EPS (Zannini et al., 2016). Le pH peut avoir plusieurs effets. Lorsqu'il est contrôlé, il peut permettre de rallonger la phase exponentielle et stationnaire et donc la production d'EPS (quantitativement et qualitativement). Le maintien d'un rapport élevé de source de carbone sur source d'azote durant la fermentation favorise également la synthèse d'EPS de haut poids moléculaire chez *S. thermophilus*. Enfin l'association de souches en coculture peut également permettre d'augmenter la quantité d'EPS produits comme chez *L. rhamnosus* ou *S. thermophilus* (Bertsch et al., 2019; Nguyen et al., 2019).

2 Le métabolisme azoté

Les BL sont exigeantes en acides aminés (AA) du point de vue nutritionnel. Elles sont en effet incapables de synthétiser un certain nombre d'AA. Les BL ont entre 6 et 14 auxotrophies pour les AA (Pederson et al., 1999). Les auxotrophies en AA varient selon la

souche et l'espèce de BL (Vos et al., 2009). Les auxotrophies les plus fréquentes concernent la méthionine et l'arginine. La capacité de croissance des BL dépend donc de la disponibilité des AA dans le milieu (AA libres ou peptides assimilables). Certains milieux comme le lait sont pauvres en AA libres ou peptides assimilables (Letort et al., 2002). La capacité des BL à se développer dans ces milieux dépend donc de leur capacité à utiliser les protéines présentes comme sources d'AA essentiels, grâce à leurs protéases et peptidases.

2.1 Dégradation et transport des acides aminés

Les protéases et peptidases sont diverses et peuvent être spécifiques ou aspécifiques. Les protéases et les peptidases peuvent être pariétales, cytoplasmiques ou libérées à l'extérieur des cellules (Gobbetti et al., 1996; Rodríguez-Serrano et al., 2018; Yukalo and Krupa, 2017). En jus de soja, il a été montré que la protéase de paroi PrtS de *S. thermophilus* est impliquée dans sa croissance (Boulay et al., 2020).

L'absence de protéases et peptidases chez une souche de BL dans un milieu restreint en AA libres ou en peptides assimilables, comme le lait, limite la synthèse de nouvelles protéines et donc la croissance de cette bactérie (Pederson et al., 1999). En général, les BL ont des protéases de paroi. Certaines souches de *S. thermophilus* et certaines souches d'autres espèces comme *Lactiplantibacillus plantarum* WCFS1 et *Latilactobacillus sakei* 23K ne possèdent cependant pas de gène codant pour une protéase de paroi (Rodríguez-Serrano et al., 2018; Savijoki et al., 2006).

De même que pour les sucres, les acides aminés et peptides peuvent être transportés à l'intérieur des cellules selon trois modes. Le glutamate, la glutamine, l'aspartate et l'asparagine sont transportés par des systèmes qui nécessitent de l'ATP (ABC transporteurs). L'alanine, la sérine, la leucine, l'isoleucine, la valine et la lysine sont transportés par des transporteurs secondaires, comme pour les sucres, qui utilisent des flux de protons à travers la membrane. Enfin, des perméases spécifiques (à AA soufrés, polaires, à chaîne latérale ou à oligopeptides) permettent leur transport (Ganesan and Weimer, 2017; Herve-Jimenez et al., 2008). Deux groupes fonctionnels de transporteurs de peptides ont été décrits. Il existe des transporteurs PTR (Peptide TRansport) qui utilisent des flux de protons à travers la membrane et des ABC transporteurs qui hydrolysent l'ATP afin de permettre le transport de peptides.

2.2 Les protéases des BL

La plupart des BL présentent une unique protéase de paroi. Certaines BL comme *L. helveticus* peuvent cependant en présenter davantage (Griffiths and Tellez, 2013). Il existe une grande diversité de protéases de paroi. Ces protéases sont constituées de pré protéines afin de former un ensemble d'environ 2000 AA. Elles sont composées de domaines fonctionnels notés : PP (domaine pré protéique correspondant à une séquence signal), PR (site catalytique spécifique à la sérine), A (fonction inconnue), B (domaine stabilisant l'activité/ la spécificité de

l'enzyme), H (domaine en hélice impliqué dans la position de A et B hors de la bactérie), W (domaine hydrophile de l'enzyme utilisé pour éloigner l'activité de la paroi de la bactérie) et AN (domaine d'ancrage de l'enzyme dans la paroi cellulaire (Fernandez-Espla et al., 2000).

Tous ces domaines ne sont pas présents chez toutes les BL. Alors que le domaine B est présent chez la plupart des BL, il n'est pas présent dans la protéase PrtS de *S. thermophilus*. A l'inverse, le domaine H est présent uniquement dans PrtS (*S. thermophilus*), PrtP (*L. lactis*) et PrtH (*L. helveticus*). Enfin, chez *L. helveticus* et *L. delbrueckii* les protéases de paroi ne présentent pas de domaine AN et utilisent directement le domaine H pour s'ancrer dans la paroi cellulaire (Savijoki et al., 2006).

2.3 Le transport des AA des BL

L'utilisation des peptides libérés par les protéases dépend de la capacité des BL à les importer dans les cellules. Le transport de peptides est réalisé par une combinaison de différents transporteurs liés au flux d'ions (DtpT), d'ABC transporteurs (Dpp) ou de perméases (Opp; Doeven et al., 2005). Les perméases (Opp) peuvent transporter des oligopeptides contenant jusqu'à 18 AA. Les ABC transporteurs (Dpp) peuvent transporter des peptides de 2 à 9 AA. Les transporteurs à flux de protons (DtpT) peuvent transporter uniquement des AA, des di- et tripeptides. Les peptides transportés par Dpp peuvent contenir des AA branchés relativement hydrophobes alors que DtpT transporte préférentiellement des peptides contenant des AA chargés ou hydrophiles (Figure 7).

2.4 Les peptidases des BL

Les peptidases permettent de libérer les AA essentiels au métabolisme des BL. Une trentaine de peptidases ont été décrites à ce jour. Une caractéristique commune aux endopeptidases est leur incapacité à hydrolyser des protéines quaternaires intactes (Savijoki et al., 2006).

Les différentes peptidases diffèrent par leurs spécificités et activités. Les peptidases les plus générales sont les aminopeptidases (PepN et PepC) et la X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase (PepX). Il s'agit d'endopeptidases intracellulaires capables d'hydrolyser divers oligopeptides tout comme PepE (à l'activité thiol- dépendante) et les métallo peptidases : PepF, PepG et PepO.

Les autres peptidases ont des substrats spécifiques. Par exemple PepA hydrolyse des peptides contenant 3 à 9 AA, PepS hydrolyse des peptides contenant 2 à 5 AA contenant une arginine ou un AA aromatique en position N-terminal.

Les di- et tripeptides générés par ces peptidases peuvent ensuite être hydrolysés par la tripeptidase PepT et les dipeptidases PepV et PepD. Ces di- et tri-peptidases hydrolysent préférentiellement des peptides contenant des AA hydrophobes dont la leucine, la méthionine,

la phénylalanine ou la glycine. PepP préfère les tripeptides avec une proline en position centrale, PepR, PepI et PepQ agissent sur les dipeptides contenant une proline (Figure 7).

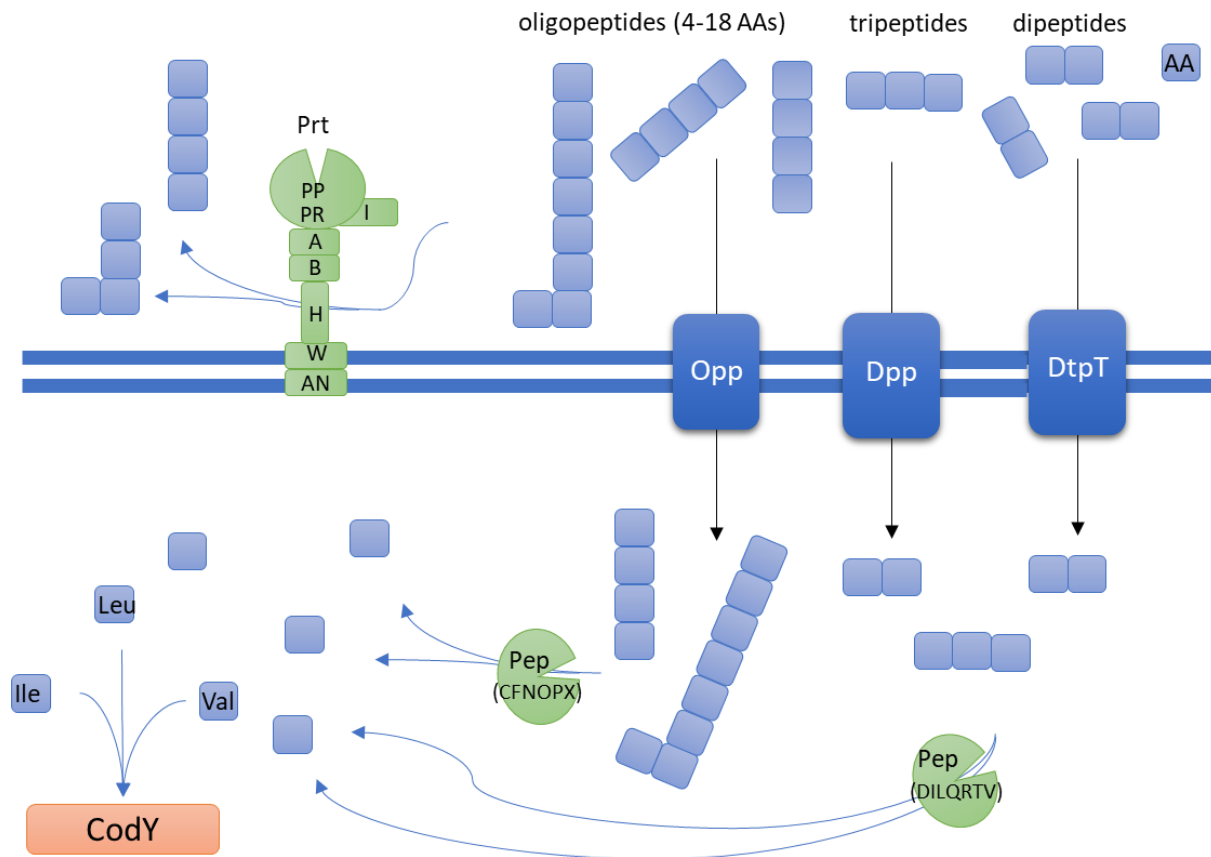


Figure 7. Le système protéolytique des BL et sa régulation (repris de Doeven et al., 2005; Savijoki et al., 2006; Fernandez-Esplá et al., 2000). Prt : Protéase de paroi, PP : domaine pré protéique correspondant à une séquence signal, PR : site catalytique spécifique à la sérine, A : fonction inconnue, B : domaine stabilisant l'activité/ la spécificité de l'enzyme, H : domaine en hélice impliqué dans la position de A et B hors de la bactérie, W : domaine hydrophile de l'enzyme utilisé pour espacer l'activité et la paroi de la bactérie et AN : domaine d'ancrage de l'enzyme dans la paroi cellulaire, Opp : perméase d'oligopeptides (4-18 AA), Dpp : ABC transporteur d'oligopeptides (2-9 AA), DtpT : transporteur ionique de di- et tripeptides. PepOF : endopeptidases, PepNCP : aminopeptidases, PepX : X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase, PepT : tripeptidase, PepQ : prolidase, PepR : prolinase, PepI : proline iminopeptidase, PepDV : dipeptidases, CodY : répresseur de transcription des gènes codant les protéases, les transporteurs et les peptidases, modulé par le pool d'AA branchés comme cofacteurs (Ile : Isoleucine, Leu : Leucine et Val : Valine).

2.5 Le rôle des acides aminés

Les AA ont divers rôles dans la cellule. Tout d'abord, les AA sont nécessaires à la synthèse de toutes les protéines de la cellule bactérienne. Une part des AA permet de réguler le pH et de maintenir le potentiel d'oxydo-réduction (ORP). Leur catabolisme peut permettre de satisfaire les besoins nutritionnels des bactéries, d'alimenter le pool de précurseurs, de générer de l'ATP et de régénérer des cofacteurs. Les principales voies cataboliques des AA conduisent à la production d'acétyl-CoA qui peut être reconverti en divers AA selon les besoins ou en autre composés via le métabolisme du pyruvate. Le pyruvate et l'acétyl-CoA sont des intermédiaires clés des métabolismes carboné et azoté. Les AA ont chacun leurs rôles

spécifiques (Ganesan and Weimer, 2017). Comme le métabolisme carboné, le métabolisme azoté dépend des conditions environnementales. Certaines voies peuvent être bidirectionnelles. Les composés produits peuvent permettre de faire face à certaines conditions de stress (Russo et al., 2016). Les AA peuvent avoir un rôle dans la viabilité de la cellule, dans la protection de la cellule, dans sa structure ou encore dans l'osmorégulation (Qiao et al., 2018). Le métabolisme azoté peut par exemple produire des amines biogènes en réponse au stress acide (Barbieri et al., 2019). Cependant, ces amines biogènes sont indésirables dans les aliments du fait de leur effet négatif sur la santé humaine au-dessus d'une certaine concentration (EFSA Journal, 2011; Ganesan and Weimer, 2017). Enfin, le catabolisme d'acides aminés peut permettre la production de composés d'arôme.

a) Les rôles principaux par acides aminés

L'arginine peut être utilisée pour réguler le pH externe et produire de l'énergie via la voie de l'arginine déiminase. L'arginine peut être synthétisée à partir d'aspartate ou de glutamate. Le glutamate participe à plus de 150 voies métaboliques des BL (Caspi et al., 2018). Il peut permettre la formation de cétoacides, potentiellement impliqués dans des réactions d'échange du groupement amine entre AA (transamination). Le glutamate a un rôle dans la modulation du potentiel d'oxydoréduction via la formation de glutathion avec une molécule de cystéine (Ganesan and Weimer, 2017).

La cystéine et la méthionine sont des acides aminés soufrés qui peuvent être synthétisés chez certains *Lactococcus* à partir de sulfate inorganique. La cystéine et la méthionine sont impliquées dans : la synthèse du peptidoglycane, la modulation du pH, le transfert d'atomes de carbone via la S-adénosyl-méthionine et la modulation du potentiel d'oxydo-réduction (présenté ci-dessous). Des composés volatils soufrés typiques des arômes fromagers peuvent être produits via le catabolisme de la méthionine (Ganesan and Weimer, 2017).

D'autres AA sont précurseurs de composés d'arôme importants dans les aliments fermentés. Les acides aminés aromatiques, tryptophane, tyrosine et phénylalanine, sont transaminés pour produire un cétoacide aromatique qui est ensuite dégradé en divers composés : acide aromatique, alcool ou aldéhyde (métabolisme présenté ci-dessous). Par exemple le phényl éthanol est un alcool à l'arôme floral issu du catabolisme de la phénylalanine.

La lysine et la proline peuvent être biosynthétisées à partir d'aspartate, glutamate ou d'arginine. Ces AA ont un rôle important dans la structure de la paroi cellulaire et peuvent aussi être catabolisés pour produire de l'énergie ou des acides gras (Ganesan and Weimer, 2017).

L'alanine, l'aspartate et l'asparagine sont également importants dans la structure des BL (Billot-Klein et al., 1997; Chapot-Chartier and Kulakauskas, 2014). L'alanine peut être réversiblement produite à partir de l'aspartate et métabolisée pour produire du pyruvate et de l'oxaloacétate. L'histidine peut aussi être utilisée pour produire de l'énergie, pour réguler le pH

ou le potentiel d'oxydo-réduction. La glycine est un précurseur de la sérine. La glycine participe à la production de composés volatils soufrés et au transfert de carbone via le S-adénosyl-méthionine. La sérine peut être utilisée dans le métabolisme énergétique ou pour la synthèse de méthionine ou de cystéine. Le catabolisme de la thréonine permet la production d' α -cétobutyrate, de propionate, d'ATP, de glycine et la modulation du pH (Ganesan and Weimer, 2017).

b) La production d'énergie

Les voies de production d'énergie par le catabolisme des acides aminés sont essentiellement activées en condition de carence en substrats carbonés ou en cas de stress. Comme indiqué ci-dessus, la voie de l'arginine déiminase permet de générer de l'ATP. Mais des acides aminés ramifiés comme la leucine, l'isoleucine ou la valine peuvent également être utilisés comme source d'énergie, comme chez *Lactococcus lactis*. La leucine devient par exemple source d'acide 2-methylbutyrique et peut générer 3 molécules d'ATP par molécule de leucine (Ganesan and Weimer, 2017). Plus indirectement, la désamination de la sérine en pyruvate permet la production d'énergie. Enfin, l'aspartate, le glutamate, l'histidine, la tyrosine et le tryptophane peuvent produire de l'énergie suite à une décarboxylation. Cette décarboxylation forme une amine en consommant un proton. Le transport de l'amine hors de la bactérie génère un gradient électrochimique conduisant à la synthèse d'ATP. Ce sont d'ailleurs ces amines qui sont dites biogènes et qui peuvent être toxiques pour l'Homme (Barbieri et al., 2019).

c) La production de molécules aromatiques

Plusieurs familles de molécules aromatiques dérivent des acides aminés (aldéhydes, acides, alcools). Les molécules aromatiques dérivant des AA aromatiques ont une note plutôt florale, celles dérivant des acides aminés ramifiés ont une note plutôt animale et enfin, celles dérivant des acides aminés soufrés sont plutôt aillées. Deux réactions initient ce catabolisme : la transamination et l'élimination de la chaîne latérale.

d) La transamination

Trois aminotransférases ont été caractérisées chez les BL : i. ArAT ayant une affinité pour les acides aminés aromatiques et la méthionine, ii. BcAT ayant une affinité pour les acides aminés ramifiés et la méthionine et iii. AT, ayant une affinité spécifique de l'aspartate. Ces transaminations dépendent cependant de la disponibilité d'un céto-acide accepteur dans le milieu. Si un céto-acide accepteur est présent, le céto-acide produit peut ensuite soit : i. être réduit en hydroxy acide non aromatique (ce qui permet la régénération de NAD), ii. être décarboxylé de manière non oxydative. Les produits sont ensuite oxydés ou réduits en acides et alcools respectivement, iii. être décarboxylé de manière oxydative en acyl-CoAs, transformés ensuite en acides ou iv. être oxydé, c'est le cas des céto-acides dérivés de la

phénylalanine, de la leucine, ou de la méthionine (Yvon, 2006). Les acides et acyl-CoAs produits par ces voies peuvent enfin être combinés à des alcools pour former des esters. Comme toutes ces voies impliquent des réactions d'oxydoréduction ou des réactions permettant de régénérer des cofacteurs, elles sont donc dépendantes des conditions d'oxydoréduction du milieu. Des conditions oxydantes favorisent la production d'aldéhydes et des conditions réductrices favorisent la production d'acides carboxyliques chez *L. lactis* (Kieronczyk et al., 2006).

e) L'élimination de la chaîne latérale

Les réactions d'éliminations des chaînes latérales touchent essentiellement la méthionine et la thréonine. La méthionine peut être catabolisée en α -cétobutyrate, ammoniacque et méthanethiol. Les cystathionines β -lyases capables de couper la liaison C-S de la méthionine peuvent être produites par des BL. Le méthanethiol produit peut ensuite être facilement oxydé en dimethyl di- ou trisulfure. La thréonine peut être catabolisée en glycine et en acétaldéhyde. Cet acétaldéhyde est caractéristique du yaourt alors que les dérivés de la méthionine sont des arômes plutôt fromagers.

3 La régulation des métabolismes carboné et azoté

La régulation des métabolismes d'une bactérie permet à celle-ci de s'adapter à l'évolution constante de son environnement. Ces adaptations peuvent faire intervenir de nombreux réseaux de régulation. Un signe traduisant l'évolution de l'environnement est généralement perçu soit au niveau de l'ADN, soit au niveau des protéines. Un signal réponse permet alors d'activer un ou plusieurs régulateurs de la réponse transcriptionnelle et/ou traductionnelle. Il peut en résulter d'autres modifications du métabolisme (du transcriptome ou du protéome), des modifications de la physiologie cellulaire et de l'environnement physicochimique (le produit et/ou le procédé dans le cadre d'une fermentation) comme présenté en Figure 8.

La plupart des gènes du métabolisme carboné et du métabolisme azoté sont organisés en opérons et donc co-exprimés. Le niveau d'expression des gènes impliqués dans le transport, le catabolisme des sucres et des AA peut être contrôlé au niveau de l'initiation et de l'élongation de la transcription. La modulation de la transcription est le système majeur de régulation des métabolismes.

La modulation de la traduction permet également de réguler les métabolismes. Les réponses traductionnelles et du protéome n'ont cependant pas été suivies dans cette thèse. Elles ne seront donc pas présentées ici. Toutefois, des revues permettent d'avoir une vision plus large des régulations des métabolismes bactériens (Bren and Eisenbach, 2000; Deutscher et al., 2006; Kobir et al., 2011; Lazdunski et al., 2004). D'autres revues présentent

plus particulièrement des études protéomiques des BL (Champomier-Vergès et al., 2010; Di Cagno et al., 2011; Vinusha et al., 2018).

De nombreuses voies métaboliques des BL peuvent être influencées par des modifications transcriptomiques. Par exemple, des conditions de stress et/ou l'absence de source de carbone peuvent stimuler la transcription de clusters de gènes qui peuvent induire l'utilisation d'AA et/ ou de composés carbonés (Kalisky et al., 2018). Le catabolisme des AA peut participer à limiter le stress par exemple par la régulation transcriptionnelle de facteurs de modulations du potentiel d'oxydoréduction (Douillard and de Vos, 2014).

La caractérisation et la quantification de l'ARN synthétisé permet d'identifier les gènes exprimés, de déterminer les mécanismes de régulation contrôlant leur expression et de définir les réseaux d'expression et de régulation des gènes. Aujourd'hui, la caractérisation et la quantification de séquences ARN peuvent être réalisées via des méthodes de séquençage à haut débit. Les approches transcriptomiques sont des outils de choix pour analyser finement comment une bactérie adapte son métabolisme en réponse à son environnement. Les principaux travaux de transcriptomique réalisés sur des BL ont concerné l'étude de l'effet de facteurs identifiés ou non de l'environnement et de mutations de gènes (Al-Madboly et al., 2020; Guédon et al., 2005; Vermeulen et al., 2006; Zhang et al., 2020). Certains systèmes étudiés comme le mécanisme de répression catabolique du carbone (CCR) sont d'ailleurs complexes (Görke and Stülke, 2008).Figure 1

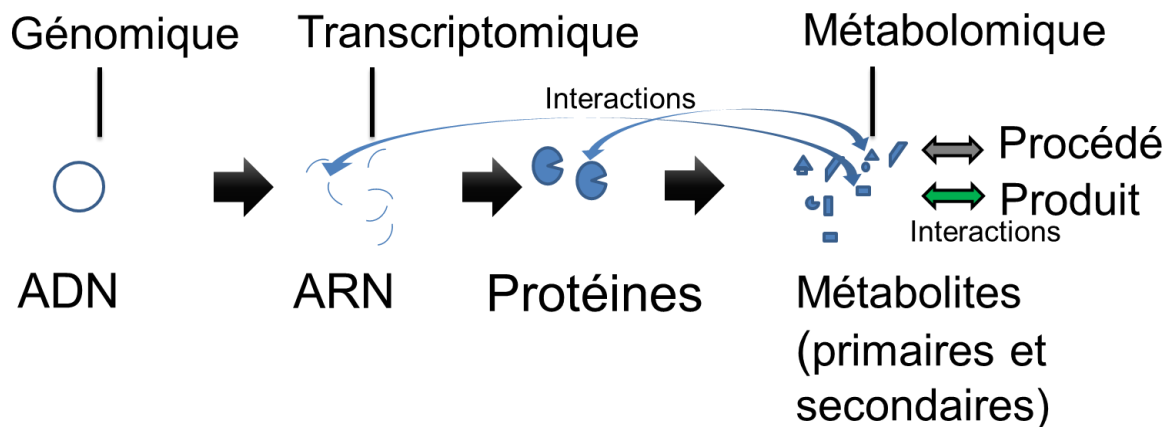


Figure 8. Schéma de régulation et des méthodes d'analyses associées utilisées dans cette thèse pour l'étude des métabolismes d'une bactérie en monoculture dans le cadre d'un procédé de fermentation. La protéomique (analyse des protéines) n'a pas été étudiée.

Des phénomènes de « quorum sensing », d'interactions entre des bactéries peuvent également avoir lieu au niveau de la régulation de la transcription. Des études supplémentaires sont cependant nécessaires afin de mieux comprendre l'importance de la régulation transcriptionnelle sur le catabolisme des AA et son impact sur la modification des caractéristiques fonctionnelles, nutritionnelles et organoleptiques des produits fermentés.

4 Le potentiel d'oxydo-réduction

4.1 Introduction

Le potentiel d'oxydo-réduction (ORP) représente la tendance des molécules d'un milieu à donner et recevoir des électrons, ce qui équivaut respectivement à une réaction d'hydrogénation (réduction) ou de déshydrogénation (oxydation). Ce mécanisme nécessite la disponibilité d'un accepteur final d'électrons. Chez les bactéries lactiques, c'est un intermédiaire du métabolisme carboné (principalement le pyruvate) qui est réduit. Les coenzymes d'oxydoréduction permettent le couplage entre les réactions d'oxydation et de réduction des cellules.

L'adaptation des BL à l'ORP dépend de leur capacité à réagir avec les oxydants (accepteurs d'électrons) ou les réducteurs (donneurs d'électrons) présents dans le milieu. En effet, le flux de carbone et d'électrons (et potentiellement toutes les réactions biochimiques des cellules dont les activités enzymatiques) dépendent de cette capacité. Par exemple, des bactéries pourvues de NADH-oxydases peuvent réduire le dioxygène en eau. Il en résulte des modifications du métabolisme, de la physiologie cellulaire et de l'environnement physicochimique. Ce système d'interaction multifactoriel est une difficulté de l'étude des réponses des BL à l'ORP extracellulaire.

4.2 La mesure de l'ORP

L'ORP au même titre que le pH est un paramètre intrinsèque à tous les milieux. Il peut être mesuré avec une électrode et s'exprime en volts. Un ORP positif représente un système oxydant et un ORP négatif représente un système réducteur. Le pH, la composition chimique du milieu comme l'oxygène dissout ou des traitements technologiques peuvent induire des réactions d'oxydoréduction d'un milieu et donc influencer l'ORP. L'ORP peut avoir un impact sur les caractéristiques des produits alimentaires : l'oxydation peut influencer la réaction de Maillard ou la production d'aldéhydes, la réduction peut influencer la production d'acides carboxyliques et les deux modulent la fermentation (Martin et al., 2011).

4.3 Le rôle du potentiel d'oxydo-réduction chez les BL

Le métabolisme de modulation de l'ORP des bactéries lactiques doit leur permettre de conserver un état réduit afin de disposer de NAD^+ , limiter l'oxydation des cellules et réguler leur pH intracellulaire (Calderini et al., 2017; N. Larsen et al., 2016; Martin et al., 2013).

Les bactéries participent à la production de coenzymes réduits via différentes voies cataboliques dont la glycolyse et la voie de la phosphokétolase qui fournissent des NADH (Figure 5). Les voies sont d'ailleurs régulées en l'absence d'accepteurs d'électrons ou selon que le milieu est en aérobie ou en anaérobie (Figure 5b). Lorsque le taux de NADH/NAD^+ est élevé, la production de glycéraldéhyde-3-phosphate qui conduit à la formation de pyruvate est

réprimée. A l'inverse, lorsque ce taux de NADH/NAD⁺ est faible, la lactate déshydrogénase convertissant le pyruvate en acide lactique est réprimée. La mesure de l'ORP peut donc être proposée afin de compléter les informations relatives aux caractéristiques technologiques de la fermentation lactique.

4.4 La modulation de l'ORP

Il existe diverses voies et mécanismes qui permettent de réguler l'ORP. Les cinétiques de modulations de l'ORP peuvent permettre d'assigner taxonomiquement des espèces de BL (Brasca et al., 2007). De plus, différentes cinétiques de modulation de l'ORP peuvent exister entre les souches d'une même espèce (Morandi et al., 2016; Tachon et al., 2010). Des fermentations réalisées sur du lait avec des monocultures de *Lactococcus*, de *S. thermophilus* et de *L. delbrueckii* ont montré que l'ORP pouvait permettre, au même titre que le pH, de différencier ces souches (Cachon et al., 2002). Ces différences montrent que les BL ont des systèmes de modulation de l'ORP différents (Morandi et al., 2016).

Certaines propriétés peuvent dépendre de l'ORP. L'ORP extracellulaire peut influencer le catabolisme de la phénylalanine, de la leucine et de la méthionine comme chez *L. lactis* (Kieronczyk et al., 2006). Des propriétés antioxydantes ont aussi été retrouvées dans des jus de soja fermentés par des bactéries lactiques (Wang et al., 2006).

Enfin, la connaissance de la capacité des BL à modifier l'ORP pourrait permettre de prédire l'évolution d'écosystèmes microbiens : i. certaines flores de contamination comme *Pseudomonas* utilisent l'oxygène comme substrat (Stanborough et al., 2018). ii. la pyruvate oxydase produite par certaines BL conduit à la formation de peroxyde d'hydrogène qui peut avoir un effet antagoniste contre certaines flores (Kullisaar et al., 2002). iii. l'ORP pourrait également aider à déterminer quelles flores prolifèrent au cours de l'affinage des fromages (Boucher et al., 2006).

4.5 Le stress oxydant des BL

Les bactéries peuvent rencontrer et produire diverses molécules réactives dans leur environnement dont des molécules oxydantes (H₂O₂, O₂ et HO[•]). *L. lactis* et divers *Lactobacilli* sont, par exemple, capables de produire du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Ito et al., 2003; Kovachev, 2018). Ces molécules oxydantes peuvent dégrader les structures des cellules, induire des mutations au niveau de l'ADN et limiter l'activité des protéines. Les BL disposent alors d'enzymes qui permettent de réduire des molécules oxydantes de manière à éliminer leurs inhibitions. La NADH oxydase catalyse par exemple la réaction d'oxydation du NADH en NAD⁺ en réduisant du dioxygène en eau.

La membrane cytoplasmique des BL constitue l'interface de la cellule avec le milieu extérieur. Elle régule les flux de protons et de métabolites afin de maintenir l'homéostasie du cytoplasme. La membrane est en première ligne lors de stress extérieurs dont l'oxydation fait

partie. Le stress oxydant des lipides de la membrane entraîne la formation d'aldéhydes, d'alcanes, de cétones, d'époxydes et d'acides gras polyinsaturés (AGPI). Ces derniers, les AGPI fluidifient la membrane. Cette fluidification peut modifier l'activité ATPasique de la membrane et le flux de protons tels que chez *L. plantarum* (Ouvry et al., 2002). Cette fluidification peut aussi entraîner la perte d'activité des transporteurs et potentiellement limiter la division cellulaire.

4.6 Le métabolisme de modulation du potentiel d'oxydo-réduction chez les BL

Les accepteurs d'électrons peuvent être réduits à l'intérieur et à l'extérieur des cellules par diverses déshydrogénases. La pyruvate et la lactate déshydrogénase, qui forment du lactate, sont les enzymes de réduction majeures chez les bactéries lactiques mais l'alcool déshydrogénase ou l'acétaldéhyde déshydrogénase peuvent aussi être impliquées. Les quinones, le glycérol-3-phosphate, le nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺), la thioredoxine et le duo glutaredoxine/ glutathion sont d'autres accepteurs d'électrons communs chez les BL. Le fumarate, le malate et certains sucres peuvent aussi être utilisés par les BL comme accepteurs d'électrons (Hansen, 2018).

Lorsque les accepteurs d'électrons sont réduits à l'intérieur des cellules, le flux membranaire de protons augmente tels que chez *E. coli* et *L. plantarum* (Ouvry et al., 2002; Riondet et al., 1999). Certains systèmes situés sur la membrane ou la paroi cellulaire réduisent des composés à l'intérieur des cellules et relâchent des protons directement à l'extérieur.

4.7 Des accepteurs d'électrons des BL ; la glutaredoxine et la thioredoxine

Comme présenté précédemment, la méthionine, la cystéine, le glutamate et l'histidine permettent de moduler l'ORP via la formation de molécules qui tamponnent l'ORP (Figure 9). Les fonctions thiol (-SH) de la cystéine et thiométhyl (-SCH₃) de la méthionine rendent ces molécules réactives avec les molécules oxydantes. Ces molécules réactives peuvent réagir pour former des ponts disulfures (S-S), s'oxyder irréversiblement ou se stabiliser avec la thioredoxine ou la glutaredoxine. La glutaredoxine et la thioredoxine sont les principales molécules qui permettent de réguler l'ORP des BL. La glutaredoxine et la thioredoxine sont respectivement constituées de méthionine et de cystéine (Loi et al., 2015).

L'avantage de la glutaredoxine et de la thioredoxine tient au fait qu'elles peuvent être réversiblement oxydées ou réduites (Figure 9). La thioredoxine peut être directement réduite via une thioredoxine réductase qui dépend de la présence de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH). La glutaredoxine est recyclée par l'intermédiaire de 2 glutathions qui s'oxydent et qui peuvent être réduits par la glutathion réductase. Ces 2 mécanismes qui remplissent la même fonction permettent d'améliorer la résistance au stress oxydatif dans les milieux appauvris en l'un de ces composés. La présence d'au moins l'un de ces 2 mécanismes est essentiel à la survie de la cellule en présence de molécules oxydantes

(Ezraty et al., 2017). Cependant, comment sont régulées les activités de la glutaredoxine et de la thioredoxine impliqués dans la modulation de l'ORP lorsque la méthionine et la cystéine ne sont pas limitantes ?

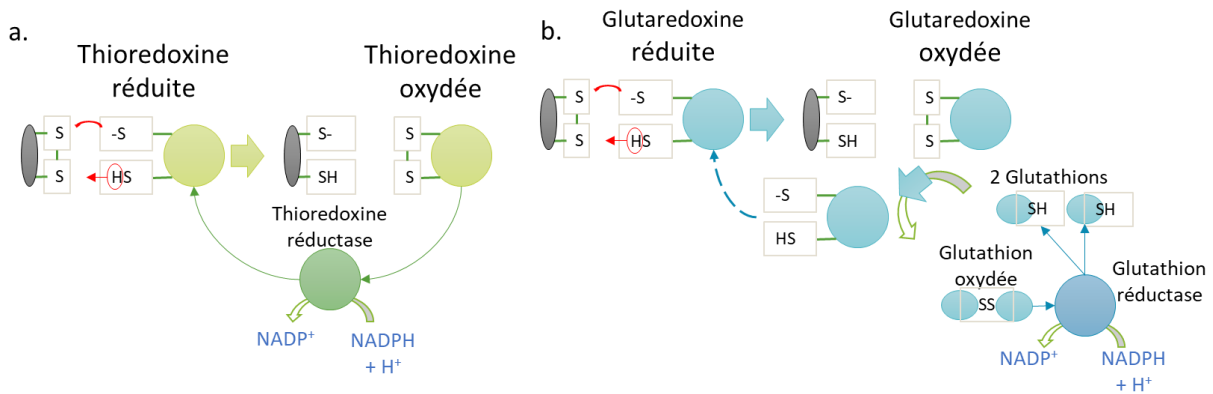


Figure 9. Mécanisme de réduction d'une molécule oxydante par (a) l'action de la thioredoxine et sa régénération par la thioredoxine réductase en présence de NADPH et (b) par l'action de la glutaredoxine réduite par 2 glutathions régénérés par la glutathion réductase. (repris de Ezraty et al., 2017)

4.8 Le métabolisme de modulation de l'ORP via la glutaredoxine et de la thioredoxine

Le métabolisme de modulation de l'ORP est régulé au niveau transcriptomique. Les capteurs et leurs localisations dans la cellule sont aussi variés que les systèmes de modulation de l'ORP. Ils impliquent des cofacteurs actifs au niveau de l'oxydoréduction comme l'hème, les flavines, les pyridines nucléotides comme l'adénosine ou la nicotinamide et les acides aminés soufrés. Le régulateur PerR chez *L. casei* ou *L. lactis* peut par exemple induire l'expression d'hydro-péroxydases et d'oxydoréductases (Papadimitriou et al., 2016). De même, *ohrA*, *spxA* et *poxB* perçoivent le stress oxydatif via des cystéines et contrôlent l'expression d'hydro-péroxydases et d'oxydoréductases comme la thioredoxine chez *L. plantarum* (Green and Paget, 2004; Papadimitriou et al., 2016). Le système Rex présent chez certains *Streptococcus* et *Lactobacillus* est quant à lui sensible au taux de NADH/NAD⁺ (Yang et al., 2019). Le NADH et le NAD⁺ ont une forte affinité et sont en compétition pour se lier avec Rex, mais le NADH fait perdre l'affinité de Rex pour l'ADN. Cette perte d'affinité réprime ainsi l'expression de cytochromes-bd oxydoréductase ou d'aldéhyde-alcool déshydrogénase. Ces voies et systèmes de régulation peuvent être regroupés en systèmes qui réagissent directement avec les molécules oxydantes et en systèmes qui réagissent à l'adaptation du métabolisme face aux modifications de l'environnement extérieur comme l'équilibre NADH/NAD⁺.

Globalement, il est clair, au vu de la diversité et du nombre de régulateurs, que ces éléments sont cruciaux à la survie des BL. Ils montrent d'ailleurs que les bactéries s'adaptent aux modifications de l'environnement. Une part importante des métabolismes de modulation

a d'ailleurs lieu au niveau transcriptionnel. Il reste cependant à mettre des liens entre ces différentes voies et systèmes de régulation. Or, comme présenté dans plusieurs études (Alwazeer, 2020; Alwazeer et al., 2020; Hansen, 2018), le contrôle de l'ORP des bactéries lactiques responsables des fermentations alimentaires est peu étudié. Il peut pourtant avoir un rôle important sur le procédé de fermentation.

E. Adaptation et diversité des BL en fermentation

Comme présenté précédemment, les BL sont diverses en termes de métabolisme.

Certains phénotypes sont spécifiques de genres et/ou d'espèces. Les phénotypes de divers espèces sont recensés dans le Bergey's (Vos et al., 2009). Le Bergey's décrit les caractéristiques morphologiques et de pigmentation des colonies, présente les conditions de croissance au niveau physico-chimique et nutritionnel, et présente aussi la physiologie et le métabolisme des espèces de BL, les génomes par espèce, la phylogénie, la pathogénicité et l'écologie de ces espèces. Ces caractéristiques sont en revanche souvent décrites dans une condition de culture. Comme le métabolisme des BL s'adapte aux conditions environnementales, une part de leur comportement peut se révéler peu prédictible lors de conditions spécifiques de croissance. C'est d'ailleurs ainsi que des souches évoluent.

Les caractéristiques des souches sont donc variables au sein d'une espèce. Le Bergey's donne des intervalles de confiance pour chaque phénotype (Annexe A). Il a été montré que des BL d'origine laitière ont a priori un métabolisme plus adapté pour fermenter une matrice laitière mais des BL de diverses origines s'adaptent bien à d'autres matrices et à d'autres conditions spécifiques de fermentation (Corbo et al., 2017).

La grande diversité des BL est donc une grande richesse lorsque l'on veut fermenter une matière première.

F. Intérêt des levains multi-souches

Les communautés/consortia/cocultures de la plupart des aliments fermentés sont constituées de plusieurs souches de microorganismes, ce qui leur permet d'avoir des fonctions technologiques (Smid and Lacroix, 2013), nutritionnelles (Timmerman et al., 2004) et organoleptiques (Ayad et al., 2001; McAuliffe et al., 2019) plus diverses et d'une plus grande stabilité dans le temps face aux variations de l'environnement (Smid and Lacroix, 2013).

Les BL ont en effet une croissance rapide avec un rendement énergétique faible. Les voies métaboliques des BL sont d'ailleurs souvent incomplètes. Les BL présentent souvent des auxotrophies et sont de ce fait peu adaptables d'où l'intérêt de la sélection et de l'utilisation de levains multi-souches (Canon et al., 2020c; Kreft et al., 2020). L'utilisation de cocultures

microbiennes apparaît comme une solution en écologie synthétique. Elle permet de faire réaliser des tâches plus complexes (multi-fonctionnalisation) et de manière plus stable (résilience) (Brenner et al., 2008). La présence de divers microorganismes permet d'assurer une fermentation plus robuste aux variations de l'écosystème (Smid and Lacroix, 2013). En plus de permettre d'associer des fonctionnalités spécifiques, la mise en coculture de plusieurs souches de BL peut leur permettre d'accroître leurs capacités fermentaires, comme lors de la fermentation du yaourt par *S. thermophilus* et *L. delbrueckii* (Sieuwerts, 2016). Cependant, du fait du manque de connaissance en écologie microbienne, l'utilisation et le développement de levains multi-souches s'avèrent complexes et difficiles à maîtriser. L'étude du comportement de levains multi-souches est donc d'intérêt afin d'améliorer et optimiser la fermentation de nouveaux aliments tels que les jus végétaux.

En effet, de nombreuses interactions peuvent entrer en jeu lorsque plusieurs souches sont mises dans un même milieu.

G. Les interactions bactéries-bactéries

Lorsque des bactéries évoluent dans un même milieu, elles peuvent interagir selon différents mécanismes. Les bactéries modifient le milieu dans lequel elles évoluent. On parle alors d'un écosystème. La modification de cet écosystème par une souche bactérienne peut avoir un effet sur elle-même et les autres souches présentes dans le même écosystème. Il s'agit d'interactions dites indirectes. A l'inverse, des bactéries peuvent rentrer en contact. Ce contact cellule-cellule est susceptible d'activer des récepteurs situés à la surface des cellules ou bien d'améliorer l'échange de métabolites. Il s'agit alors d'une interaction directe. La science qui étudie l'ensemble des interactions qui ont lieu entre des bactéries et leur écosystème est l'écologie.

En écologie, les interactions peuvent avoir un impact néfaste, une inhibition, sur l'une ou les autres souches impliquées. On peut parler d'amensalisme lorsqu'une souche a un retour négatif et d'antagonisme lorsque les deux souches ont un retour négatif. Les BL peuvent avoir un impact bénéfique sur les autres souches impliquées. On peut parler de commensalisme lorsqu'une souche a un retour positif et de mutualisme lorsque les deux souches ont un retour positif. Enfin, les BL peuvent avoir une interaction qui est bénéfique pour une souche et néfaste pour l'autre. On parle alors de parasitisme. Ces différentes interactions écologiques sont présentées ci-dessous (Figure 10, Faust and Raes, 2012).

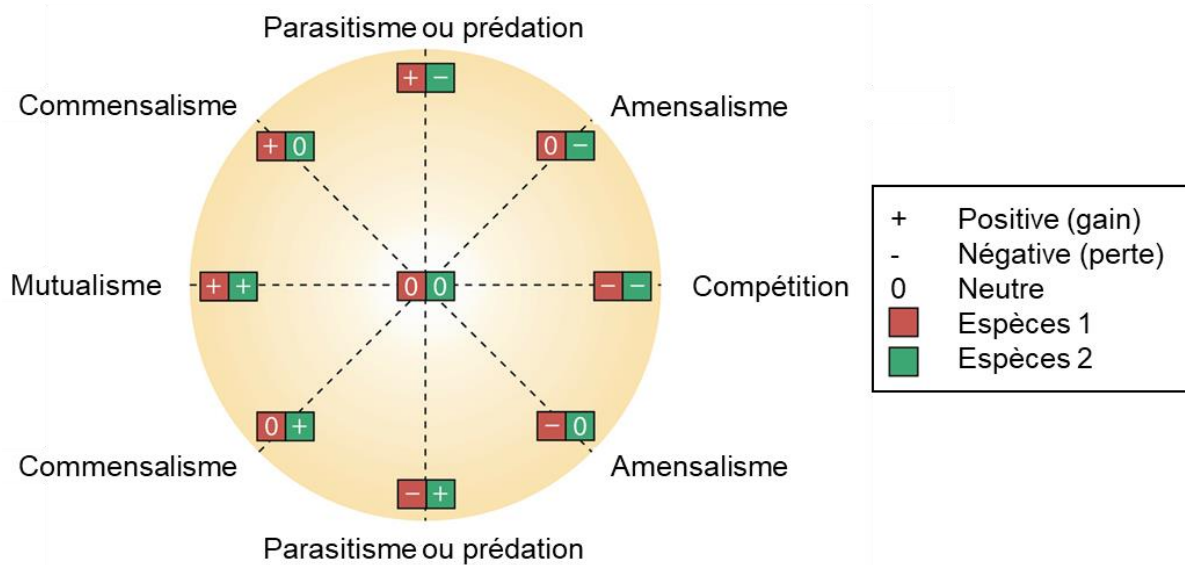


Figure 10. Types d'interactions écologiques entre deux espèces en cocultures. Chaque espèce peut obtenir un gain (+), une perte (-) ou avoir un retour neutre (0) de sa mise en coculture avec une autre espèce (Faust and Raes, 2012, Sime-Ngando et al., 2018).

1 L'amensalisme et l'antagonisme

Ce type d'interaction peut provenir de la production de métabolites par une BL qui est néfaste uniquement pour les autres BL et sans effet pour elle-même. L'acidification de l'écosystème par une BL et la production de bactériocines peut par exemple être responsable d'amensalisme (García et al., 2017). La production de peroxyde d'hydrogène pourrait également inhiber la croissance de BL (Kovachev, 2018; Zhai et al., 2020). L'antagonisme ou compétition est en revanche une interaction qui provient d'un phénomène qui est néfaste pour les deux bactéries. Lorsqu'un substrat nécessaire au métabolisme des deux bactéries (par ex. le glucose) devient limitant, un phénomène de compétition pour ce substrat se met en place. Ce type d'interactions est néfaste à la croissance des deux microorganismes qui doivent alors se partager le substrat limitant (Oliver Harlé et al., 2020). En fermentation lactique, les BL peuvent produire de l'acide lactique, de l'acide acétique et de l'éthanol qui peuvent être néfastes pour elle-même et les autres souches de l'écosystème (Frey and Hubert, 1993).

2 Le commensalisme, le mutualisme

Une interaction de commensalisme ou de mutualisme peut faire intervenir la production ou la libération de métabolites bénéfiques aux bactéries. La production d'acide lactique ou la protéolyse peuvent contribuer à la croissance d'autres bactéries. C'est par exemple le cas dans la fermentation de l'emmental ; l'acide lactique et les peptides libérés par des BL participent à la croissance de *Propionibacterium freudenreichii* (Fröhlich-Wyder et al., 2017). La consommation de métabolites inhibant la croissance d'une autre bactérie peut également

être considérée comme une interaction de commensalisme du fait de la levée d'inhibition. C'est par exemple le cas lorsqu'une BL consomme de l'oxygène néfaste pour une autre bactérie strictement anaérobie. Une autre forme de mutualisme, la syntrophie a lieu quand la consommation des métabolites produits par une BL est bénéfique aux deux BL (Canon et al., 2020c). Une interaction de mutualisme entre deux BL peut provenir de diverses interactions de commensalisme. Par exemple en fermentation du yaourt, *L. delbrueckii* libère des AA par protéolyse bénéfiques à *S. thermophilus* qui produit de l'acide formique, de l'acide folique et du glutathion bénéfiques à *L. delbrueckii* lors de leur coculture (Figure 11) (Courtin and Rul, 2004; Sieuwerts, 2016). Une coopération est une autre forme de mutualisme (Rodríguez Amor and Dal Bello, 2019). Il s'agit alors du cas où les bactéries partagent le même phénotype qui bénéficie aux deux bactéries. Par exemple, l'organisation en 'patch' de populations de *Bacillus subtilis* leur permet de bénéficier de leur phénotype commun et induit une meilleure croissance (Ratzke and Gore, 2016).

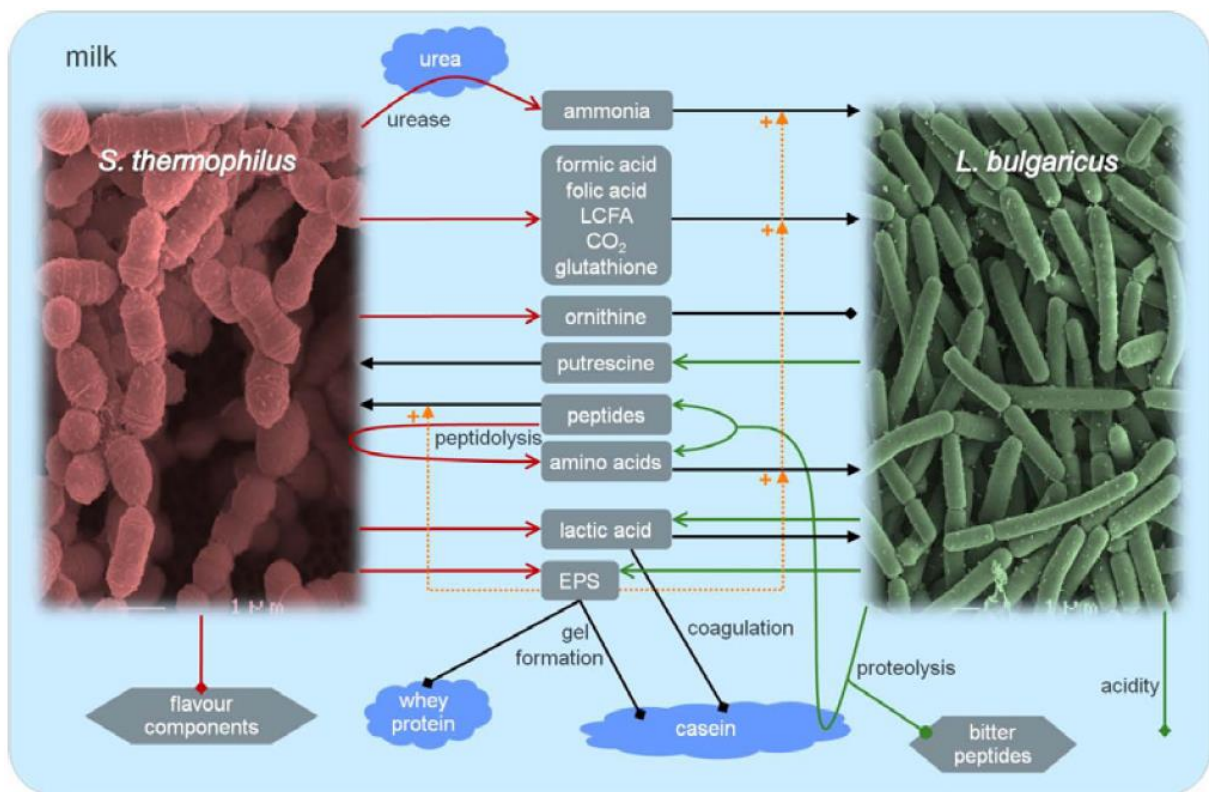


Figure 11. Représentation des interactions entre *S. thermophilus* et *L. delbrueckii* dans la fermentation du yaourt et les effets sur les caractéristiques du produit. Les lignes pointillés indiquent l'hypothèse que les EPS facilitent les échanges métaboliques.

→ : production ou catalyse ; : → effet positif du métabolite

—● : effet négatif ; —◆ : effet neutre ou a confirmé. (Sieuwerts, 2016)

3 Le parasitisme

On peut parler de parasitisme lorsqu'une souche a un retour négatif et l'autre un retour positif (Figure 10). Les métabolites produits par une BL peuvent être néfastes pour une autre qui en condition de stress peut produire des métabolites bénéfiques pour la première BL. Une interaction d'antagonisme peut devenir du parasitisme dès lors qu'une BL conduit à l'extinction d'une autre BL et si elle peut alors bénéficier des métabolites libérés par la lyse de la cellule éteintes (Tannock, 2004).

Les interactions positives sont l'ensemble des interactions qui ont un effet positif (recherché) sur la fermentation ou les qualités de l'aliment fermenté. L'ensemble des interactions décrites dans cette partie peuvent avoir un effet positif sur la fermentation ou les qualités de l'aliment fermenté. L'ensemble des d'interactions décrites peuvent donc être d'intérêts dans cette thèse.

H. La sélection des BL

Comme présenté précédemment, les BL sont diverses. Cela met en exergue l'intérêt de la sélection. La sélection de BL peut se baser sur les meilleures caractéristiques définies a priori pour une espèce donnée (par exemple par la bibliographie). La mise en œuvre des souches ou isolats de BL est cependant essentielle afin de vérifier les caractéristiques. Des tests et essais sont donc nécessaires. Les tests et essais présentent cependant un coût matériel et de main d'œuvre. Des stratégies de sélection peuvent donc être mises en place afin de réduire ces coûts.

Une première stratégie de sélection consiste à réaliser des tests successifs de sélection. Chaque test doit mettre en évidence une ou des caractéristiques recherchées et doit permettre de sélectionner des souches. Pour des caractéristiques quantifiables, des seuils doivent donc être définis afin de sélectionner les souches qui passent le test. Chaque isolat qui passe un test, est sélectionné pour le prochain test. Chaque test réduit ainsi le nombre d'isolats de BL à tester au prochain test. Le coût du prochain test est par conséquent réduit. Plus le nombre de caractéristiques recherchées est important, plus le nombre de tests devient important sinon plus restrictifs. Un test plus restrictif signifie qu'un taux plus faible d'isolats de BL passera le test. Plus les caractéristiques recherchées sont exigeantes, plus les tests sont restrictifs et plus le nombre d'isolats testés doit être important afin d'augmenter la probabilité de trouver des souches répondants aux caractéristiques recherchées. Cette stratégie de sélection par tests successifs nécessite de classer préalablement les caractéristiques par ordre d'importance et du coût nécessaire pour les tester. Il conviendra dans les faits d'adapter les caractéristiques recherchées (les critères de sélection) aux caractéristiques réelles des isolats et des tests réalisables.

Une seconde stratégie consiste à réaliser un levain associant les caractéristiques de plusieurs isolats. Comme présenté par Smid et Lacroix, 2013, les fonctionnalités d'une fermentation réalisée en coculture sont plus riches qu'en monoculture. Les associations de souches peuvent en effet permettre des complémentarités métaboliques (Sieuwerts et al., 2008). Les différents tests peuvent alors être réalisés en parallèles. Un criblage supplémentaire, des essais d'associations (des cocultures), est alors nécessaire puisque les interactions entre les bactéries peuvent cependant être neutres, positives ou négatives et les fonctions peuvent alors être équivalentes, supérieures ou inférieures aux fonctions des souches seules. Ce criblage supplémentaire peut être conséquent selon les fonctions à associer. Des connaissances sur l'association et les interactions entre BL permettrait d'optimiser le nombre d'essais à réaliser.

Dans cette thèse un mixte des deux approches a été utilisé. La stratégie de criblage des BL utilisée est présentée en partie II du Chapitre 2.

IV. La fermentation lactique du jus de soja

A. Diversité des études sur la fermentation lactique du jus de soja

J'ai répertorié dans la bibliographie 72 publications traitant de la fermentation de jus de soja. Les jus de soja de ces études sont de compositions variables et présentent des teneurs en sucres totaux entre 1 et 35 g/L, en protéines entre 4 et 98 g/L et des pH variant de 5,5 à 8,2 (Tableau 2, Annexe B).

Les jus utilisés dans 28/72 publications contiennent plus de 20 g/L de sucres. Ces jus contiennent pour la plupart des sucres ajoutés car la teneur en sucre des jus de soja est souvent limitante pour sa fermentation. Seules les données portant sur des jus de soja avec des teneurs en sucres totaux représentatives de pur jus de soja (<20 g/L) sont reprises dans la suite de cette revue bibliographique car le jus traité dans ma thèse était sans sucres ajoutés. Cela représente 44 publications portant sur 181 souches de BL. Chaque étude compare en moyenne les données de 4 souches de BL (avec de 1 à 36 souches par étude). Ces souches se répartissent dans 29 espèces appartenant aux familles des *Lactobacillaceae*, *Streptococcaceae* et *Leuconostocaceae*. Les données des souches de *Bifidobactéries*, *Propionibacterium* et *Bacillus* ont été exclues car non étudiées au cours de mon doctorat. D'après la littérature, les espèces les plus étudiées sont *L. acidophilus* (34), *L. plantarum* (27), *S. thermophilus* (22) et *L. delbrueckii* (23) et une dizaine de souches de *L. rhamnosus* (15) et *L. casei* (13). Concernant les autres espèces, seules quelques souches ont été étudiées. Par

ailleurs, les données de fermentation de 39 associations de souches de BL d'espèces différentes en jus de soja ont également été publiées.

Enfin, les fermentations ont été réalisées dans des conditions diverses. Les jus de soja, inoculés avec 10^4 à 10^7 UFC/mL, ont été fermentés pendant 4 à 48 h et à des températures de fermentation différentes, parfois pour une même espèce. Deux tiers des souches de *S. thermophilus* et *L. delbrueckii* ont par exemple été testées à 37°C contre un tiers à 41/45°C. Pour *L. plantarum*, un tiers des souches a été testé à 30°C, un tiers à 37°C et un tiers à 41/42°C (Annexe B).

En raison de la diversité de jus de soja et des conditions de fermentation très variables d'une étude à l'autre, il est difficile de comparer les fermentations entre elles, et donc les propriétés des souches utilisées. Dans les paragraphes suivants, une synthèse des résultats de ces publications est proposée. A la fin de la partie suivante reflétant l'état des connaissances sur la fermentation lactique du jus de soja, un état des connaissances sur le métabolisme des BL en fermentation de jus de soja est présenté. Il faut cependant préciser que dans les publications analysées dans cette dernière partie, les jus de soja mis en oeuvre étaient supplémentés en glucose ou saccharose, rendant les résultats non portables à mon étude en pur jus de soja.

Tableau 2 : Caractéristiques des fermentations lactiques de jus de soja répertoriées dans la bibliographie. Vert : Moyennes et médianes des compositions et des pH des jus de soja avant fermentation. Orange : Médianes des taux d'inoculation, des durées de suivi des fermentations et des températures de fermentation. Jaune : Nombre moyen de souches testées par espèce et par publication (Détails en Annexe B).

Composition (en g/L)		pH	Taux d'inoculation médian	Nombre moyen de souches testées par espèce par publication
moyenne - médiane		moyen		
Saccharose	10±2 - 6	6,7±0.1	10 ⁶ UFC/mL	
Raffinose	1,6±0,4 - 0,8	pH médian	Durée médiane des fermentations	2
Stachyose	4,3±0,6 - 4,0	6,6	24 h	Nombre moyen de souches testées par publication
Protéines	36±3 - 33		Températures médianes des fermentations	
Lipides	17±2 - 18		37°C	

B. Caractéristiques de fermentation des BL en jus de soja

1 L'acidification

Comme présenté dans la partie III (La fermentation lactique), un des paramètres clé est l'acidification (vitesse et pH atteint en fin de fermentation). Le critère le plus étudié en jus de soja est donc l'acidification. Les données d'acidification de 170 souches de BL ont été rassemblées dans le Tableau 3. Toutes espèces confondues, les BL acidifient en moyenne le jus de soja d'un pH 6,7 à un pH 4,9.

Les données publiées indiquent que 14% des BL ne permettent pas d'acidifier le jus de soja à un pH inférieur à 6,0. Les capacités acidifiantes des BL sont variables. Parmi les espèces les plus étudiées, 29% des souches de *L. delbrueckii* (5/17) ne permettent pas d'acidifier les jus de soja à un pH inférieur à 6 contre 19% des souches de *L. acidophilus* (5/27), 17% des souches de *S. thermophilus* (3/18), 13% des souches de *L. rhamnosus* (2/15) et 8% des souches de *L. casei* (1/12). En revanche, la totalité des souches de *L. plantarum* acidifient le jus de soja à un pH inférieur à 6 (27/27). Parmi ces espèces, les souches de *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *S. thermophilus*, *L. rhamnosus* et *L. plantarum* acidifient respectivement les jus de soja à des pH moyens de 5,5, 4,9, 4,8, 4,7, 4,5 et 4,4 (Tableau 3). Le pH atteint en coculture (4,8) n'est pas significativement inférieur au pH atteint en monoculture (4,9). En résumé, l'ensemble de ces travaux montre que les capacités des BL à acidifier le jus de soja est à la fois dépendant de l'espèce et de la souche. Mais en raison de la variabilité des jus de soja, il est difficile de généraliser ces résultats.

2 Les caractéristiques de croissance des BL en jus de soja

Les caractéristiques de croissance des BL sont généralement représentatives de leur capacité à assurer une fermentation optimale (Othman et al., 2017). La croissance des BL, et notamment la population maximale atteinte est donc un autre critère important à prendre en compte en fermentation alimentaire. Les données de croissance de 114 souches ont été répertoriées (Tableau 4). La population maximale moyenne atteinte par toutes les souches en jus de soja est de 10^8 UFC/mL. Le niveau de population de *L. rhamnosus* est supérieur à ceux de *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. fermenti* et des cocultures. Comme pour les données d'acidification, en raison de la variabilité des études, il est difficile de généraliser ces résultats.

Tableau 3. Capacités d'acidification moyennes par espèce de BL en jus de soja. n : nombre de données d'acidification répertoriées dans la bibliographie par espèce. n pH <6 : nombre de données indiquant un pH final atteint en jus de soja inférieur à 6, pH : pH moyen atteint par espèce. Les lettres données dans la colonne pH indiquent si les pH sont différents selon un test de Tukey réalisé avec un risque alpha de 5%. Données extraites de la bibliographie (Annexe B).

Espèce	n	n pH <6	pH	
<i>L. plantarum</i>	27	27	4.4	b
<i>L. rhamnosus</i>	15	13	4.5	ab
<i>S. thermophilus</i>	18	15	4.7	ab
<i>L. casei</i>	12	11	4.8	ab
Cocultures	31	29	4.8	ab
<i>L. acidophilus</i>	27	22	4.9	ab
<i>L. delbrueckii</i>	17	12	5.4	ab
<i>L. sakei</i>	7	7	5.3	ab
<i>P. parvulus</i>	6	6	5.7	ab
<i>L. fermentum</i>	5	4	5.1	ab
<i>L. coryniformis</i>	3	3	5.3	ab
<i>L. helveticus</i>	3	2	4.8	ab
<i>L. lactis</i>	3	2	5.9	a
<i>P. ethanolidurans</i>	3	3	4.7	ab
<i>L. curvatus</i>	2	2	4.5	ab
<i>L. fermenti</i>	2	0	5.9	ab
<i>L. mesenteroides</i>	2	2	4.5	ab
<i>L. paracasei</i>	2	2	4.5	ab
<i>L. pentosus</i>	2	2	4.6	ab
<i>Lactobacillus</i>	2	2	4.8	ab
<i>E. durans</i>	1	1	4.4	
<i>L. alimentarius</i>	1	1	5.4	
<i>L. brevis</i>	1	0	6.4	
<i>L. buchneri</i>	1	1	5.8	
<i>L. cellobiosis</i>	1	1	4.8	
<i>L. citrovorum</i>	1	1	6.2	
<i>L. farciminis</i>	1	1	4.1	
<i>L. gasserii</i>	1	1	4.5	
<i>L. johnsonii</i>	1	1	4.2	
<i>L. paraplantarum</i>	1	1	4.2	
<i>L. reuteri</i>	1	0	8.2	
<i>L. zeae</i>	1	1	3.9	

Tableau 4. Populations maximales moyennes atteintes par espèce de BL en jus de soja. n : nombre de données de population de BL répertoriées dans la bibliographie par espèce. Population max : population maximale moyenne atteinte par espèce de BL. Les lettres données dans la colonne des populations indiquent si les populations sont différentes selon un test de Tukey réalisé avec un risque alpha de 5%. Données extraites de la bibliographie (Annexe B).

Espèce	n	Population max en UFC/mL	
Cocultures	19	10 ⁸	b
<i>L. acidophilus</i>	18	10 ⁸	b
<i>L. plantarum</i>	17	10 ⁸	ab
<i>S. thermophilus</i>	16	10 ⁸	ab
<i>L. delbrueckii</i>	15	10 ⁸	b
<i>L. casei</i>	10	10 ⁹	ab
<i>L. rhamnosus</i>	10	10 ⁹	a
<i>L. fermentum</i>	4	10 ⁸	ab
<i>L. helveticus</i>	3	10 ⁸	ab
<i>L. lactis</i>	3	10 ⁸	ab
<i>L. fermenti</i>	2	10 ⁸	b
<i>L. mesenteroides</i>	2	10 ⁸	ab
<i>L. paracasei</i>	2	10 ⁹	ab
<i>L. pentosus</i>	2	10 ⁹	ab
<i>E. durans</i>	1	10 ⁹	
<i>L. brevis</i>	1	10 ⁸	
<i>L. cellobiosis</i>	1	10 ⁹	
<i>L. citrovorum</i>	1	10 ⁸	
<i>L. curvatus</i>	1	10 ⁸	
<i>L. gasserii</i>	1	10 ⁹	
<i>L. johnsonii</i>	1	10 ⁷	
<i>L. paraplantarum</i>	1	10 ⁹	
<i>L. reuteri</i>	1	10 ³	
<i>L. zeae</i>	1	10 ⁹	

3 Le catabolisme des sucres du jus de soja

Comme présenté dans la partie III.D.1 (Le métabolisme carboné), le catabolisme des sucres permet aux bactéries lactiques de produire de l'énergie. Les sucres du jus soja sont constitués de 50% de saccharose, 40% de stachyose et 10% de raffinose (partie II de ce chapitre). Les BL sont capables de produire différentes enzymes qui peuvent cataboliser les sucres du jus de soja. Les α -galactosidases produites par certaines BL hydrolysent les liaisons α -1,6 du raffinose et du stachyose (LeBlanc et al. 2004; Yoon et Hwang 2008). Ces hydrolyses libèrent des molécules du glucose, fructose et galactose qui peuvent également être bénéfiques à la fermentation. Cette partie présente le catabolisme de ces sucres spécifiques au jus de soja.

3.1 Le catabolisme du saccharose

Le saccharose est la source la plus abondante de carbone du soja (partie II de ce chapitre) mais aussi de nombreux fruits, céréales et autres légumineuses. Les BL du genre *Lactobacillus* présentent divers enzymes impliqués dans le transport et le catabolisme du saccharose. Trois voies du catabolisme du saccharose ont été décrites à ce jour : i. l'hydrolyse extracellulaire par une glucane-, fructane- ou lévane-sucrases (enzymes des bactéries lactiques qui hydrolysent les liaisons β -1,2 du saccharose). ii. l'import couplé à la phosphorylation réalisée par un système PTS (système phosphotransférase) suivi de l'hydrolyse par une (phospho-)fructo-furanosidase SacA/ScrB et iii. l'import réalisé par une perméase suivi d'une phosphorylation par la saccharose phosphorylase ou d'une hydrolyse par BfrA, SacA/ScrB (Figure 12, Gänzle et Follador 2012; Reid et Abratt 2005).

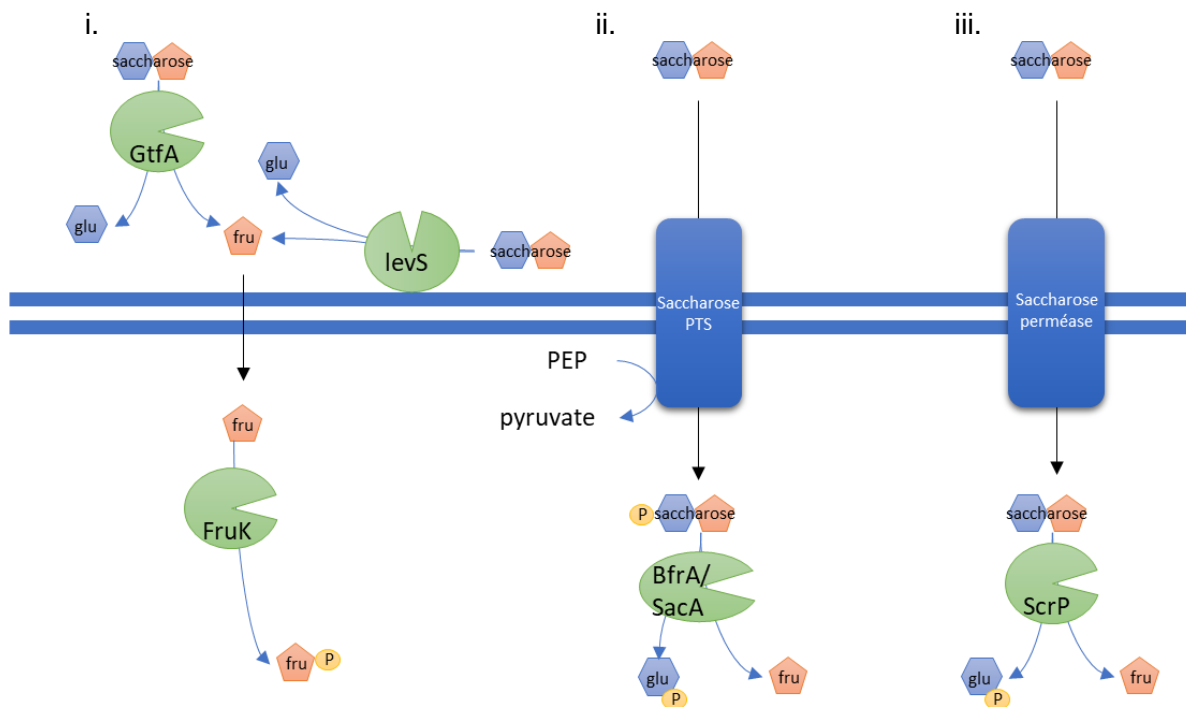


Figure 12. Les trois voies du catabolisme du saccharose des BL. Repris de Gänzle et Follador 2012. glu : glucose, fru : fructose i. GtfA : glycosyltransférase extracellulaire, LevS : levansucrase liée à la paroi cellulaire. Ces enzymes hydrolysent le saccharose en glucose et fructose ou transfèrent le fructose du saccharose à un oligosaccharide accepteur de fructose. FruK : fructokinase, phosphoryle un fructose en fructose-6-P ii. Saccharose PTS : phosphotransférase du saccharose. BfrA ou ScrB (*L. acidophilus*) et SacA (*L. plantarum*) : hydrolysent le saccharose-6-P en glucose-6-P et fructose. iii. ScrP : sucrose phosphorylase, hydrolyse et phosphoryle un saccharose en glucose-1-P et fructose.

3.2 Capacité des bactéries lactiques à cataboliser le saccharose

A l'exception de *L. brevis*, les 35 autres génomes étudiés par Gänzle et Follador 2012 comportaient au moins une de ces 3 voies du métabolisme du saccharose. La présence de plusieurs voies d'utilisation du saccharose chez certaines BL montre l'importance de ce catabolisme.

Les glucan- et fructan-sucrases (GtfA et LevS) sont peu fréquemment trouvées chez les *Lactobacillus* (1/38 dans Gänzle et Follador 2012).

Chez *L. plantarum* et *L. acidophilus*, le gène *sacA* et ceux codant pour le système PTS d'internalisation du saccharose sont souvent situés sur le même opéron. Le gène *sacA* peut cependant être trouvé dissocié du système PTS chez *L. acidophilus*, *L. casei* et *L. rhamnosus* (Gänzle and Follador, 2012; Reid and Abratt, 2005). Comme présenté en partie II de ce chapitre, la phosphorylation du saccharose est plus « rentable » énergétiquement que son hydrolyse puisque la phosphorylation du glucose peut faire intervenir un phosphate inorganique et ne nécessite alors pas la dépense d'un ATP. La sucrose phosphorylase n'est cependant présente que chez 39% des *Lactobacillus* étudiées dans Gänzle et Follador 2012.

3.3 La régulation du catabolisme du saccharose

L'expression des gènes codants pour des enzymes du métabolisme du saccharose est régulée par des régulateurs de transcription d'opérons particuliers. En présence de saccharose ou de fructo-oligosaccharides à chaîne courte, *i.e.* du raffinose, les opérons impliqués dans le catabolisme du saccharose, par exemple *sacAR*, *sacBK* ou *scrP* sont exprimés.

L'enzyme MrmR/SacR a été identifiée comme un régulateur de l'opéron du catabolisme du saccharose. Des mutants de *L. lactis* et *L. reuteri* ne produisant plus le facteur de transcription *sac* exprimaient constitutivement les gènes impliqués dans le catabolisme du saccharose en présence ou en absence de saccharose (Luesink et al., 1999; Teixeira et al., 2013).

En présence d'une source de sucre préférée au saccharose comme le glucose ou le maltose, le catabolisme du saccharose est réprimé, comme chez *L. plantarum* ou *L. lactis* (Andersson et al., 2005). Chez *L. reuteri*, le catabolisme du saccharose n'est cependant pas réprimé par la présence de glucose. Cela s'expliquerait par une adaptation spécifique de *L. reuteri* à son environnement (Teixeira et al., 2013).

3.4 Le catabolisme du raffinose et du stachyose.

Les liaisons α -1,6 du raffinose et du stachyose sont hydrolysables par l' α -galactosidase. L'activité optimale des α -galactosidase dépend du pH. Les α -galactosidases purifiées de *Lactobacillus* ont montré divers températures et pH auxquels l'activité était maximale, de 35°C à 45°C et du pH 5.5 au pH 8.0 (Bhatia et al., 2020; Garro et al., 1996; LeBlanc et al., 2004; Yoon and Hwang, 2008). L'activité de l' α -galactosidase de *L. curvatus* n'atteint cependant que 40% de son efficacité maximale à pH 6,0 (Yoon and Hwang, 2008). L'ajout de Mn^{2+} et de Mg^{2+} (1 mM) serait capable d'améliorer l'activité de l' α -galactosidase produite par *L. reuteri* CF2-7F mais la présence d'autres molécules pourrait en limiter son activité. L'inhibition par le

saccharose (Baú et al., 2015) ou les ions (Ca^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} ...) (Bhatia et al., 2020) a été rapportée.

Par ailleurs, toutes les BL n'ont pas la capacité à produire de l' α -galactosidase. L' α -galactosidase peut être codée par différents gènes : le gène *melA*, qui fait partie de l'opéron mélibiose, ou bien les gènes *agaSR*. Dans l'étude de Gänzle and Follador, 2012, 32/36 souches de BL étudiées possèdent le gène *melA*. Des données des génomes de 355 BL ont montré la présence des gènes codant pour une α -galactosidase dans 44 des 355 génomes (12%). Les espèces qui comportent davantage de souches avec un gène codant pour une α -galactosidase sont *L. casei* (9/32 – 28%), *L. johnsonii* (3/11 – 27%), *L. plantarum* (11/70 – 16%), *L. rhamnosus* (6/40 – 15%), *L. paracasei* (6/51 – 12%) et *L. gasseri* (3/26 – 12%) (Canon et al., 2020a).

La régulation de la biosynthèse de l' α -galactosidase peut dépendre des sucres présents dans l'environnement des BL. Des études ont montré que la production d' α -galactosidase était maximale avec du stachyose ou du raffinose comme unique source de carbone, et qu'elle pouvait aussi être induite avec du mélibiose et du galactose comme unique source de carbone mais qu'elle était réprimée en présence de sucrose, glucose ou fructose (Baú et al., 2015; Bhatia et al., 2020; Carević et al., 2016; Garro et al., 1996; Yoon and Hwang, 2008). Les ions Cu^{2+} , Zn^{2+} et Fe^{2+} (10 mM) peuvent inhiber la synthèse d' α -galactosidase, comme cela a été décrit chez *L. helveticus* (Bhatia et al., 2020; Han et al., 2014).

3.5 Données de la bibliographie du catabolisme du saccharose, du raffinose et du stachyose en jus de soja.

Les capacités de 39 souches de BL à cataboliser le saccharose, de 41 souches de BL à cataboliser le raffinose et enfin de 45 souches de BL à cataboliser le stachyose ont ainsi été analysées en jus de soja. En moyenne, 61% du saccharose (2,2 g/L), 52% du raffinose (0,5 g/L) et 52% du stachyose (1,2 g/L) des jus de soja est consommé.

Dans certaines études, la fermentation lactique permet de réduire la présence des oligosaccharides non-digestibles et des isoflavones du jus de soja (Champagne et al. 2010; Chien, Huang, et Chou 2006; Singh et Vij 2018).

À travers les données disponibles, aucune espèce représentée par plus d'une souche n'apparaît comme étant plus efficace que les autres pour cataboliser le saccharose, le raffinose ou le stachyose en jus de soja. Les sucres catabolisés en coculture ne sont pas non plus supérieurs aux sucres catabolisés en monocultures (Tableau 5).

Tableau 5 Données de la bibliographie sur le catabolisme des sucres du jus de soja par espèce de BL. sac : saccharose, raf : raffinose, sta : stachyose, n : nombre de données par espèce pour le sucre considéré, i : concentration moyenne initiale du sucre considéré dans le jus de soja (avant fermentation, en g/L), t : taux moyen de la concentration en sucre initiale consommée par espèce en jus de soja (en %), c : concentration finale consommée, moyenne par espèce, en jus de soja (en g/L). Données extraites de la bibliographie (Annexe B).

Espèce	n_sac	sac_i	sac_t	sac_c	n_raf	raf_i	raf_t	raf_c	n_sta	sta_i	sta_t	sta_c
<i>L. rhamnosus</i>	10	3.2	80%	2.5	10	1.3	60%	0.8	10	2.8	55%	1.4
Cocultures	10	5.4	42%	2.6	9	1.4	41%	0.6	9	5.1	42%	1.7
<i>L. casei</i>	7	3.0	56%	1.4	7	0.7	38%	0.4	7	1.2	42%	0.5
<i>L. plantarum</i>	5	2.7	89%	2.5	5	0.8	49%	0.4	5	1.7	62%	0.8
<i>S. thermophilus</i>	4	3.9	46%	1.5	5	0.8	36%	0.1	5	2.8	33%	0.4
<i>L. acidophilus</i>	3	2.0	29%	0.6	4	0.3	33%	0.1	7	1.6	30%	0.4
<i>L. helveticus</i>	2	6.0	70%	3.5	2	1.7	25%	0.3	2	6.2	18%	0.6
<i>L. delbrueckii</i>	2	2.1	60%	1.2	2	0.3	35%	0.1	2	0.3	38%	0.1
<i>L. cellobiosis</i>	1	4.8	100%	4.8	1	0.7	100%	0.7	1	3.9	35%	1.4
<i>L. curvatus</i>	1	5.1	100%	5.1	1	2.5	100%	2.5	1	4.0	100%	4.0
<i>L. paracasei</i>	1	6.5	100%	6.5	1	1.2	92%	1.1	1	4.0	98%	3.9
<i>L. mesenteroides</i>	1	5.1	86%	4.4	1	2.5	100%	2.5	1	4.0	100%	4.0
<i>L. johnsonii</i>	1	4.8	79%	3.8	1	0.2	50%	0.1	1	2.5	100%	2.5
<i>L. fermenti</i>	1	4.8	0%	0.0	1	0.7	100%	0.7	1	3.9	100%	3.9
<i>L. gasserii</i>	0				0				1	2.0	14%	0.3

4 Le système protéolytique des BL en jus de soja

Les BL peuvent présenter des auxotrophies pour 6 à 14 AA (Chapitre 1, III.2). Le système protéolytique des BL peut permettre de répondre aux besoins en AA des BL. Ce système comporte des protéinases de paroi, un système de transport des acides aminés et des peptidases intracellulaires. La capacité protéolytique des BL en jus de soja est présentée ci-dessous.

L'activité protéolytique des BL a majoritairement été étudiée sur les protéines du lait. Les données concernant la protéolyse des protéines du soja sont peu nombreuses. La protéolyse du soja (glycinine et β -conglycinine) a été analysée pour 12 souches appartenant aux espèces *S. thermophilus*, *L. helveticus*, *L. delbrueckii*, *L. paracasei*, *L. plantarum* et *L. reuteri* (Aguirre 2008), révélant la protéolyse préférentielle des β -conglycinines tandis que très peu de souches étaient capables d'hydrolyser les glycinines (Pescuma et al., 2013). De plus, l'hydrolyse des protéines du soja peut varier selon le milieu de fermentation. *L. reuteri* présentait une activité protéolytique 10 fois plus importante en milieu chimiquement défini qu'en MRS (Aguirre et al., 2008). Les peptides présents en milieu chimiquement défini pourraient être responsables de la modulation de l'activité protéolytique (Aguirre et al., 2014).

Les peptides libérés par l'hydrolyse des protéines du soja diffèrent selon les souches. *L. paracasei* CRL207 a provoqué une hydrolyse la plus importante des protéines du soja et a libéré uniquement des peptides hydrophiles en hydrolysant complètement la fraction glycinine (Aguirre et al., 2014).

En jus de soja, il a été montré que la protéase de *S. thermophilus* (PrtS) était impliquée dans la croissance bactérienne (Boulay et al., 2020). En effet, la souche LMD9 de cette espèce, mutée pour le gène PrtS, atteint un niveau maximal de population moindre que la souche sauvage. La mutation de ce gène empêche la protéolyse des protéines de soja de 62 kDa. PrtS est aussi l'enzyme responsable de la protéolyse des caséines du lait de vache chez *S. thermophilus*.

Trois d'études présentent des résultats quantitatifs de la protéolyse de BL en jus de soja. Il a été montré qu'après 24 h de fermentation, en moyenne 219 mg d'équivalent sérine sont libérés par mL (n = 13) (Donkor et al. 2007, Hati et al. 2014, Singh et Vij, 2017). Les données ne permettent cependant pas de conclure sur les capacités protéolytiques par espèces.

5 Les études du métabolisme des BL en fermentation de jus de soja

Plusieurs publications ont étudié le métabolisme des BL en jus de soja : deux publications décrivent le métabolisme de la souche *Lactocaseibacillus casei* Zhang (Wang et al., 2013, 2012), une publication décrit la biosynthèse de folate par la souche *Lactiplantibacillus plantarum* 4-3 (Liu et al., 2019), enfin, une étude présente les métabolismes azotés et carbonés de la souche de *S. thermophilus* LMD-9 pendant la fermentation de jus de soja (Boulay et al., 2020).

Les études sur *L. casei* Zhang ont comparé par transcriptomique et protéomique la phase de latence (2 h, pH 6,4, 10^7 UFC/mL), la fin de la phase de croissance (9,5 h, pH 5,2, 10^8 UFC/mL) et la phase stationnaire (14,5 h, pH 4,5, 10^9 UFC/mL) pendant la fermentation de jus de soja. Ce jus de soja était constitué de 60 g/L d'extrait sec et supplémenté avec 15 g/L de glucose. Ces comparaisons ont permis d'identifier 162 gènes induits en phase de croissance et 63 en phase stationnaire. Chez *L. casei*, plus de 30% des gènes induits étaient impliqués dans le métabolisme azoté et particulièrement dans la protéolyse, le transport de peptides et la biosynthèse d'histidine, de lysine et de méthionine. Ensuite, 10% des gènes DE chez *L. casei* provenaient du métabolisme carboné. Chez *L. casei*, le transport du glucose, le catabolisme du galactose et le métabolisme du pyruvate étaient différenciellement exprimés. Cela est en accord avec l'ajout de glucose. Des gènes de réponse au stress étaient également différenciellement exprimés par *L. casei* Zhang en jus de soja. Un système de régulation de la réponse adaptative permettait à *L. casei* Zhang de s'adapter à l'acidification du jus de soja et 5 gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant étaient différenciellement exprimés (Wang et al., 2012). Enfin, une induction des métabolismes des purines et des pyrimidines était également remarquée chez *L. casei* en jus de soja. Cela proviendrait du fait que le jus de soja contient peu de purines et pyrimidines.

L'étude de *S. thermophilus* LMD-9 a porté sur l'analyse de son protéome en phase de croissance (3 h, pH 6,4, $5 \cdot 10^8$ UFC/mL) en fermentation de jus de soja. Dans cette dernière étude, le jus contenait 24,6 g/L de sucres totaux, 36 g/L de protéines et 21 g/L de lipides. Chez *S. thermophilus* LMD-9, 328 protéines bactériennes ont été identifiées en fermentation du jus de soja. 19% des protéines identifiées concernaient le métabolisme et le transport des acides aminés. L'analyse a révélé la présence de la protéase de paroi PrtS et 11 transporteurs d'AA (AA polaires, *i.e.* lysine, arginine, aspartate, de l'acide glutamique, AA branchés, *i.e.* leucine, isoleucine, valine et de méthionine, sérine/thréonine, alanine et glutamine) et un transporteur d'oligopeptides (Ami). 5 des 12 peptidases intracellulaires du génome de *S. thermophilus* LMD-9 ont également été identifiées (PepB/F, PepN, PepV, PepQ et PepO). Des protéines des voies de biosynthèse de tous les AA exceptés l'histidine ont également pu être identifiés. Par ailleurs, l'ajout de lysine, d'AA soufrés (cystéine, sérine, méthionine) et d'AA branchés (leucine, isoleucine, valine) a permis d'améliorer la croissance. Cela laisse à penser que la teneur en AA libres du jus de soja initial peut être limitante.

9% des protéines identifiées provenaient du métabolisme carboné. Ces protéines révèlent le catabolisme de polymères de glucose (AmyL, GlgP, MalQ), du saccharose, du lactose (LacS-Z), du glucose (GlcK) et du fructose (transporteurs PTS ManMNL). Cela est en accord avec la teneur élevée en saccharose (24,6 g/L). Les protéines impliquées dans son transport (ScrA, PtsI, PtsH) et son catabolisme (ScrB) ont été identifiées. Les enzymes de la glycolyse ont également été identifiées (dont Ldh).

La production plus élevée de folate par une souche de *Lactiplantibacillus plantarum* 4-3 en fermentation de jus de soja qu'en milieu synthétique pourrait permettre de résister au stress oxydant du jus de soja qui pourrait limiter la croissance (Liu et al., 2019).

Ces différentes études permettent de faire les mêmes conclusions. Le métabolisme de BL en jus de soja est complexe et différent de son métabolisme en fermentation de lait de vache ou en milieu synthétique. Des facteurs de stress potentiels sont identifiés (oxydants et nutritionnels liés à la limitation en AA et de la source de carbone) ; il reste cependant à identifier et confirmer l'origine de ces stress.

C. Bénéfices de la fermentation lactique de jus de soja.

Outre l'amélioration de la conservation du jus de soja, la fermentation lactique de jus de soja présente de nombreux avantages que nous allons détailler dans les paragraphes suivants : amélioration des propriétés organoleptiques, amélioration des propriétés nutritionnelles.

1 Propriétés organoleptiques

La fermentation lactique peut permettre d'améliorer les caractéristiques organoleptiques du jus de soja.

Cela peut être due à une altération des molécules responsables des notes négatives. L'hexanal, reconnu comme le composé majoritairement responsable des notes vertes du soja, pourrait être réduit en hexanol par des souches de *Streptococcus* et *Lactobacillus* (Blagden and Gilliland, 2005).

Les BL peuvent sinon améliorer les caractéristiques organoleptiques via la production de molécules aromatiques hédoniques (Benozzi et al., 2015 et partie III.D.2.5.c.), en modifiant la texture par acidification et par la production d'exo-polysaccharides (Li et al., 2014; Mital and Steinkraus, 1979; Siroli et al., 2019).

La modification de la texture par acidification consiste comme pour le yaourt au lait de vache à déstabiliser et agréger les protéines dissoutes (Famelart et al., 2011). Comme présenté en partie II, à un pH inférieur à 5,0 moins de 20% des protéines de soja sont solubles dans l'eau. La déstabilisation et l'agrégation des protéines du jus de soja induit alors une gélification (Peng and Guo, 2015). Les protéases peuvent cependant limiter la formation d'un gel hédonique car elles peuvent contribuer à l'apparition de peptides amers (partie IV.D.2. Le métabolisme azoté).

2 Propriétés nutritionnelles

Les BL peuvent également être utilisées en jus de soja pour en améliorer les caractéristiques nutritionnelles. L'hydrolyse des oligosaccharides non digestibles permet d'éliminer la source des flatulences et désagréments intestinaux liés à la consommation de légumineuses (partie IV.D). Les BL sont capables de produire des peptides bioactifs (partie IV.E). La protéolyse des BL peut également permettre de réduire la réactivité immunitaire aux protéines allergéniques du soja. Cela a été le cas grâce à l'activité d'une souche d'*Enterococcus faecalis* VB43 (Biscola et al., 2017).

La fermentation lactique peut ainsi augmenter la digestibilité des oligosaccharides mais aussi augmenter la digestibilité des protéines en les dégradant partiellement. La fermentation permet d'apporter des vitamines comme la vitamine B12 (Champagne et al., 2010; Gu et al.,

2015; LeBlanc et al., 2013), des folates (B9) (Liu et al., 2019), de la thiamine (B1) (Kort et al., 2015), des composés anti-oxydants (Wang et al., 2017) et des composés d'arômes (Granata and Morr, 1996; Murti et al., 1993).

La thèse consiste en partie à identifier des bactéries bénéfiques en fermentation de jus de soja. Les bénéfices recherchés sont présentés en partie II du Chapitre 2.

D. Intérêt des levains multi-souches en fermentation de jus de soja.

Comme nous l'avons vu dans les paragraphes précédents, les bactéries lactiques présentent des propriétés fermentaires qui peuvent être espèce-dépendantes et/ou souche dépendantes. Associer des souches présentant des propriétés différentes et/ou complémentaires peut présenter un intérêt pour la fermentation de jus de soja (Canon et al., 2020c). Certaines études montrent que l'association de *Propionibacterium freudenreichii* et de *Bifidobacterium adolescentis* permet d'améliorer la dégradation du stachyose du jus de soja (Wu et al., 2012). L'utilisation de *L. acidophilus*, de *S. thermophilus*, de *B. infantis* et *B. longum* en coculture permet d'améliorer leurs activités réductrices en jus de soja (Wang et al., 2006). L'association de souches de *S. thermophilus* avec des souches appartenant au genre *Lactobacillus* permet de diminuer le pH atteint après 24h de fermentation en jus de soja (Albuquerque et al., 2017). Au niveau transcriptomique, la coculture d'un *Bacillus subtilis* et d'un *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* en fermentation solide de soja a montré que chaque souche influençait l'expression des gènes de l'autre souche. Ainsi, en coculture, les métabolismes du carbone et du glutathion étaient induits chez *Bif. animalis subsp. lactis*. Les métabolismes azoté et carboné étaient cependant réprimés chez *Ba. subtilis* en coculture. Cette interaction a permis d'améliorer la croissance de *Bif. animalis subsp. lactis* (H. K. Wang et al., 2015).

L'association de BL n'est cependant pas systématiquement positive dans la fermentation de jus de soja comme le montre l'étude de Champagne et al., 2010, avec *S. thermophilus* et *L. helveticus* qui dégradent moins d'isoflavones en coculture qu'en monoculture.

Une stratégie d'association pour la fermentation de mixte lait-végétaux a dernièrement été proposée par Canon et al., 2020a afin de potentialiser les effets bénéfiques de la fermentation. Cela consiste en i. une présélection *in silico* des BL qui dégradent les sucres présents dans la matrice à fermenter; ii. un criblage *in vitro* de ces souches de BL dans la matrice et une classification selon leur capacité à dégrader les sucres et hydrolyser les protéines de la matrice; iii. un assemblage de manière randomisé des souches qui présentent des complémentarités phénotypiques dans la matrice étudiée. Dans cette étude, cela a permis

d'identifier une coculture optimale pour la fermentation d'un mixte lait-lupin (Canon et al., 2020b).

V. Conclusion

En conclusion, l'ensemble de cette bibliographie montre que les métabolismes des BL sont divers et complexes. Par ailleurs, les jus de soja, contrairement au lait de vache traditionnellement utilisé pour fabriquer des yaourts, sont variables en termes de composition, notamment en sucres. Enfin, par rapport à la fermentation de lait de vache, il y a peu de connaissances sur les profils métaboliques des bactéries lactiques mises en œuvre lors de la fermentation de jus de soja. Certaines études démontrent cependant qu'associer des BL en vue d'optimiser la fermentation de jus de soja est une stratégie intéressante. Il reste cependant à mieux définir les caractéristiques des métabolismes des BL en jus de soja ainsi que les interactions pouvant exister entre BL lors de la fermentation. C'est l'objet des recherches menées pendant cette thèse et dont les résultats et avancées majeurs sont présentés ensuite.

CHAPITRE 2. Résultats et avancées de la thèse

Le chapitre 1 a présenté un état des connaissances sur la fermentation lactique de jus de soja. Ce chapitre 2 présente les avancées de la thèse. La partie I de ce chapitre introduit les objectifs et la stratégie. Les résultats sont présentés en 4 parties (II, III, IV et V). Ces résultats seront discutés en chapitre 3. L'organisation de cette thèse est récapitulée en Figure 13.

I. Objectifs et stratégie

A. Question de recherche

Dans le contexte actuel de transition alimentaire, décrit en Chapitre 1, les objectifs de cette thèse CIFRE en collaboration entre Triballat Noyal et l'UMR STLO de l'INRAE de Rennes sont doubles :

1. Au vu de la diversité des publications traitant de la fermentation lactique de jus de soja (diversité de jus, de BL et de procédés de fermentations) et du faible nombre de souches par espèces étudiées par publication (2 en moyenne ; Tableau 2), la fermentation lactique de jus de soja reste peu explorée. Les associations de souches pour fermenter du jus de soja sont également peu étudiées. Les principales recherches de la thèse ont donc pour objectif de répondre aux questions suivantes :

Quels sont les profils métaboliques des BL en fermentation de jus de soja ?

&

Quelles sont les bases moléculaires des interactions positives sur la vitesse de fermentation d'un duo de BL en jus de soja ?

2. Du point de vue industriel, l'intérêt de l'étude était de réduire la durée de la fermentation lactique d'un jus de soja et d'améliorer les qualités organoleptiques et fonctionnelles du jus de soja fermenté. Pour cela, nous avons criblé des souches, puis des associations de souches, sur leur capacité à fermenter un jus de soja spécifique. Les fermentations réalisées devaient répondre à un cahier des charges fixant un taux d'inoculation, une durée de fermentation pour atteindre un pH cible, une texture cible, mais aussi limiter les défauts de saveurs (off-notes) et tout en apportant des qualités hédoniques. Les résultats concernant l'exploitation industrielle des souches sont confidentiels. Les noms des souches retenues pour l'exploitation industrielle ont donc été codés pour tout de même présenter certains résultats dans ce manuscrit. En effet, dans un environnement concurrentiel important, TN préfère une stratégie de secret industriel à une stratégie de dépôt de brevet.

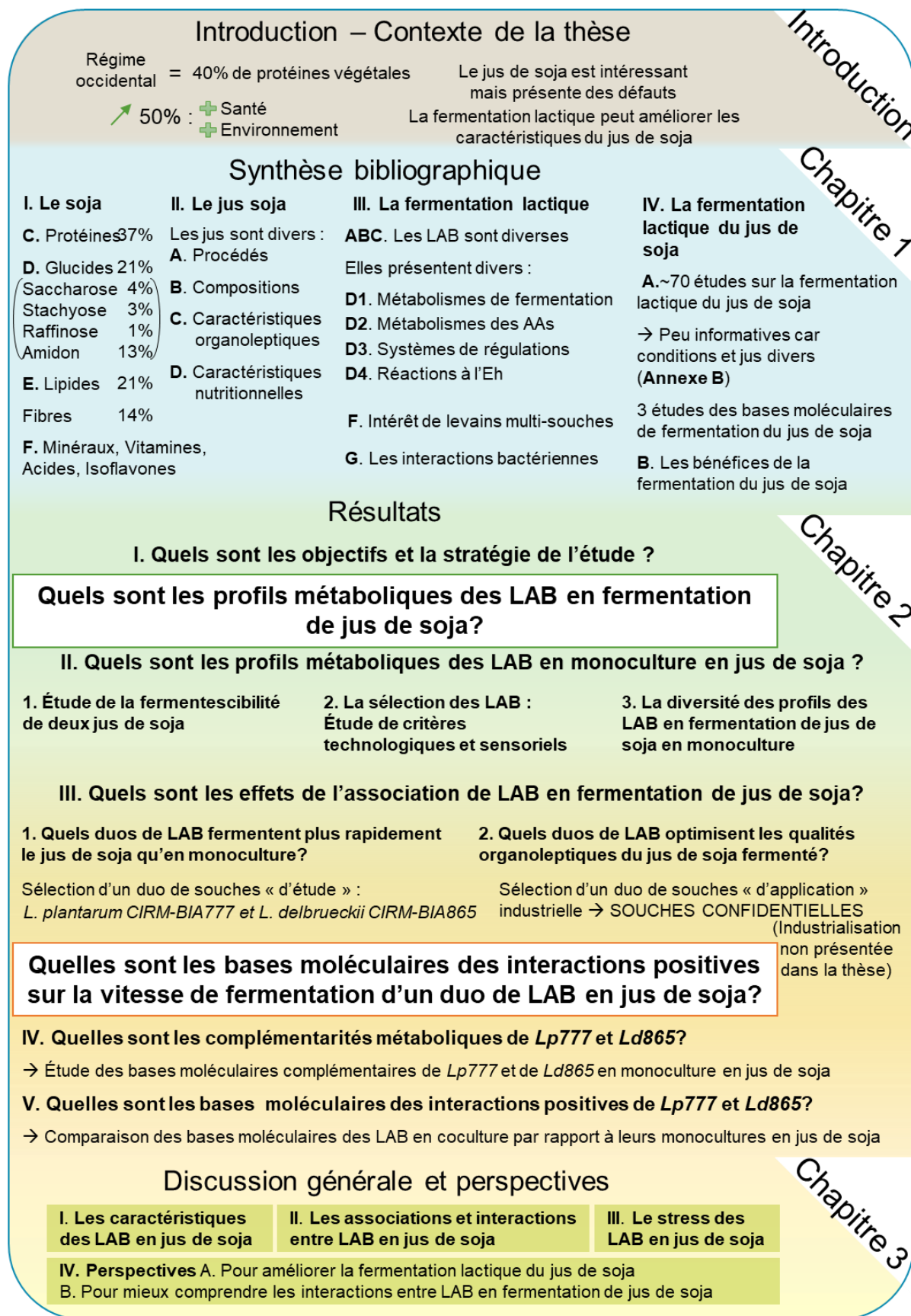


Figure 13. Schéma général de l'organisation du manuscrit de thèse. Les parties II, IV et V du Chapitre 2 regroupent les travaux faisant l'objet d'articles scientifiques (publiés ou en préparation) inclus dans ce manuscrit.

B.Stratégie.

Pour répondre aux questions de recherche de la thèse, nous les avons déclinées en plusieurs sous questions :

- a. Quels sont les profils métaboliques de bactéries lactiques en fermentation d'un jus de soja en monoculture?
- b. Quels sont les effets de l'association de bactéries lactiques sur les caractéristiques de fermentation et les caractéristiques du produit de fermentation d'un jus de soja ?
- c. Quelles sont les complémentarités métaboliques entre *L. plantarum* CIRM-BIA777 et *L. delbrueckii* CIRM-BIA865 pouvant être bénéfiques à la fermentation du jus de soja ?
- d. Quelles sont les bases moléculaires de l'interaction positive entre *L. plantarum* CIRM-BIA777 et *L. delbrueckii* CIRM-BIA865 lors de la fermentation en coculture du jus de soja ?

Différentes expérimentations s'inscrivant dans un schéma de la stratégie de la thèse (Figure 14) ont permis de répondre à ces questions. Les résultats de ces expérimentations seront donnés en 4 parties (II, III, IV et V) de ce chapitre. Ces 4 parties sont présentées ci-dessous.

- **La partie II répond à : quels sont les divers profils métaboliques des bactéries lactiques en fermentation d'un jus de soja en monoculture ?**

Nous avons cherché dans cette partie à construire un socle de connaissances sur la fermentation d'un jus de soja par les bactéries lactiques.

Pour cela, nous avons sélectionné un unique jus de soja et diverses souches de BL. Nous avons évalué la croissance de ces souches dans le jus de soja afin d'identifier celles capables de le fermenter. Ces BL ont aussi été criblées dans divers milieux synthétiques contenant les sucres du soja, afin d'identifier les souches capables de les métaboliser. Les souches capables de fermenter le jus de soja ont été criblées selon leurs profils sensoriels. Enfin, les profils métaboliques des jus de soja fermentés présentant des odeurs jugées « acceptables » ont été caractérisés (Figure 14).

Les résultats de cette première partie ont été ensuite exploités dans la partie III pour sélectionner les souches à associer pour améliorer la fermentation du jus de soja.

- **La partie III répond à : quels sont les effets de l'association de bactéries lactiques en fermentation de jus de soja ?**

La bibliographie présente divers effets. Les effets semblent pouvoir concerner l'acidification du jus de soja, la production de métabolites d'intérêts, la dégradation de composés du jus de soja ou bien la croissance des BL. Dans cette étude, l'objectif était

d'étudier des souches présentant des interactions positives. Plusieurs duos de souches ont donc été sélectionnés selon leurs profils métaboliques et testés en coculture. Pour TN, un objectif de la thèse était de réduire la durée de la fermentation lactique d'un jus de soja et d'améliorer les qualités organoleptiques et fonctionnelles du jus de soja fermenté. Une coculture « d'application », destinée à être utilisée industriellement par TN a donc été recherchée. Par ailleurs, une coculture « d'étude », capable de diminuer le temps de fermentation par rapport aux monocultures a été sélectionnée. Cette coculture est constituée des souches *L. plantarum* CIRM-BIA777 et *L. delbrueckii* CIRM-BIA865. Les potentielles complémentarités entre les deux souches ainsi que les bases moléculaires de l'interaction sont étudiées dans la suite de la thèse (Figure 14).

- **La partie IV. répond à : quelles sont les complémentarités métaboliques entre *L. plantarum* CIRM-BIA777 et *L. delbrueckii* CIRM-BIA865 bénéfiques à la fermentation du jus de soja ?**

Dans un premier temps, nous avons analysé chacune des souches constituant la coculture "d'étude" individuellement. L'objectif de cette partie était de comprendre quelles étaient les complémentarités métaboliques entre les deux souches pouvant être à l'origine des interactions bénéfiques à la fermentation lorsqu'elles sont utilisées en coculture.

Nous avons décrit comment s'adaptait le métabolisme de chacune des souches en monoculture en comparant les données obtenues entre les différents points de cinétique de fermentation du jus de soja (Figure 14).

- **La partie V. répond à : quelles sont les bases moléculaires de l'interaction positive entre *L. plantarum* CIRM-BIA777 et *L. delbrueckii* CIRM-BIA865 lors de la fermentation en coculture du jus de soja ?**

Pour répondre à cette question, nous avons comparé les bases moléculaires, par des approches de métabolomique et de méta-transcriptomique, de la coopération entre les souches de la coculture « d'étude » lors de leur croissance par rapport à leur croissance en monoculture. Ces comparaisons ont été effectuées à trois points de pH de fermentation.

Diverses bases moléculaires des interactions ont été décrites. Certaines ont été vérifiées par la suite et d'autres sont discutées (Figure 14).

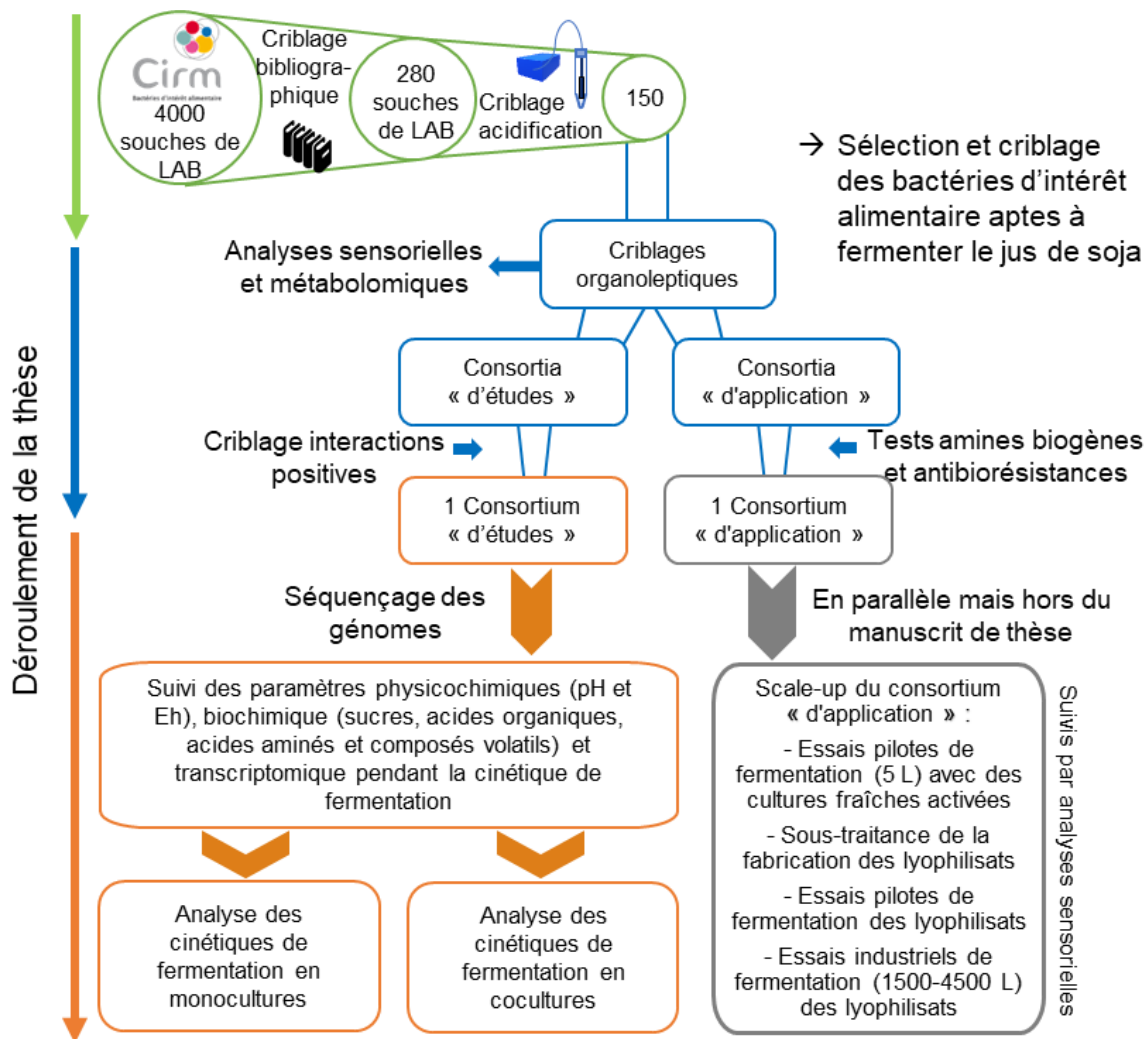


Figure 14. Schéma de la stratégie de la thèse pour répondre aux questions : Quels sont les profils métaboliques des BL en fermentation de jus de soja ? Quelles sont les bases moléculaires des interactions positives entre BL en fermentation lactique de jus de soja ?

II. Les profils métaboliques des BL en fermentation de jus de soja

A. Introduction

Comme présenté ci-dessus, nous avons cherché à construire un socle de connaissances sur un grand nombre de BL, afin par la suite d'améliorer la sélection de souches pour la fermentation d'un jus de soja.

Pour cela, nous avons d'abord sélectionné un jus de soja et les souches de BL d'intérêts avant de les cribler.

1 La sélection du jus de soja étudié

L'étude de la bibliographie nous a permis d'établir que la moitié des jus de soja répertoriés contenait moins de 6 g/L de saccharose (Tableau 2), le sucre majoritaire. Les autres sucres du soja, le raffinose et le stachyose peuvent toutefois constituer une autre source de sucres fermentescibles, à condition que la bactérie fermentaire utilisée soit capable de produire une α -galactosidase et ainsi de cataboliser ces sucres.

Comme présenté dans le Chapitre 1 (Partie II), il n'existe pas un jus de soja mais des jus de soja. Le choix des variétés de graines, leur degré de maturité et les paramètres du procédé d'extraction induisent une diversité de jus de soja (Annexe B). Certains jus ont en particulier des teneurs en sucres faibles. Les premiers essais réalisés lors de ma thèse ont consisté à vérifier la fermentescibilité de jus de soja fournis par Triballat Noyal.

Le terme « fermentescibilité » d'un jus de soja est un néologisme indiquant que le jus de soja peut être acidifié par un procédé de fermentation. Dans le cas présent, nous avons considéré que le jus de soja devait pouvoir atteindre par fermentation un pH permettant la gélification jusqu'à obtenir une texture de type yaourt, c'est-à-dire un $\text{pH} < 5,0$.

Parmi les divers jus disponible à TN, deux jus ont été caractérisés et six souches de BL ont été utilisées afin de tester la fermentescibilité des jus de soja : cinq souches fournies par le CIRM-BIA, et une souche brevetée par TN. Ces six souches de BL avaient été sélectionnées car elles avaient déjà été repérées par le CIRM-BIA et TN comme étant capables d'utiliser du saccharose ou du raffinose. Voici ci-dessous les caractéristiques des deux jus de soja biologiques UHT fournis par Triballat Noyal. Ces deux jus de soja sont sans additifs et composés uniquement de graines de soja et d'eau. Un jus a une haute teneur en sucres totaux ($8,0 \pm 0,2$ g/L) est noté HS et l'autre jus avec une basse teneur en sucres totaux est noté BS ($3,5 \pm 0,3$ g/L) (Tableau 6). Le jus BS correspond à un jus diafiltré, élaboré par TN afin de réduire sa teneur en isoflavones (Chapitre 1, II.D).

Tableau 6. Caractéristiques des jus de soja HS et BS fournis par Triballat Noyal

	Jus de soja HS	Jus de soja BS
pH	7,2	7,2
Protéines (en g/L)	35±1	45,5±0,4
Lipides (en g/L)	19±1	26±1
Sucres totaux (en g/L)	8,0±0,2	3,5±0,3
Monosaccharides	<0,3	<0,3
Saccharose	4,2±0,1	1,7±0,2
Raffinose	0,73±0,02	0,28±0,03
Stachyose	3,1±0,1	1,5±0,1
Verbascose	<0,3	<0,3
Minéraux (en g/L)	4,5±0,2	3,9±0,1
Calcium	0,11±0,01	0,15±0,03
Sodium	0,36±0,01	0,28±0,01
Potassium	1,01±0,01	0,68±0,01
Vitamines (en mg/L)		
Tocophérol (E)	<5	<5
Acide ascorbique (C)	<10	<10
Vitamines (en µg/L)		
Acide folique (B9)	33±2	12±1
Cobalamine (B12)	<1	<1
Vitamine K	7±2	6±1
Isoflavones (mg/L)	133±5	72±6

1.1 Essais de fermentescibilité du jus BS

Les 6 souches sélectionnées ont été utilisées pour vérifier la fermentescibilité des jus BS. Les matériels et méthodes utilisés ici correspondent à ceux donnés en partie II.D de ce chapitre (Olivier Harlé et al., 2020).

a) Les souches de BL sélectionnées n'atteignent pas un pH inférieur à 5,0 en jus BS

Le jus de soja BS non fermenté a un pH de 7.2. Toutes les souches de BL testées sont capables d'acidifier le jus BS. Aucune souche n'a cependant atteint un pH inférieur à 5,0 en moins de 24 h (Figure 15). Un plateau est atteint après 15 h de fermentation.

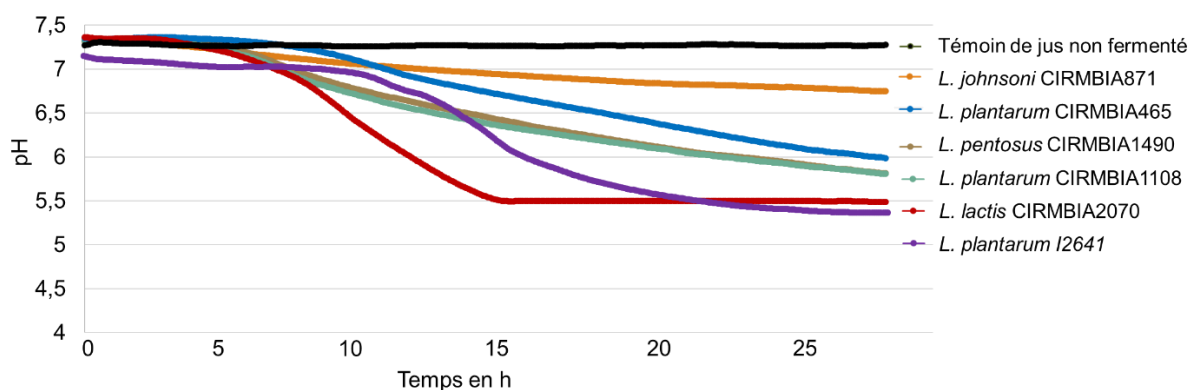


Figure 15. Cinétiques de fermentation du jus de soja BS par 6 souches de BL.

b) Les sucres totaux du jus BS peuvent cependant permettre d'acidifier à un pH inférieur à 5,0

Le jus BS est un jus de soja riche en protéines ($45,5 \pm 0,4$ g/L) mais qui contient peu de sucres totaux ($3,5 \pm 0,3$ g/L), peu de saccharose ($1,7 \pm 0,2$ g/L). Plusieurs essais ont été réalisés afin de savoir si les sucres étaient le facteur limitant l'acidification du jus BS, et dans ce cas lesquels étaient limitants. Est-ce que l'activité d'une α -galactosidase (présentée dans le Chapitre 1, partie I.D) pourrait permettre d'acidifier davantage le jus BS ?

Des tests de fermentation du jus BS avec différents ajouts ont été réalisés :

- ajout de 4 g/L de glucose, de saccharose ou de raffinose,
- ajout de galactosidase (300 GalU/L, une unité d'activité de l' α -galactosidase permet de libérer 1 μ mol de galactose par minute à 37°C, incubation 12 h à $37 \pm 1^\circ\text{C}$).

Les résultats d'essais de fermentescibilité indiquent que l'ajout de raffinose ne permet pas à la souche de *L. plantarum* I2641 d'acidifier davantage le jus BS en comparaison au témoin, jus BS non enrichi (Figure 16). En revanche, les ajouts de saccharose, de glucose ou d' α -galactosidase permettent d'acidifier le jus BS à un pH inférieur à 5,0. Le saccharose ne permet cependant pas d'atteindre un pH inférieur à 5,0 en moins de 24 h. Le glucose et l' α -galactosidase permettent cependant d'atteindre un pH inférieur à 5,0 en moins de 24 h (Figure 16).

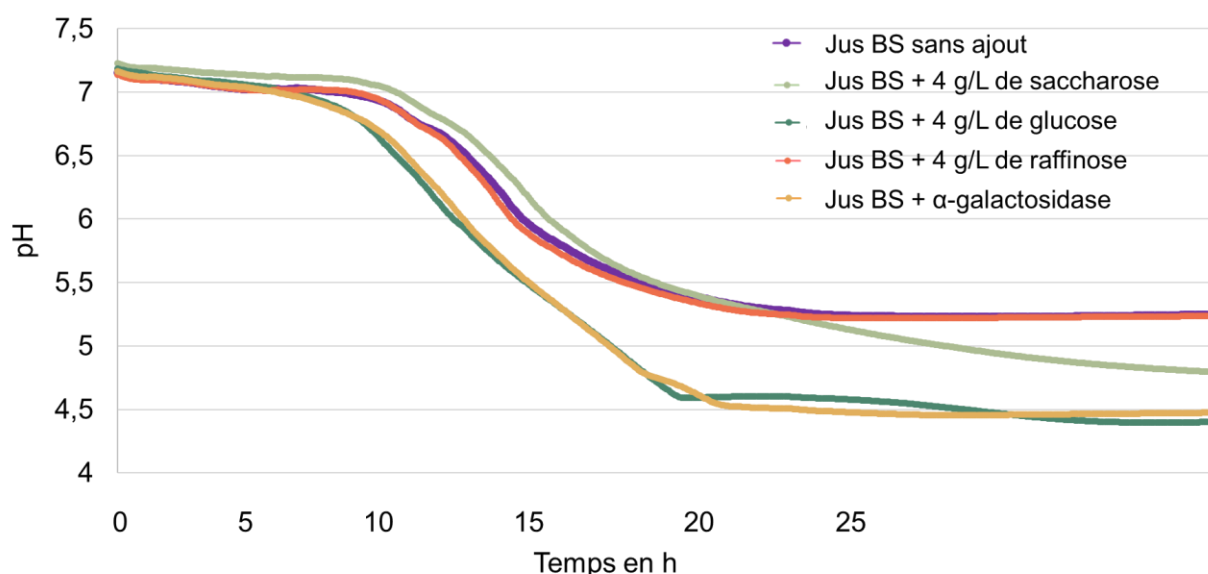


Figure 16. Cinétique de fermentation du jus de soja BS, modifié ou non, par la souche de *L. plantarum* I2641. Les fermentations ont été réalisées à 37°C.

Ces résultats permettent de conclure que le jus BS peut être fermenté jusqu'à un pH inférieur à 5,0 avec cette souche de *L. plantarum*. De l'α-galactosidase doit cependant être produite ou ajoutée afin que le raffinose et/ou le stachyose puissent être catabolisés.

Afin d'obtenir une majorité de souches capables de fermenter le jus de soja, nous avons décidé de travailler sur un jus contenant davantage de saccharose. C'est pourquoi, le jus HS, à haute teneur en sucres, a été retenu pour la suite de la thèse. Ce jus HS a en effet permis à 5 des 6 souches testées d'atteindre un pH inférieur à 5,0 en moins de 48 h de fermentation à 37°C.

2 Sélection des souches de BL étudiées

La sélection de BL à tester a été réalisée à partir des 4000 souches de bactéries d'intérêt alimentaire disponibles et libres de droits au CIRM-BIA.

2.1 Critères de sélection

Cette sélection a été réalisée au niveau du choix des espèces et s'est basée sur les données d'espèces de bactéries lactiques décrites dans la bibliographie comme capables de croître en jus de soja. Parmi les espèces repérées, les souches disponibles et libres de droits du CIRM-BIA ont été sélectionnées. Différents critères ont été établis afin de réaliser cette sélection. Des critères technologiques ont d'abord été choisis puis des critères sensoriels :

En accord avec TN, d'un point de vue technologique, les espèces doivent : 1. être qualifiées de « sûres » pour la consommation humaine, 2. ne produire aucun gaz pendant la fermentation, 3. être micro aérophile ou anaérobie, i.e. capables de fermenter avec une faible

présence d'oxygène et 4. être capables d'acidifier le jus de soja ou être capables d'acidifier à partir d'un des sucres du soja (i.e. saccharose, raffinose ou stachyose).

Et d'un point de vue sensoriel, on recherche: 1. Des souches de BL homolactiques (obligatoirement ou facultativement), 2. Des souches capables de dégrader des composés responsables de « off-notes » du soja comme l'hexanal, 3. Des souches capables de synthétiser des composés aromatiques intéressants comme du butane-2,3-dione et 4. Des souches capables d'améliorer la texture.

2.2 Les BL sélectionnées

L'ensemble des souches et espèces repérées pour acidifier le jus de soja ou capables de cataboliser les sucres du jus de soja est répertorié dans les tableaux des *Supplementary data*.

Les souches du genre *Bifidobacterium* n'ont cependant pas été sélectionnées puisque certaines sont strictement anaérobies. Par ailleurs, des souches d'espèces pour lesquelles la bibliographie ne présentait pas ou peu d'informations ont été sélectionnées afin d'acquérir des connaissances sur ces espèces peu étudiées. C'était le cas pour des souches de *Lactobacillus* : *L. rossiae*, *L. hominis*, *L. kunkeei*, *L. pontis* et *L. xiangfangensis*. Une souche de *L. diolivorans* a également été sélectionnée alors qu'elle était a priori obligatoirement hétérofermentaire et que plus de 90% des souches de cette espèce n'étaient pas capables de cataboliser du saccharose, ni du raffinose (Vos et al., 2009). 5 souches de *L. mesenteroides* ont tout de même été sélectionnées malgré qu'elles peuvent dégager du gaz puisque certaines souches ont été identifiées dans la bibliographie comme productrices d'EPS.

B. Diversité des profils métaboliques des BL en fermentation de jus de soja : résumé de l'article

Les capacités métaboliques de 276 souches de 25 espèces de BL différentes ont été criblées en jus de soja et dans divers milieux synthétiques définis. Cela a permis d'identifier les souches capables de fermenter le jus de soja et de métaboliser les différents sucres du soja.

Toutes les souches du genre *Streptococcus*, 83% des souches des genres *Leuconostoc* et *Lactobacillus* et 41% des *Lactococcus* étaient capables d'acidifier avec du saccharose comme unique source de carbone. En revanche, 36% de toutes les souches de BL testées étaient capables d'acidifier à partir de raffinose et seulement 6% à partir de stachyose.

Quasiment toutes les souches capables d'acidifier avec du saccharose (97%) soit cent douze souches ont été capables de fermenter le jus de soja sélectionné. Ces 112 souches ont ensuite subi un second criblage qui consistait à juger si les odeurs des jus de soja fermentés

par ces souches étaient acceptables ou non pour des produits de type « yaourt ». Ce crible sensoriel a permis par la même occasion de caractériser les odeurs des SJ fermentés par les souches capables d'acidifier le jus de soja.

Ce second criblage sensoriel a permis de sélectionner quarante-six souches de BL. Les jus de soja issus des fermentations de ces 46 souches ont été caractérisés via des approches de métabolomique ciblant les sucres, les acides organiques, les isoflavones et les composés volatils. Les BL ont ainsi pu être catégorisées selon leurs profils métaboliques en fermentation de jus de soja. Pour préciser, 17/46 souches ont dé-glycosylé les isoflavones du jus de soja. Les 27 souches de *S. thermophilus* ont converti $4,4 \pm 0,1$ g/L de saccharose en $3,0 \pm 0,1$ g/L d'acide lactique alors que les 18 souches de *Lactobacillus* et la souche de *Lactococcus* ont converti $5,2 \pm 0,1$ g/L de saccharose en $2,2 \pm 0,1$ g/L d'acide lactique.

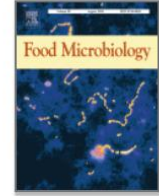
C. Messages clés :

- 80% des souches de BL sélectionnées étaient capables d'acidifier un milieu synthétique avec du saccharose comme unique source de carbone.
- Parmi ces souches capables d'acidifier à partir de saccharose, 97% étaient capables d'acidifier le jus de soja. Ce critère de sélection est donc pertinent.
- Les souches du genre *S. thermophilus* sont les plus efficaces pour acidifier le jus de soja.
- Les profils métaboliques des BL sont autant diversifiés au niveau des espèces qu'au niveau des souches d'une espèce.
- 164 odeurs et 35 composés volatils ont été identifiés dans les jus de soja fermentés.

D. Diversity of the metabolic profiles of a broad range of lactic acid bacteria in soy juice fermentation



Food Microbiology
Volume 89, August 2020, 103410



Diversity of the metabolic profiles of a broad range of lactic acid bacteria in soy juice fermentation

Olivier Harléab, Hélène Falentina, Jérôme Niayb, Florence Valencea, Céline Courselaudb, Victoria Chuata, Marie-Bernadette Maillarda, Éric Guédona, Stéphanie-Marie Deutscha*, Anne Thierrya*

Affiliations :

a STLO, INRA, Agrocampus-Ouest, Rennes, France

b Triballat-Noyal, Noyal-sur-Vilaine, France

Corresponding Author: stephanie-marie.deutsch@inra.fr

*Equal contribution

Please refer to the online version of the article to access the supplementary tables

HIGHLIGHTS:

- 220/276 BL strains (80%) are sucrose-positive
- 213/220 sucrose-positive BL strains (97%) can ferment soy juice
- *S. thermophilus* strains are the most effective in acidifying soy juice
- The BL metabolic profiles are species- and strain-dependent
- 164 odors and 35 volatile compounds were identified in fermented soy juices

ABSTRACT:

This study explores the ability of lactic acid bacteria (LAB) to ferment soy juice. The ability of 276 LAB strains from 25 species to ferment the principal soy carbohydrates, sucrose, raffinose or stachyose was tested in synthetic media and a soy juice. Fermented soy juices (FSJ) were characterized for their odor. Selected FSJ were characterized by targeted metabolomics. All Streptococcus, 83% of Leuconostoc and Lactobacillus and 41% of Lactococcus strains were sucrose-positive, while only 36% of all the LAB strains tested were raffinose-positive and 6% stachyose-positive. Nearly all (97%) the sucrose-positive strains fermented soy juice, indicating that an ability to use sucrose is a good criterion to select strains for soy juice fermentation. Among the most efficient acidifying strains, 46 FSJ had an odor deemed to be acceptable. FSJ composition was dependent on both species and strains: 17/46 strains deglycosylated soy juice isoflavones, the 27 *S. thermophilus* strains converted a mean 4.4 ± 0.1 g/L of sucrose into 3.0 ± 0.1 g/L of lactic acid versus 5.2 ± 0.1 g/L into 2.2 ± 0.1 g/L for the 18 Lactobacillus and one Lactococcus strains. This study highlights the diversity of the metabolic profiles of LAB strains in soy juice fermentation.

KEYWORDS: non-digestible oligosaccharide; organic acid; volatile compound; sensory evaluation; isoflavone

a) Introduction

Protein source in Western diets is mainly composed of animal-based protein (60% versus 40% plant-based protein) (“FAOSTAT”, 2018). A more balanced diet containing 50% of plant-based protein is healthier, will help to reduce the environmental impacts of food systems and may contribute to meeting worldwide protein needs (Guéguen et al., 2016; Springmann et al., 2018). Among all the plants used as a protein source, soybean [*Glycine max*] is interesting because of its high protein content (40% in dry matter). In this context, soy juice, also called soymilk, represents an interesting alternative to animal milk as a sustainable food. It could also be a valuable protein source for lactose-intolerant and vegan populations. However, two main bottlenecks limit the consumption of soy juice. First, soy “off-flavors” (“beany” and “green” flavors) are not appreciated by consumers (Kaneko et al., 2011). Secondly, oligosaccharides such as raffinose and stachyose are poorly digestible by humans, causing digestive discomfort and flatulence (Guillon and Champ, 2002). The lactic fermentation of soy juice by lactic acid bacteria (LAB) to produce a yogurt-type fermented soy product is a sustainable and inexpensive process for the preservation of soy juice. Moreover, lactic acid fermentation can contribute to improving the organoleptic properties of soy juice by reducing “off-flavors” and/or increasing “hedonic-flavor” compounds (Mital and Steinkraus, 1979; Siroli et al., 2019) and to lowering the content of non-digestible oligosaccharides (Singh and Vij, 2018).

The soy juice fermentation profile is dependent on several parameters: the composition of the soy juice, including its carbohydrate content, the LAB strains used as a starter and the fermentation parameters applied. Soy juice contains different carbohydrates: sucrose (50%), a disaccharide of glucose and fructose linked in β -1,2, raffinose (10%), a trisaccharide of sucrose and galactose linked in α -1,6, and stachyose (40%), a tetrasaccharide of raffinose and galactose linked in α -1,6 (Mital and Steinkraus, 1979). The carbohydrate content of soy juice can range from 1 g/L (Hati et al., 2014) to 23 g/L (Champagne et al., 2009), depending on soybean quality and the different soybean treatments used to produce soy juice (such as soaking soybeans in water, grinding, mixing, heating or filtering). Several classes of enzymes have been shown to be implicated in the catabolism of these carbohydrates. LAB levansucrases are enzymes that hydrolyze β -1,2 linkages (Gänzle and Follador, 2012). LAB α -galactosidases are enzymes that hydrolyze α -1,6 linkages and convert raffinose and stachyose (Bhatia et al., 2020; LeBlanc et al., 2004).

Although LAB have been used to ferment soy juice for decades, the roughly 200 LAB strains (from the *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* and *Streptococcus* genera) that have previously been studied across 30 scientific publications have not provided a full description of the metabolic profiles of LAB used in soy juice fermentation (due to the diversity

of soy juice composition and fermentation parameters). Furthermore, generally, most publications do not report “negative” results; i.e. results that would indicate an inability of LAB strains to ferment soy juice. The ability of different LAB to use raffinose and stachyose in soy juice also remains poorly understood (Gänzle and Follador, 2012; Wang et al., 2003), as the diversity of the primary and secondary metabolites they produce during soy juice fermentation (Li et al., 2014).

The objective of the present study was therefore to explore the diversity of LAB metabolic profiles in soy juice fermentation. The screening was organized in three successive selecting steps (Figure 17). During the first step, we screened strains abilities to acidify media with different carbon sources and soy juice. We investigated the ability of 276 LAB strains from 25 species to acidify a synthetic medium containing either sucrose, raffinose or stachyose as the only carbohydrate source, or a soy juice (SJ). In the second step, we screened strains through sensory evaluation of their FSJ by sniffing. We produced 112 fermented soy juices (FSJ) using the LAB strains that could acidify the SJ. Their odor was evaluated from a sensory point of view, which led to a third selection of 46 FSJ that had odors deemed to be acceptable. Finally, selected FSJ were characterized through metabolomics approaches targeting carbohydrates, organic acids, isoflavones and volatiles.

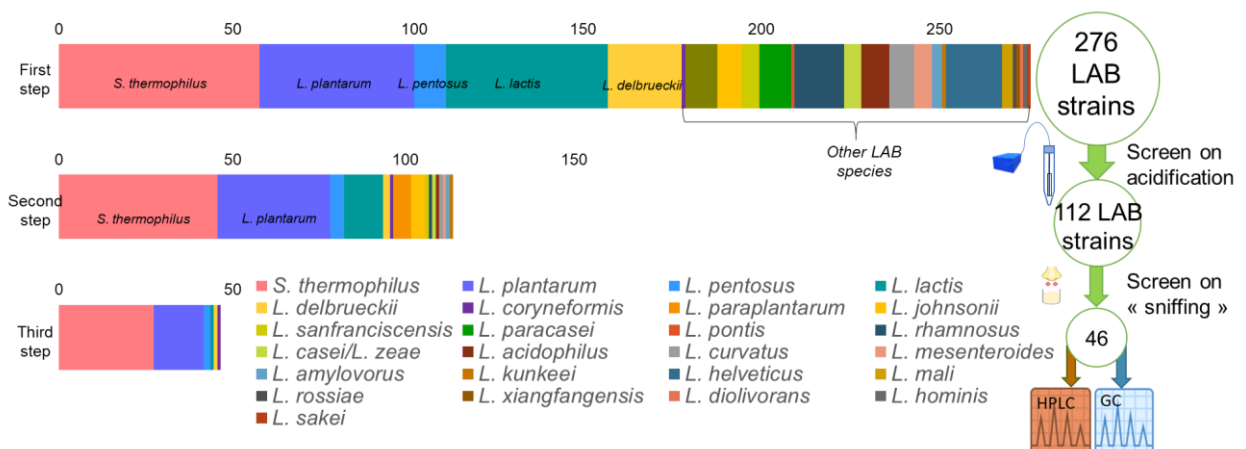


Figure 17. Number of strains tested by species during the different steps of the present study. Color scales are used for each step to clarify visualization of the number of strains.

b) Materials and Methods

o Bacteria and reactivation conditions (from frozen culture)

Twenty five LAB species have been selected thanks to bibliography and Florilege database (Chaix et al. 2019, <http://migale.jouy.inra.fr/Florilege/>) for their capacity to use soy main carbohydrates. Two hundred eighty strains from the 25 LAB species provided by the

International Centre for Microbial Resources-Food Associated Bacteria (CIRM-BIA, https://www6.inra.fr/cirm_eng/Food-Associated-Bacteria) were assessed in this study. The strains were 57 *Streptococcus thermophilus*, 46 *Lactococcus lactis*, 5 *Leuconostoc mesenteroides* and 168 *Lactobacillus* sp. (44 *L. plantarum*, 21 *L. delbrueckii*, 9 *L. pentosus*, 16 *L. helveticus*, 14 *L. rhamnosus*, 9 *L. paraplantarum*, 9 *L. paracasei*, 7 *L. johnsonii*, 5 *L. casei/L. zaeae*, 8 *L. acidophilus*, 5 *L. sanfranciscensis*, 7 *L. curvatus*, 3 *L. amylovorus*, 3 *L. mali*, 1 *L. coryneformis*, 1 *L. xiangfangensis*, 1 *L. diolivorans*, 1 *L. pontis*, 1 *L. rossiae*, 1 *L. hominis*, 1 *L. kunkeei* and 1 *L. sakei*).

The strains were activated from frozen glycerol stocks (-80°C) in broth medium for 24h. They were inoculated at 1% v/v in M17 broth for *Streptococcus* and *Lactococcus* strains and in Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth for *Lactobacillus* and *Leuconostoc* strains. Cultures were incubated at 30°C, 37°C or 43°C according to its specie affiliation (supplementary table 1).

○ **Culture media**

LAB were tested for their capacity to acidify a synthetic medium, either M17 or MRS, containing 5 g/L of sucrose (M-suc), 5 g/L of raffinose (M-raf) or 2 g/L of stachyose (M-sta) as the sole source of carbohydrate. Control media were prepared with no sugar (M-ns). Synthetic media had an initial pH of 6.9 ± 0.2 .

The soy juice used for fermentation was a commercial stabilized organic soy juice Sojade, (Triballat Noyal SAS, France), referred to as SJ below. The SJ used had a pH of 7.2 and contained 5.5 g/L of sucrose, 0.9 g/L of raffinose, 3.1 g/L of stachyose, 0.7 g/L of succinic acid and 1.1 g/L of citric acid. It did not contain any monosaccharide, nor lactic, acetic, or pyruvic acids (Table 7).

○ **Evaluation of strains abilities to acidify media with different carbon sources and soy juice**

Acidification tests were run after activation from frozen glycerol stocks and two sub-cultures inoculated at 1% v/v in 10 mL of M17/ MRS. The first sub-culture lasted 24h, the second 14 ± 1 h. Acidification tests were run using either 2 mL of SJ, M-ns, M-suc, M-raf or M-sta, which were inoculated at 1% v/v. All the experimentations were performed with the same batch of soy juice and were performed in duplicate from independent sub-cultures. The pH was measured for each sample after 10h and 48h of incubation using a pH meter (Cyberscan pH110, EUTECH Instruments). The criterion used to consider a strain sucrose-, raffinose- or stachyose-positive in 10h and 48h of fermentation was a difference superior to 0.3 pH unit between controls (M-ns) and M-suc, M-raf or M-sta. A pH below 6, an arbitrary criterion, was used to consider a strain positive to acidify soy juice in 10h or 48h.

- **Fermented soy juices production used for sensory and metabolomics analyses**

Soy juice fermentations were run after strain reactivation from frozen culture and two consecutive sub-cultures. SJ was inoculated at 1% v/v in 20 mL and incubated 10h at the specified temperature. Fermented soy juices (FSJ) for 10h were cooled in ice and stored for 14 ± 4 days at 4°C, then frozen at -20°C until biochemical analyses. We kept FSJ 14 days at 4°C before frozen to represent in the closest way the FSJ when they are consumed, i.e. 14 days after production. Two control samples were prepared with non-inoculated SJ incubated for 10h at 30 and 43°C.

- **Sensory evaluation of FSJ by “sniffing”**

FSJ stored for 14 ± 4 days at 4°C were smelled by a panel composed of 10 to 14 untrained judges. The FSJ were prepared and evaluated in biological duplicates. FSJ were stored in 40 mL straight containers with screw cap (Corning® Gosselin™). Sensory session took place at ambient temperature and products were at 8 ± 4 °C. 8 to 12 FSJ were evaluated by judges by session. Caps were removed at the beginning of the sessions.

Judges described FSJ odors using a free vocabulary. In addition, judges deemed whether the FSJ odors were acceptable or not for a yogurt-type soy product. The criteria of “acceptability” was subjective and evaluated through the answer (Yes/No) to the question “Do you judge the odor unacceptable for eating the fermented soy juice as a “yogurt-like” product?”. The FSJ that had odors deemed to be unacceptable by more than two out of ten judges were not further characterized.

- **Organic acid quantification in FSJ**

Lactic, acetic, citric, propionic, butyric, succinic and pyruvic acids were analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC, Dionex, P680, Sunnyvale California). Trials were prepared by 2-fold dilution of FSJ in H₂SO₄ 0.01 M, freezing at -20°C, centrifugation at 7500xg for 15 min at 4°C, and filtration (chromafil Xtra PVDF 45/13, Macherey Nagel) and were kept frozen at -20°C until analysis. Analysis was run using a Rezek ROA organic acid H⁺ column (300*7.8 mm, Phenomenex, California), with H₂SO₄ 0.005 M as the mobile phase at a flow rate of 0.4 ml.min⁻¹ at 60°C. Two detectors were used: UV detector (DIONEX-UVD 1704) operated at 210 nm and refractometer (RI 2103 Plus Jasco). Quantification was performed with an external calibration. Standards of lactic, citric, propionic, butyric succinic, and pyruvic acids were from Merck, St. Quentin Fallavier, France, and acetic acid from PanReac, Lyon, France.

Table 7. pH values, oligosaccharides, organic acids and isoflavone concentrations in soy juices after 10h of fermentation by 46 strains, means of duplicates inoculated at 1% v/v. The color gradient is used by metabolites to highlight differences between products. The products are classified according to their pH. Letters after the concentrations indicate statistical differences from a Tukey test with an alpha error of 0.1 (alpha error of 0.2 for stachyose).

Ref. CIRM-BIA	Measures realised on soy juices fermented for 10h			Carbohydrates concentrations (g/L)											Acids concentrations (g/L)					Isoflavones concentrations (mg/L equivalent aglycones)																								
	Species	Names	pH	Sucrose	Raffinose	Stachyose	Glucose	Fructose	Melibiose	Galactose	Total sugars	Citrate	Lactate	Acetate	Succinate	Pyruvate	glycosylated isoflavones	deglycosylated isoflavones	acetylated isoflavones	malonylated isoflavones	Total isoflavones																							
258	<i>S. thermophilus</i>	S.th258	4.5	0.7	cdef	0.7	a	2.9	a	0.0	b	0.0	ef	0.0	b	0.0	a	4.4	c	1.3	abc	3.6	ab	0.1	g	0	2	c	0.02	a	g	123	a	8	g	0	g	16	a	147	ab			
251	<i>S. thermophilus</i>	S.th251	4.6	1.1	bcdef	0.7	a	2.7	a	0.0	b	0.0	ef	0.0	b	0.0	a	4.7	bc	1.3	abc	3.5	abc	0.0	h	0	2	c	0.02	a	g	127	a	10	g	1	defg	12	a	150	ab			
1051	<i>S. thermophilus</i>	S.th1051	4.6	0.5	def	0.6	a	3.1	a	0.0	b	0.5	bcd	0.0	b	0.0	a	4.8	bc	1.3	abc	3.4	a	0	1	g	0	2	c	0.03	abcd	124	a	9	g	1	defg	18	a	151	ab			
1363	<i>S. thermophilus</i>	S.th1363	4.7	0.2	def	0.7	a	2.9	a	0.0	b	0.5	bcd	0.0	b	0.0	a	4.5	c	1.3	abc	3.3	b	0	1	g	0	2	c	0.02	c	to	j	128	a	8	g	1	defg	8	a	145	ab	
257	<i>S. thermophilus</i>	S.th257	4.7	1.1	bcdef	0.7	a	2.9	a	0.0	b	0.0	ef	0.0	b	0.0	a	4.8	bc	1.4	ab	3.5	abcd	0.0	m	0	0	6	ab	0.03	abc	124	a	11	g	0	fg	12	a	147	ab			
1358	<i>S. thermophilus</i>	S.th1358	4.7	1.1	bcdef	0.8	a	3.0	a	0.0	b	0.3	cdef	0.0	b	0.0	a	5.4	bc	1.3	abc	3.4	abcde	0.0	j	0	2	c	0.01	c	to	j	123	a	10	g	1	efg	16	a	149	ab		
2103	<i>S. thermophilus</i>	S.th2103	4.7	0.2	def	0.6	a	2.8	a	0.0	b	0.5	bc	0.0	b	0.0	a	4.3	c	1.2	abc	3.0	f	0	0	2	c	0.01	d	to	k	123	a	10	g	1	efg	16	a	149	ab			
26	<i>S. thermophilus</i>	S.th26	4.8	1.0	bcdef	0.7	a	2.9	a	0.0	b	0.0	ef	0.0	b	0.0	a	4.8	bc	1.3	abc	3.6	ab	0.0	j	0	2	c	0.02	a	to	f	128	a	9	g	1	defg	11	a	149	ab		
1035	<i>S. thermophilus</i>	S.th1035	4.8	0.7	cdef	0.5	a	2.8	a	0.0	b	0.0	ef	0.0	b	0.0	a	4.1	c	1.5	a	3.9	a	0	1	h	0	2	c	0.03	a	to	f	121	a	9	g	0	g	14	a	144	ab	
18	<i>S. thermophilus</i>	S.th18	4.9	1.4	bcdef	0.6	a	2.9	a	0.0	b	0.0	ef	0.0	b	0.0	a	5.1	bc	1.2	abc	2.4	h	0	0	2	c	0.02	b	to	h	124	a	10	g	0	g	14	a	147	ab			
67	<i>S. thermophilus</i>	S.th67	4.9	1.1	bcdef	0.7	a	2.9	a	0.0	b	0.1	def	0.0	b	0.0	a	4.9	bc	1.4	ab	3.2	b	0	0	h	0	6	ab	0.01	c	to	j	121	a	10	g	0	g	12	a	143	ab	
1860	<i>S. thermophilus</i>	S.th1860	4.9	0.6	def	0.7	a	2.9	a	0.0	b	0.0	ef	0.0	b	0.0	a	4.3	c	1.4	abc	3.4	abcd	0.0	m	0	0	3	c	0.02	c	to	h	121	a	9	g	0	g	19	a	150	ab	
34	<i>S. thermophilus</i>	S.th34	4.9	1.3	bcdef	0.8	a	3.0	a	0.0	b	0.2	cdef	0.0	b	0.0	a	5.4	bc	1.3	abc	2.7	ijklm	0.0	j	0	2	c	0.04	a	120	a	12	g	0	g	15	a	147	ab				
261	<i>S. thermophilus</i>	S.th261	4.9	1.0	bcdef	0.7	a	2.9	a	0.0	b	0.0	ef	0.0	b	0.0	a	4.8	bc	1.3	abc	3.5	abcd	0.0	i	0	2	c	0.03	ab	121	a	9	g	2	cdefg	11	a	143	ab				
772	<i>S. thermophilus</i>	S.th772	4.9	0.9	bcdef	0.7	a	2.9	a	0.0	b	0.3	bcdef	0.0	b	0.0	a	5.0	bc	1.4	a	3.7	ab	0.0	o	0	3	c	0.02	b	to	h	120	a	8	g	0	fg	16	a	145	ab		
1056	<i>S. thermophilus</i>	S.th1056	5.0	1.1	bcdef	0.7	a	3.0	a	0.0	b	0.4	bcde	0.0	b	0.0	a	5.3	bc	1.4	a	3.1	d	0	0	i	0	2	c	0.01	hijk	118	a	9	g	1	efg	17	a	144	ab			
1053	<i>S. thermophilus</i>	S.th1053	5.1	1.5	bcde	0.5	a	2.8	a	0.0	b	0.1	cdef	0.0	b	0.0	a	5.0	bc	1.3	abc	1.8	st	0.0	m	0	0	2	c	0.02	c	to	i	122	a	10	g	0	g	13	a	145	ab	
1046	<i>S. thermophilus</i>	S.th1046	5.1	1.2	bcdef	0.8	a	3.0	a	0.0	b	0.3	bcdef	0.0	b	0.0	a	5.4	bc	1.2	abc	2.5	lmnop	0.0	l	0	2	c	0.02	c	to	i	118	a	17	g	5	abc	9	a	148	ab		
1364	<i>S. thermophilus</i>	S.th1364	5.1	0.9	bcdef	0.6	a	2.3	a	0.0	b	0.2	cdef	0.0	b	0.0	a	4.1	c	1.3	abc	3.0	e	0	0	j	0	3	c	0.02	b	to	h	130	a	10	g	0	fg	8	a	149	ab	
1128	<i>S. thermophilus</i>	S.th1128	5.1	2.2	b	0.8	a	3.1	a	0.0	b	0.7	b	0.0	b	0.0	a	7.1	ab	1.1	bc	3.0	e	0	0	k	0	3	c	0.01	e	to	k	129	a	9	g	0	g	11	a	150	ab	
23	<i>S. thermophilus</i>	S.th23	5.1	1.6	bcd	0.6	a	2.9	a	0.0	b	0.5	bcde	0.0	b	0.0	a	5.7	bc	1.1	bc	2.7	jkilm	0.0	h	0	2	c	0.01	g	to	k	125	a	10	g	1	defg	12	a	147	ab		
1135	<i>S. thermophilus</i>	S.th1135	5.2	2.0	bc	0.7	a	3.0	a	0.0	b	0.2	cdef	0.0	b	0.0	a	6.1	bc	1.4	abc	2.6	jkilm	0.1	d	0	2	c	0.01	c	to	j	121	a	11	g	0	g	15	a	147	ab		
1864	<i>S. thermophilus</i>	S.th1864	5.2	0.5	def	0.7	a	2.8	a	0.0	b	0.3	bcdef	0.0	b	0.0	a	4.4	c	1.3	abc	3.2	c	0	0	i	0	2	c	0.01	c	to	j	122	a	11	g	2	cdefg	19	a	154	ab	
2102	<i>S. thermophilus</i>	S.th2102	5.2	1.3	bcdef	0.8	a	2.8	a	0.0	b	0.1	cdef	0.0	b	0.0	a	5.2	bc	1.0	bc	3.0	f	0	0	k	0	2	c	0.01	d	to	k	125	a	9	g	0	g	10	a	145	ab	
20	<i>S. thermophilus</i>	S.th20	5.3	1.1	bcdef	0.8	a	2.8	a	0.0	b	0.1	cdef	0.0	b	0.0	a	4.9	bc	1.1	bc	2.9	g	0	0	l	0	2	c	0.01	d	to	k	124	a	9	g	1	defg	19	a	153	ab	
1490	<i>L. pentosus</i>	L.pe1490	5.3	0.0	f	0.8	a	2.9	a	0.0	b	0.0	ef	0.0	b	0.0	a	3.8	c	1.0	bc	1.9	qrst	0.0	i	0	2	c	0.02	a	to	h	48	c	85	d	2	b	to	g	14	a	148	ab
36	<i>S. thermophilus</i>	S.th36	5.4	1.3	bcdef	0.7	a	2.5	a	0.0	b	0.2	cdef	0.0	b	0.0	a	4.7	bc	1.3	abc	2.8	g	0	0	l	0	2	c	0.01	d	to	k	126	a	9	g	0	fg	12	a	146	ab	
653	<i>L. plantarum</i>	L.pl653	5.4	0.4	def	0.8	a	2.8	a	0.0	b	0.0	ef	0.0	b	0.0	a	4.1	c	1.1	bc	2.6	jklmn	0.1	ab	0	2	c	0.02	b	to	h	49	c	90	d	4	a	to	e	10	a	152	ab
1420	<i>L. plantarum</i>	L.pl1420	5.4	0.9	bcdef	0.8	a	2.9	a	0.0	b	0.0	ef	0.0	b	0.0	a	4.8	bc	1.0	bc	2.1	pqrst	0.1	ab	0	2	c	0.02	c	to	j	38	cd	91	d	1	defg	13	a	143	ab		
1108	<i>L. plantarum</i>	L.pl1108	5.4	0.5	def	0.8	a	2.8	a	0.0	b	0.0	ef	0.0	b	0.0	a	4.3	c	1.1	bc	2.3	mnpqr	0.1	ab	0	2	c	0.02	a	to	h	22	de	123	ab	2	b	to	g	10	a	158	ab
2184	<i>L. plantarum</i>	L.pl2184	5.4	0.4	def	0.9	a	3.0	a	0.0	b	0.0	ef	0.0	b	0.0	a	4.4	c	1.1	bc	2.2	nopqr	0.1	bcde	0	2	c	0.02	c	to	h	23	de	106	c	3	a	to	g	8	a	140	b
777	<i>L. plantarum</i>	L.pl777	5.4	0.0	f	0.8	a	2.8	a	0.0	b	0.0	ef	0.0	b	0.0	a	3.7	c	1.0	d	2.9	u	0	2	op	0	2	d	0.03	jk	17	e	122	ab	2	b	to	g	9	a	151	ab	
1111	<i>L. plantarum</i>	L.pl1111	5.4	0.0	f	0.8	a	2.9	a	0.0	b	0.0	ef	0.0	b	0.0	a	3.8	c	1.1	bc	2.1	opqrs	0.1	b	0	2	c	0.02	c	to	i	10	e	124	ab	1	defg	15	a	150	ab		
2107	<i>L. plantarum</i>	L.pl2107	5.4	0.4	def	0.7	a	2.8	a	0.0	b	0.0	ef	0.0	b	0.0	a	4.0	c	1.1	bc	2.2	n	0	0	s	0	2	c	0.02	c	to	h	11	e	121	ab	2	cdefg	19	a	152	ab	
313	<i>L. delbrueckii</i>	L.de313	5.5	0.0	ef	0.7	a	2.8	a	0.8	a	1.3	a	0	2	a	0.0	5.9	bc	1.3	abc	1.6	st	0.1	c	to	j	0	3	c	0.00	jk	118	a	14	g	2	b	to	g	14	a	148	ab
1568	<i>L. lactis</i>	L.la1568	5.5	0.9	bcdef	0.7	a	3.1	a	0.0	b	0.0	ef	0.0	b	0.0	a	4.9	bc	1.1	abc	2.9	ghijk	0.1	b	0	2	c	0.00	ijk	123	a	12	g	6	ab	9	a	149	ab				
2115	<i>L. plantarum</i>	L.pl2115	5.5	0.2	def	0.8	a	2.9	a	0.0	b	0.0	ef	0.0	b	0.0	a	4.0	c	1.0	c	2.9	g	0	0	l	0	2	a	0.2	0.02	abcde	19	e	126	ab	7	a	9	a	160	ab		
845	<i>L. plantarum</i>	L.pl845	5.5	0.2	def	0.7	a	2.7	a	0.0	b	0.0	ef	0.0	b	0.0	a	3.7	c	1.2	abc	1.9	rst	0.1	b	0	2	c	0.02	a	to	h	26	de	114	bc	3	a	to	g	9	a	152	ab
2185	<i>L. plantarum</i>	L.pl2185	5.5	0.7	cdef	0.8	a	2.9	a	0.0	b	0.0	ef	0.0	b	0.0	a	4.5	c	1.5	ab	2.6	klmno	0.1	ab	0	3	c	0.02	a	to	h	21	de	119	abc	3	a	to	g	14	a	157	ab
2104	<i>S. thermophilus</i>	S.th2104	5.5	1.5	bcde	0.7	a	2.9	a	0.0	b	0.0	ef	0.0	b	0.0	a	5.3	bc	1.2	abc	1.5	t	0	1	g																		

- **Oligosaccharide quantification in FSJ**

Oligosaccharides were quantified in FSJ by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection (HPLC-EC, Spectra System, Thermo Scientific – Antex Leyde, Decade II). Aliquots (1 g) were diluted in 100 mL of Carrez solution (C6FeK4N6 0.5 mM, ZnSO4 2.0 mM, NaOH 0.01 M), sonicated and filtered (UPTIDISC RC 25 mm, 0.20 µm, T38111 Interchim). The column used was a CarboPac PA1, 250 mm x 4 mm i.d., particles 10 µm, 035391, Thermo Scientific, volume injected 20 µl. The eluents used were ultrapure water (A) from PURELAB Option Q. of ELGA (High Wycombe, United Kingdom) and NaOH 0.2 M (B). Both eluents were degassed with helium. HPLC-EC was run at 20°C with a flow rate of 1 mL/min and the gradient was as follows: initial conditions 8% B, maintained for 31 min, then a linear rise to 65 min up to 100% B, maintained from 65 min to 80 min, followed by reversion to the initial conditions with a linear decrease from 80 min to 95 min down to 8% B, which was held for 15 min. The total run time was 110 min. Quantification was performed with an external calibration using lactose, raffinose, melibiose, stachyose, galactose, glucose, sucrose, maltose and fructose (Merck, St. Quentin Fallavier, France).

- **Yield of conversion calculation**

The yield of conversion of oligosaccharides into acids was calculated from the sum of concentrations of every oligosaccharide consumed (sucrose, raffinose and stachyose) minus the concentrations of every oligosaccharide released (glucose, fructose, melibiose and galactose), expressed in molar equivalent carbon, divided by the sum of concentrations of lactic and acetic acid produced, expressed in molar equivalent carbon.

- **Isoflavone quantification**

Aliquots of 1 g of sample were mixed in 100 mL of methanol 80%, sonicated and filtered (UPTIDISC RC 25 mm, 0.45 µm, T38101 Interchim). Isoflavones were separated by HPLC Finnigan Surveyor, Thermo Scientific. Analysis was run on a reverse phase C18 column (ODS-AM, 250 mm x 4.6 mm i.d., particles 5 µm, pores 120 Å, YMC-Pack ODS AM12S05-2546WT) injection of 12.5 µL and detection using an UV detector at 260 nm (PDA Plus Detector). Elution rate at 1 ml.min⁻¹, at 20°C with a gradient of acetic acid (A) and acetonitrile (B) as follows: initial conditions 15% B, maintained for 5.5 min, then a linear rise to 40 min up to 40% B then a decrease from 40 min to 50 min down to 15% B, held for 10 min. The total run time was 60 min. Quantification was performed for malonyl, acetyl, glucoside and aglycone forms of glycitin, genistin and daidzin using external calibrations with daidzin, acetyldaidzein, genistin, glycitin, glycitein (LC LAB, Woburn, USA), daidzein, and genistein (Merck, St. Quentin Fallavier, France). Results were expressed in equivalent aglycones with corresponding molar conversion factors (Peñalvo et al., 2004; Song et al., 1998).

- **Volatile compound profile of FSJ**

Volatile compounds were analyzed by headspace (HS) gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) using Turbomatrix HS-40 trap, Clarus 680 gas chromatograph, and Clarus 600T quadrupole mass spectrometer (PerkinElmer, Courtaboeuf). The principle was previously described in detail (Pogačić et al. 2015) Samples of 2.5 ± 0.1 g were placed in 20 mL Perkin Elmer vial) and stored at -20°C until analysis. Compounds were eluted on an Elite WAX ETR column (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm ; Perkin Elmer, Waltham, MA, USA), with helium as the mobile phase, in the following conditions: initial temperature 35°C maintained for 10 min, then increase at $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ up to 230°C . MS was operated within a mass range of m/z 29-206 and detection by ionisation impact at 70 eV. Volatile compounds were identified by comparison to retention indexes, mass spectral data of standards and from the NIST 2008 Mass Spectral Library data (Scientific Instrument Services, Ringoes, NJ, USA). GC-MS data were processed as described by Pogačić et al. (2015). Volatile compounds were quantified using the abundance of one selected mass fragment (m/z), in arbitrary units.

- **Statistical analysis**

Concentrations of compounds and pH values were analyzed as repeated measures with the function aov and compared using the Tukey HSD.test from the package agricolae on R studio (Version 1.0.153 – © 2009-2017 RStudio, Inc.). These analyses were used for each compound to determine if the means of concentrations of distinct FSJ or groups of FSJ significantly differ ($p\text{-value} < 0.1$). Multiple Factorial analysis (MFA) from the FactoMineR package (Lê et al., 2008) was used to present the main differences between FSJ according to their pH value and their profile in oligosaccharides and organic acids. Data from GC-MS were centered and scaled by compound and hierarchically clustered by Ward's minimum variance method and Euclidean distance metric with the hclust function before being plotted by the function pheatmap. Data collected from sensory evaluations were analyzed with the functions textual and descfreq of the package SensoMineR (Lê and Husson, 2008) with a p value < 0.1 to determine FSJ characteristic odors. Some of the odor descriptors were merged according to the list given in supplementary table 2.

c) Results

- **Ability of 276 LAB strains to acidify synthetic media containing different oligosaccharides in 48 and 10h**

Among the 276 LAB strains tested, 83% (228/276) were sucrose-, raffinose- or stachyose-positive within 48h of fermentation (difference superior to pH 0.3 between M-ns and M-suc, M-raf or M-sta) (Figure 18a).

Two hundred and twenty strains (96% of acidifying strains within 48h) were sucrose-positive, including all Streptococcus, 4/5 Leuconostoc, 19/46 Lactococcus (41%) and 140/168

Lactobacillus strains tested (83%) (Supplementary Table 1). Ninety-nine strains were raffinose-positive (Figure 18a): 8/57 Streptococcus, 2/5 Leuconostoc and 89/168 Lactobacillus strains. None of the Lactococcus strains was raffinose-positive (Supplementary Table 1). Sixteen strains were stachyose-positive (Figure 18a): 4/57 Streptococcus, 12/168 Lactobacillus strains but no Lactococcus nor Leuconostoc strains (Supplementary Table 1). Ten of the 276 strains tested were simultaneously sucrose-, raffinose- and stachyose-positive (Figure 18a).

The number of strains capable of acidifying synthetic media containing oligosaccharides within 10h of fermentation fell to 169 (61% of the 276 strains tested; 74% of the 228 acidifying strains within 48h of fermentation). Among these strains, 167 were sucrose-positive (51/57 Streptococcus, 2/5 Leuconostoc, 13/46 Lactococcus and 101/168 Lactobacillus), Eleven were raffinose-positive (1/57 Streptococcus, 10/168 Lactobacillus and no Leuconostoc or Lactococcus strains) and three belonging to the Lactobacillus genus were stachyose-positive (Figure 18a and Supplementary Table 1)

- **Ability of 276 LAB strains to acidify soy juice in 48 and 10h**

Among the 276 strains tested, 77% (213/276) representing 23/25 species were positive in terms of acidifying SJ within 48h (pH below 6) (Figure 18b, 16d and Supplementary Table 1). This ability appeared to be species-dependent. Indeed, all strains belonging to the *L. pentosus*, *L. plantarum*, *S. thermophilus*, *L. rhamnosus*, *L. amylovorus*, *L. coryniformis*, *L. kunkeei* and *L. curvatus* species acidified SJ (Figure 18c and Supplementary Table 1). Further, *L. helveticus* and *L. diolivorans* strains tested managed to acidify SJ. Moreover, strains of *S. thermophilus*, *L. amylovorus*, *L. coryniformis*, *L. kunkeei*, *L. pentosus*, and *L. plantarum* only acidified to average pH values of 4.4 ± 0.1 , which was significantly ($p < 0.1$) lower than *L. lactis* and *L. mali* which acidified to average pH values of 5.8 ± 0.1 (Figure 18c and Supplementary Table 1). The number of strains able to acidify soy juice within 10h of fermentation fell to 158 (57% of the 276 strains tested; i.e. 74% of the strains acidifying SJ within 48h), representing 17 species (Figure 18b, 16c and Supplementary Table 1). In this case, the ability to acidify SJ was strain-dependent. Indeed, 89% of *L. pentosus*, *L. plantarum* and *S. thermophilus* strains and 27% of *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii* and *L. lactis* strains acidified SJ within 10h of fermentation (Figure 18d and Supplementary Table 1). The acidification rates were also strain-dependent. For example, within 10h, the first quartile of *S. thermophilus* strains acidified SJ to below pH 4.5 and the fourth quartile acidified it to higher than pH 5.6 (Figure 18d).

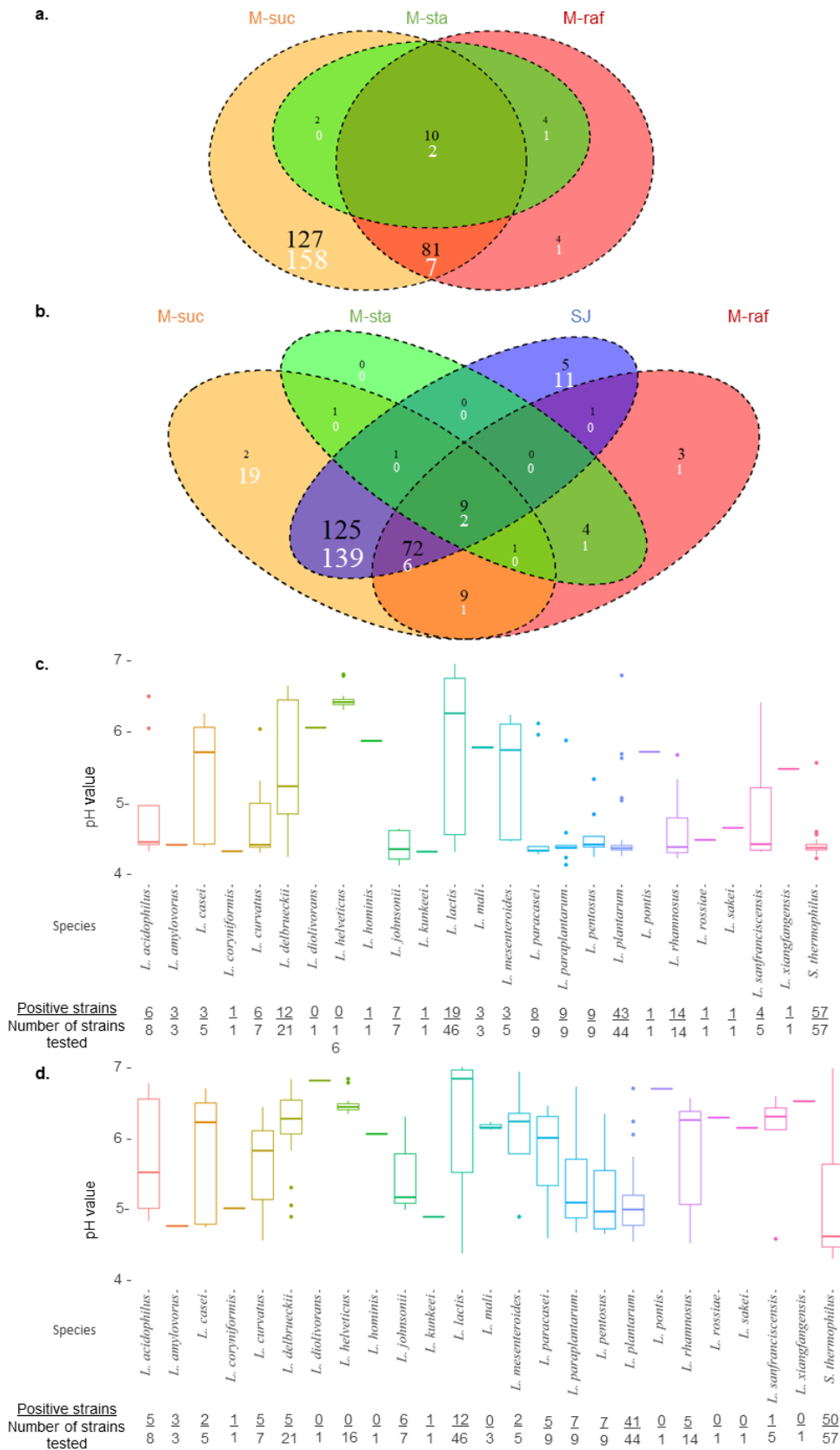


Figure 18. Acidification capacities of 276 strains of lactic acid bacteria, from 25 different species in a synthetic medium containing sucrose (M-suc), raffinose (M-raf), stachyose (M-sta) as the carbon source or in soy juice (SJ). a and b. Venn diagrams show positive acidifying strains in M-suc (orange), M-raf (red), M-sta (green) or SJ (blue) during 48h of fermentation (numbers in black) or 10h of fermentation (numbers in white). c. pH values and proportions of positive acidifying strains in SJ (n=213), i.e. able to acidify SJ to a pH <6 within 48h of fermentation. d. pH values and proportions of strains (n= 158) that could acidify SJ within 10h, i.e. able to acidify SJ to a pH <6 within 10h of fermentation.

○ **Odor profiles of FSJ**

One hundred and twelve strains were selected from the 158 identified as being able to acidify SJ to a pH lower than 6 in 10h. The FSJ were prepared using these 112 strains. About 4,000 words were cited, leading to 244 descriptors, which were further merged in 164 descriptors by grouping those which were similar (for details, see Supplementary Table 2).

The control was characterized by the descriptors “green” and “hay”, which were used significantly more frequently when compared to comments on the FSJ ($p < 0.05$, Supplementary Table 2).

Some species-specific odors were produced by the FSJ during fermentation. The odor of *S. thermophilus* FSJ was more frequently associated with “nuts”, “soy”, “fresh”, “caramel” and “hay” descriptors ($p < 0.001$). These FSJ were also more appreciated, with a higher frequency of “good” descriptors ($p < 0.001$). The odor of *L. plantarum* FSJ was significantly more frequently described as “acid”, “sour”, “floral”, “pineapple”, “spicy”, “cheesy”, “kefir” and “sorrel” ($p < 0.001$), while that of *L. pentosus* FSJ was described as “plastic” ($p < 0.001$), and *L. lactis* FSJ odors were associated with “soy sauce”, “black bread”, “cabbage”, “salty” and “broth” descriptors ($p < 0.001$).

A few FSJ also displayed some peculiar, strain-specific odors; for example, FSJ fermented by *L. acidophilus* CIRM-BIA2087 had a “goat” odor ($p < 0.001$), and seven FSJ fermented by *L. lactis* had a “cabbage” and/or a “broth” odor (Supplementary Table 2; $p < 0.001$). Four other strains belonging to diverse species: *L. lactis* CIRM-BIA1551, *L. plantarum* CIRM-BIA1522, CIRM-BIA2180 and CIRM-BIA2115, produced “floral” odors ($p < 0.001$).

Forty-seven out of 112 FSJ had an odor deemed to be acceptable. These 46 FSJ, fermented by 27 *S. thermophilus* strains, 14 *L. plantarum* strains, 2 *L. pentosus* strains, one *L. lactis* strain, one *L. coryniformis* strain and one *L. delbrueckii* strain were then further characterized.

○ **Carbohydrate consumption and organic acid production in FSJ**

Whichever strain was used to produce FSJ, sucrose was the predominant carbohydrate consumed. Sucrose consumption was accompanied by the production of lactic acid (Table 7). The pH of the 46 FSJ reached values ranging from 4.5 to 5.7. Most strains (35/46) produced significant concentrations of pyruvic acid when compared to the control SJs ($p < 0.1$; Table 7). Most strains (43/46) significantly lower the concentrations of succinic acid in FSJ ($p < 0.1$; Table 7).

The multifactorial analysis (MFA) performed using these results produced three groups of FSJ (Figure 19). The first and second dimensions accounted for 31% and 19% of total variance, respectively. Dim 1 separated FSJ on the basis of acidification intensity, and the

lactic acid content. Dim 2 was positively associated with total sugars, fructose, sucrose, citric acid and succinic acid concentrations and negatively associated with those of acetic acid. Dim 1 clearly separated the controls (unfermented SJs) from all FSJ. The three groups of FSJ, separated on Dim 1 and Dim 2, were i) a *S. thermophilus* group, composed of all 27 *S. thermophilus* FSJ, ii) a group containing the only FSJ fermented by a *L. delbrueckii* strain, and iii) an Lb/Lc group containing the 18 other FSJ (fermented by 14 *L. plantarum*, two *L. pentosus*, one *L. coryniformis* and one *L. lactis*) (Figure 19). The 27 *S. thermophilus* FSJ were characterized by the presence of residual sucrose at 1.1 ± 0.1 g/L, 3.0 ± 0.1 g/L lactic acid, 0.03 ± 0.01 g/L acetic acid, 1.3 ± 0.1 g/L citric acid and an average pH of 4.9 ± 0.1 (Table 7). *L. delbrueckii* CIRM-BIA313, which completely hydrolyzed sucrose, released significant concentrations of glucose and fructose and was the only melibiose-releasing strain ($p < 0.1$ Table 7). The *L. delbrueckii* FSJ was also characterized by a pH of 5.5, 1.6 g/L lactic acid and 0.1 g/L acetic acid. The 18 FSJ in the Lb/Lc group contained 0.3 ± 0.1 g/L sucrose, 2.2 ± 0.1 g/L lactic acid and 0.11 ± 0.01 g/L acetic acid; they did not modify the citric acid content in SJ (1.1 ± 0.1 g/L) and had a pH of 5.5 ± 0.1 . In the Lb/Lc group, one *L. coryniformis*, two *L. pentosus* and three *L. plantarum* strains consumed the totality of sucrose available within 10h of fermentation. In our hands, no peculiar strain was able to use stachyose in 10 h of soy juice fermentation.

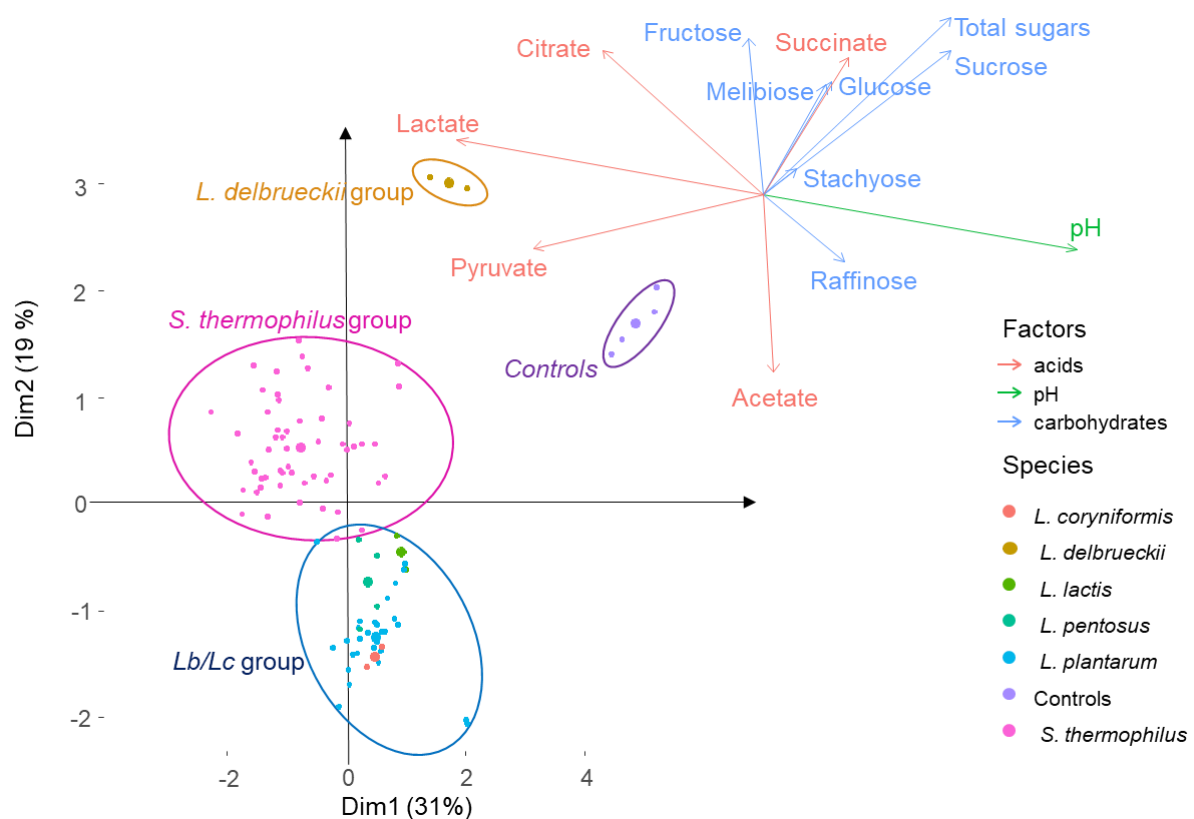


Figure 19. Multiple Factor Analysis (MFA) of oligosaccharides, acid concentrations and pH values in soy juices fermented for 10h by 46 strains of lactic acid bacteria. Results of replicate experiments by strain are represented with dots, and the barycenter of results by species shown using larger dots.

○ Isoflavones in FSJ

The control SJ contained 127 mg/L glycosylated isoflavones, 11 mg/L aglycone isoflavones, 3 mg/L acetylated isoflavones and 8 mg/L malonylated isoflavones, i.e. a total of 149 mg/L of equivalent aglycones (Table 7). The 46 FSJ were analyzed for their isoflavone contents and whatever the strain implemented to produce the FSJ, no significant modifications were found to the concentrations of acetylated, malonylated or total isoflavones. The ratio between glycosylated and aglycone isoflavones was however modified in 18 FSJ (i.e. 14/14 *L. plantarum*, 2/2 *L. pentosus*, 1/1 *L. coryniformis*, 0/27 *S. thermophilus*, 0/1 *L. lactis* and 0/1 *L. delbrueckii* strains), which indicates that these strains displayed isoflavone deglycosylation activity ($p < 0.1$; Table 7). Among these, 12 strains deglycosylated more than 80%, three strains deglycosylated about 60% and one strain about 30% of SJ glycosylated isoflavones (Table 7).

○ Volatile compounds in FSJ

Thirty-five volatile compounds were identified in FSJ (Table 8). Four groups of strains were distinguished by hierarchical clustering as a function of their volatile compound profiles (Figure 4), referred to as A, B, C and D. Group A only contained the controls (unfermented SJs) and was characterized by significantly more 2-pentylfuran than the other groups ($p < 0.1$). Most other volatile compounds (32/35) were present at significantly lower concentrations ($p < 0.1$) in group A than in at least one other FSJ. Group B contained four *S. thermophilus* FSJ and *L. delbrueckii* CIRM-BIA313 and Group C contained the other 23 *S. thermophilus* FSJ. Group D corresponded to the Lb/Lc group identified by MFA analysis (section 3.4) and was made up of the 18 FSJ fermented by fourteen *L. plantarum*, two *L. pentosus*, one *L. coryniformis* and one *L. lactis* strains. Groups B and C were distinguished from groups A and D by significantly higher quantities ($p < 0.1$) of a range of aldehydes (benzaldehyde and butanal), carbonyl compounds (2-hydroxypentan-3-one, 2,4-dimethylpentan-3-one, butane-2,3-dione) and alcohols (propan-1-ol, furan-2-ylmethanol). Groups B and C differed from each other by significantly higher concentrations of pentane-2,3-dione, heptane-2,3-dione, methyl acetate and ethyl acetate ($p < 0.1$) in group C, and significantly higher concentrations of 2,4-dimethylbenzaldehyde ($p < 0.1$) in group B. Group D was differentiated from the other groups by its significantly higher concentrations of four acids (acetic, butanoic, pentanoic and hexanoic acids), two carbonyl compounds (1-hydroxypropan-2-one and 3-hydroxybutan-2-one) and two alcohols (2-methylpropan-1-ol and ethanol) ($p < 0.1$).

Table 8. Volatile compounds identified in soy juices after 10h of fermentation with 46 lactic acid bacteria strains. (“FoodB,” ; “The Good Scents Company” 2019)

CAS Number	Volatile compounds (IUPAC Name)	Odor descriptor ^a	m/z	Identification ^b	Linear Retention Index, calculated	P value ^c
123-72-8	butanal	apple;brady;chocolate;earthy;fatty	72	DB,LRI,S	802	1.2E-19
79-20-9	methyl acetate	bitter;ether;fruity;sweet	43	DB,LRI	814	1.5E-07
141-78-6	ethyl acetate	anise;balsam;ethereal;fruity;green	43	DB,LRI,S	866	1.2E-05
590-86-3	3-methylbutanal	chocolate;ethereal;malt;fatty;peach;	58	DB,LRI,S	896	1.5E-09
431-03-8	butane-2,3-dione	butter;vinegar;coffee;caramel;creamy	86	DB,LRI,S	969	1.4E-21
71-23-8	propan-1-ol	alcohol;fermented;fusel;musty;peanut	31	DB,LRI	1041	7.2E-20
600-14-6	pentane-2,3-dione	butter;caramel;cheese;cream;nutty	100	DB,LRI	1058	3.3E-07
64-17-5	ethanol	alcoholic;ethereal	31	DB,LRI	1058	3.6E-10
66-25-1	hexanal	fatty;fruity;green;fresh;sweaty	44	DB,LRI	1075	1.1E-14
78-83-1	2-methylpropan-1-ol	bitter;ether;solvent;wine	33	DB,LRI	1119	3.1E-11
565-80-0	2,4-dimethylpentan-3-one	acetone	71	DB,LRI	1140	7.7E-18
96-04-08	heptane-2,3-dione	butter;cheese;oily	85	DB,LRI	1151	1.8E-04
71-36-3	1-butanol	balsam;fruit;oil;vanilla;fusel	56	DB,LRI	1161	5.1E-10
110-43-0	heptan-2-one	cinnamon;woody;coconut;fruity;herbal	71	DB,LRI,S	1177	5.8E-04
3777-69-3	2-pentylfuran	beany;butter;earthy;fruity;green	81	DB,LRI	1220	1.5E-01
71-41-0	1-pentanol	balsam;fusel;oil;sweet;vanilla	70	DB,LRI	1264	1.7E-01
513-86-0 ou 5	3-hydroxybutan-2-one	butter;cream;fatty;dairy;sweet	43	DB,LRI	1276	7.2E-11
116-09-6	1-hydroxypropan-2-one	caramelic;ethereal;pungent;sweet	43	DB,LRI	1292	2.9E-08
18829-55-5	(2E)-hept-2-enal	fatty;green	41	DB,LRI	1332	5.2E-08
626-89-1	4-methylpentan-1-ol	nutty	56	DB,LRI	1332	1.1E-08
5704-20-1	2-hydroxypentan-3-one	truffle,nutty,earthy	57	DB,LRI	1351	2.3E-11
64-19-7	acetic acid	sour;acetic;vinegar	60	DB,LRI,S	1447	1.1E-08
13679-85-1	2-methylthiolan-3-one	sulfur;fruit;berry	60	DB,LRI	1494	7.0E-23
100-52-7	benzaldehyde	almond;walnut;cinnamon,bitter;cherry	106	DB,LRI,S	1520	1.5E-10
15764-16-6	2,4-dimethylbenzaldehyde	almond;cherry;naphtyl;spice;vanilla	134	DB	1801	5.2E-10
107-92-6	butanoic acid	acetic;butter;cheese;fruit;rancid	60	DB,LRI,S	1625	1.5E-05
503-74-2	3-methylbutanoic acid	fusel;fruit;ether;ferment;creme	60	DB,LRI,S	1666	8.3E-01
98-00-0	furan-2-ylmethanol	alcoholic;bitter;bread;burnt;caramel	53	DB,LRI	1677	2.8E-04
109-52-4	pentanoic acid	acidic;putrid;rancid;sweat;animal	60	DB,LRI,S	1734	3.4E-01
142-62-1	hexanoic acid	cheese;fatty;sour;sweat	60	DB,LRI,S	1839	5.5E-01
111-14-8	heptanoic acid	cheese;rancid;sour;sweat	60	DB,LRI,S	1938	9.7E-01
118-71-8	3-hydroxy-2-methyl-4H-pyran-4-one	baked;bread;candy;caramel;cotton	126	DB,LRI	1946	9.8E-01
60-12-8	1-phenylethan-1-ol	hyacinth;gardenia;fresh;sweet	122	DB,LRI	1952	1.3E-27
124-07-2	octanoic acid	cheese;fatty;rancid;sweat;vegetable	60	DB,LRI,S	2034	1.0E+00
112-05-0	nonanoic acid	cheese;dairy;fat;green;dirty	60	DB,LRI	2124	1.0E+00

In addition, few compounds were only produced by specific strains. For example, two compounds: 1-phenylethan-1-ol, 3-methylbutanoic acid were each present at significantly higher concentrations in only one FSJ. Similarly, 1-pentanol was present at significant higher concentrations in two FSJ, heptane-2-one in three FSJ, butanoic-acid, butanal and hexanal in four FSJ, and ethanol, 4-methylpentan-1-ol, 3methylbutanoic acid and 1-hydroxypropane-2-one in five FSJ (Table 8 and Figure 4).

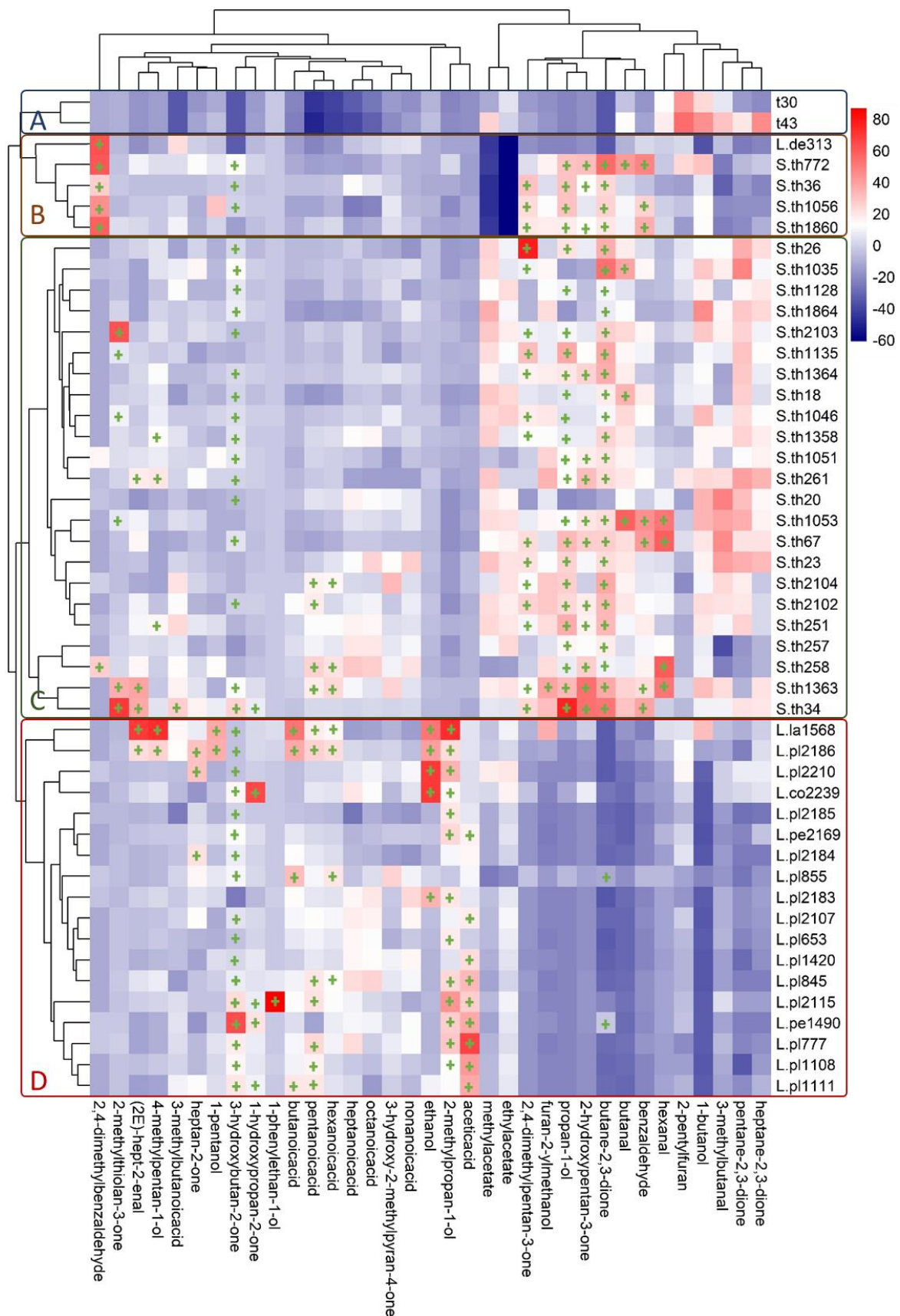


Figure 20. Hierarchical clustering with a heatmap representation based on Ward's minimum variance method and a Euclidean distance metric of the relative concentrations of volatile compounds from 46 fermented soy juices obtained with strains of lactic acid bacteria, clustered in four groups, A, B, C and D. Green crosses notify a significantly higher concentration of volatile compounds in fermented soy juice ($p < 0.1$)

d) Discussion

The fermentation of soy juice depends on the composition of the juice, the LAB strains used as a starter and the fermentation parameters applied. Our study was the first to have compared the ability of 276 LAB strains to ferment soy carbohydrates, i.e. sucrose, raffinose and stachyose, in both a synthetic medium and a commercial soy juice (SJ), during two fermentation periods. These strains were relatively representative of LAB diversity as they included strains isolated over a long period (1950 to 2016) from a variety of products (including different dairy, meat and plant-based products) and different geographic locations (23 countries), and they belonged to 25 LAB species.

- **The ability of LAB to ferment soy juice is related to their use of sucrose but not of raffinose and stachyose**

The utilization of soy carbohydrates by LAB is a prerequisite to the acidification of soy juice. In synthetic media, the catabolism of sucrose, raffinose and stachyose was shown to be both species- and strain-specific. Concerning sucrose, *S. thermophilus*, *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. johnsonii*, *L. rhamnosus*, and *L. acidophilus* appeared to be the species most capable of degrading sucrose, with 100% of sucrose-positive strains within 48h of fermentation ($n \geq 8$). This result was in line with the data in Bergey's Manual (Vos et al., 2009 and Gänzle and Follador 2012), who reported that most *S. thermophilus*, *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. johnsonii*, *L. rhamnosus* and *L. acidophilus* strains are sucrose-positive. Concerning raffinose, *L. plantarum*, *L. johnsonii*, *L. acidophilus* and *L. helveticus* appeared to be appropriate species to degrade it (50% to 75% of raffinose-positive strains, $n \geq 6$). Some results agreed with the data in Bergey's Manual data (Vos et al., 2009), which reported that 11% to 89% of *S. thermophilus*, *L. johnsonii*, *L. acidophilus* strains can use raffinose, but others did not agree with these data (Vos et al., 2009) which reported that more than 90% of *L. plantarum* and *L. pentosus* strains and fewer than 10% of *L. helveticus* strains can use raffinose. *L. acidophilus* also appeared to be efficient in using stachyose (50% of stachyose-positive strains, $n \geq 6$), in accordance with the findings of Wang et al. 2003 who reported stachyose consumption in SJ by another *L. acidophilus* strain. As for the results obtained during 10h of fermentation, few scientific publications have reported LAB acidification rates, so our study is the first to have determined a broad range of LAB rates regarding the use of sucrose, raffinose and stachyose and the fermentation of soy juice.

Most of the strains identified as sucrose-positive in a synthetic medium were also able to ferment SJ (Figure 18b). The ability to use sucrose could therefore be a good criterion for the selection of strains for soy juice fermentation. Sucrose-positive strains mainly belong to ten species achieving fermentation within 48h (Figure 18c) and to *S. thermophilus*, *L. plantarum* and *L. pentosus* species with fermentation within 10h (Figure 18d). Only one strain out of the

strains identified as sucrose-negative and raffinose and/or stachyose-positive was able to ferment SJ in 48h. And for the first time, three species (*L. pontis*, *L. kunkeei* and *L. xiangfangensis*) were identified as being able to ferment SJ.

One drawback affecting the consumption of soy-based food is the presence of non-digestible oligosaccharides such as raffinose and stachyose, as highlighted by Guillon and Champ, 2002. *L. delbrueckii* CIRM-BIA313 displayed a tendency towards raffinose hydrolysis in FSJ. *L. delbrueckii* CIRM-BIA313 released glucose, fructose and melibiose in FSJ ($p < 0.1$; Table 1), suggesting that it produces levansucrase. This strain could therefore be used to alleviate the gastrointestinal discomfort related to the presence of raffinose in fermented soy juice products. According to (Baú et al., 2015; Yoon and Hwang, 2008), who studied kefir cultures containing yeasts and LAB, one *L. mesenteroides* strain and one *L. curvatus* strain were able to reduce concentrations of raffinose and stachyose by up to 30% during 12 h of soy juice fermentation. In our study, it would have been interesting to know if a longer fermentation time could have enabled a more significant reduction of SJ raffinose and stachyose contents. Nevertheless, our results confirmed that the ability to use raffinose and stachyose by LAB in soy juice fermentation is strain-dependent.

○ **Primary metabolites in FSJ**

Two groups of strains could be distinguished from the MFA performed on LAB primary metabolites in FSJ (Figure 19). The *S. thermophilus* group converted a mean 4.4 ± 0.1 g/L content in sucrose into 3.0 ± 0.1 g/L lactic acid, 0.03 ± 0.01 g/L acetic acid and 0.2 ± 0.1 g/L citric acid to reach an average pH of 4.9 ± 0.1 (Table 1). Surprisingly, group D of the FSJ fermented by 18 LAB strains (14 *L. plantarum*, two *L. pentosus*, one *L. lactis*, one *L. coryniformis*) converted more sucrose (5.2 ± 0.1 g/L) into less lactic acid (2.2 ± 0.1 g/L), 0.11 ± 0.01 g/L acetic acid and no citric acid to reach a higher pH of 5.5 ± 0.1 than *S. thermophilus* FSJ. We characterized this discrepancy by calculating their apparent conversion yields of carbohydrates into acids. The apparent yields of the *S. thermophilus* group and Lb/Lc group were 0.7 and 0.4 mol C/mol C, respectively. Our findings therefore agreed with those of Champagne et al. 2009, who reported that under similar conditions, a *S. thermophilus* strain and *L. helveticus* strain displayed similar apparent molar yields of conversion of 0.7 and 0.5 mol C/mol C, respectively. These results can be explained by the fact that group D strains displayed a heterolactic metabolism to ferment the SJ. Heterolactic fermentation is also known to produce CO₂ and ethanol (Holzapfel and Wood, 2014). CO₂ and ethanol were not quantified during our study, although ethanol was detected in some Lb/Lc group FSJ (Figure 4). Heterolactic fermentation can be expected to occur with Lactobacillus strains when sucrose is limited, as suggested by Gänzle 2015, and in agreement with our results (Table 1). However, heterolactic fermentation is not expected with a Lactococcus strain

(Table 1). By contrast, *S. thermophilus* strains mainly use homolactic metabolism, as shown by Hols et al. 2005 in synthetic media. In our study, *S. thermophilus* did not however display a strictly homolactic metabolism to ferment SJ because citric and/or acetic acid concentrations rose in *S. thermophilus* FSJ. Further, the succinic acid content fell in most FSJ, while to the best of our knowledge, the catabolism of succinic acid have been only observed during togwa (maize and malt) fermentation by a complex community containing yeasts and LAB (Mugula et al., 2003).

Isoflavones are soy constituents which might have effects on human health (Munro et al., 2003; Zaheer and Humayoun Akhtar, 2017). Soy contains mostly glycosylated isoflavones (90%) and aglycone isoflavones (10%). Both have the same effect on human health but aglycone isoflavones are more rapidly and better absorbed than their glycosylated forms (Kano et al., 2006). The results of the present study confirm that LAB can deglycosylate isoflavones, as had previously been reported for several *Streptococcus* and *Lactobacillus* strains (Champagne et al., 2010; Chien et al., 2006). Our results also indicate that isoflavone deglycosylation is prevalent in *Lactobacillus*, with 89% of the strains being able to deglycosylate SJ isoflavones while no *S. thermophilus* strain could deglycosylate isoflavones. To the best of our knowledge, no LAB strains have been shown to be able to decrease total isoflavone contents, as it has been described for *Bifidobacteria* (Champagne et al., 2010; Chien et al., 2006).

In brief, our findings show that LAB use a variety of metabolic pathways to ferment SJ. Among the FSJ that produced an odor deemed to be acceptable, *S. thermophilus* FSJ reached the lowest pH in 10h (lower than 5.6).

○ **Odor changes and volatile compounds produced during SJ fermentation**

The “off-flavors” of soy limit the consumption of “yogurt-like” soy products and may be due to compounds such as hexanal and 2-pentylfuran (Kobayashi et al., 1995) which are known to have a “green” odor. As expected, our non-fermented soy juice contained 2-pentylfuran and hexanal, probably detected and described as “green” and “hay” by the judges ($p < 0.1$; Supplementary Table 2). Our results confirmed that fermentation can reduce the concentration of hexanal in a strain- and species-specific manner, as previously reported for diverse *Lactobacillus* and *Streptococcus* strains in SJ fermentation (Blagden and Gilliland, 2005). All but one strain from group D lowered levels of hexanal. Unexpectedly, only four of the *S. thermophilus* strains tested significantly reduced the hexanal content in SJ, and surprisingly, four *S. thermophilus* strains increased hexanal levels in SJ. This increase had never previously been reported. The odors of some *S. thermophilus* FSJ, characterized using “soy”, “fresh” and “hay” descriptors may have been due to high hexanal contents. However, *S. thermophilus* FSJ were also characterized as having “nut”, “caramel”, “almond” and “yogurt”

odors that must have been due to the aldehydes, alcohols and ketones, including 2,3-butanedione (diacetyl, butter related), present in its FSJ. Group D FSJ (10 *L. plantarum*, six *L. pentosus*, one *L. lactis* and one *L. coryniformis*) presented high levels of 3-hydroxybutan-2-one, with “buttery”, “creamy” or “dairy” odors as in the *S. thermophilus* group. Group D FSJ could then present “yogurt-like” odors as in the *S. thermophilus* group, while group D FSJ were more frequently described using a range of strong odors. The “sour”, “acid”, “cheese” and perhaps “sorrel” odors may have been due to the higher concentrations of acetic, butanoic and pentanoic acids in these FSJ, which would mask the “yogurt-like” odors. Sucrose limitation, which induces heterolactic fermentation in lactobacilli, may have been responsible for this marked acid production in Group D FSJ.

Each strain exhibited a specific profile of volatile compounds potentially associated with a peculiar “bouquet” of odors resulting from specific secondary metabolisms in the context of SJ fermentation. FSJ produced using *L. plantarum* CIRM-BIA2115 differed from all other FSJ because of its marked floral/hyacinth odor, which was probably related to the high 1-phenylethan-1-ol levels detected in its FSJ. 1-phenylethan-1-ol had also been shown to be produced by another *L. plantarum* strain in a malt medium (Salmeron et al., 2009). The FSJ odors generated using *L. kunkeei* were associated with uncommon descriptors such as yeast, floral and honey ($p < 0.05$). Other strains in these species could therefore be tested for use in SJ fermentation in order to expand the range of flavors for yogurt-type fermented soy products. Strains that generated peculiar odors such as “cabbage” or “floral” could also be used to produce FSJ not used in yogurt-type products.

In brief, our results show that *S. thermophilus* strains globally generate a more “yogurt-like” odor in FSJ than Lactobacillus or Lactococcus strains. Even so, additional studies are required to evaluate acceptability according to the LAB metabolic profiles in soy juice fermentation.

e) Conclusion

In conclusion, our screening of a broad range of LAB constitutes an important step towards revealing species and strain specificities and selecting strains of interest to ferment soy juice. The focus on primary metabolites confirms that Streptococcus strains are the most effective in acidifying SJ. The screening of LAB strains will probably be of interest regarding the development of offbeat food products. Specific LAB could improve SJ fermentation rates and the health or organoleptic properties of FSJ. The use of strains able to utilize oligosaccharides with aromatic strains could be relevant to optimize plant-based product fermentation. We are currently investigating how pairs of LAB strains can cooperate thanks to their peculiar metabolic profiles to improve the plant-based products fermentation. This broad study confirms the primary metabolism of LAB used to ferment SJ and highlights the diversity

of their secondary metabolism in the fermentation of SJ. Sucrose limitation needs to be investigated as it may induce heterolactic fermentation with *Lactobacillus* or *Lactococcus* strains and therefore be responsible for the production of strong odors. This work has revealed certain species- and strain-dependent characteristics and highlighted the diversity and richness of the metabolic profiles of LAB strains in soy juice fermentation.

- **Acknowledgments**

Our thanks go to all members of the sensory analysis panel: Anne Pautonnier (Triballat Noyal), Thomas Godefroy (Triballat Noyal), Chloé Thoumieux (Triballat Noyal), Marie-Thérèse Genevée (Triballat Noyal), Maud Lion (Triballat Noyal), Marie-Eve Guyader (Triballat Noyal), Marie-Noëlle Madec (INRA STLO) and Sandrine Parayre (INRA STLO).

○ Supplementary data

Supplementary table 1. List of the 276 strains of lactic acid bacteria used and pH values reached after their growth for 10 and 48h in soy juice and in synthetic media containing either 5 g/L sucrose, 5 g/L raffinose or 2 g/L. The list corresponds to 168 *Lactobacillus* sp., 57 *Streptococcus thermophilus*, 46 *Lactococcus* sp. and 5 *Leuconostoc mesenteroides*

CIRM-BIA number	Species	Strain code	Growth medium	Incubation temperature	Biotope	Country of origin	Year of isolation	Value of the pH reached within 10h incubation					Value of the pH reached within 48h incubation				
								Medium with no sugar (M-ns)	Medium with sucrose (M-suc)	Medium with raffinose (M-raf)	Medium with stachyose (M-sta)	Soy juice (SJ)	Medium with no sugar (M-ns)	Medium with sucrose (M-suc)	Medium with raffinose (M-raf)	Medium with stachyose (M-sta)	Soy juice (SJ)
437	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. ac437</i>	MRS	43	ND	ND	1969	6.4	6.2	6.4	6.4	6.8	5.9	4.6	5.0	5.8	4.4
442	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. ac442</i>	MRS	43	fermented milk (sweet acidophilus)	USA	1996	6.0	5.7	6.0	5.9	5.2	5.9	4.4	5.6	5.7	4.5
443	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. ac443</i>	MRS	43	ND	United Kingdom	1996	6.0	6.0	6.1	6.0	6.5	5.7	4.3	4.6	5.1	6.5
446	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. ac446</i>	MRS	43	fermented milk	France	1996	6.0	5.5	6.0	6.0	4.9	5.7	4.4	5.3	5.3	4.4
902	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. ac902</i>	MRS	43	fermented milk	France	1996	5.8	5.5	5.9	5.8	5.9	5.7	4.4	4.6	5.2	4.4
903	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. ac903</i>	MRS	43	fermented milk	France	2001	5.9	5.5	5.9	6.0	5.0	5.7	4.6	5.1	5.2	4.6
904	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. ac904</i>	MRS	43	ND	Mongolia	2000	6.1	6.1	6.1	6.3	6.6	5.8	5.0	5.6	5.4	6.1
2087	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. ac2087</i>	MRS	43	rat intestine	USA	< 1996	5.9	5.3	5.8	5.8	4.8	5.7	4.5	5.0	5.3	4.3
2076	<i>L. amylovorus</i>	<i>L. am2076</i>	MRS	30	ND	ND	2000	6.0	5.5	5.9	5.9	4.8	5.7	4.6	5.4	5.7	4.4
2077	<i>L. amylovorus</i>	<i>L. am2077</i>	MRS	30	hog, anterior small intestinal contents	USA	< 1996	5.9	5.5	5.8	5.9	4.7	5.8	5.1	5.5	5.7	4.4
2078	<i>L. amylovorus</i>	<i>L. am2078</i>	MRS	30	hog, small intestinal contents	USA	< 1996	5.8	5.1	5.7	5.8	4.8	5.7	4.6	5.3	5.6	4.4
667	<i>L. casei/ L. zeae</i>	<i>L. ca667</i>	MRS	30	cheese	ND	2000	6.0	5.2	5.7	5.8	4.7	5.7	5.2	5.3	5.7	4.4
767	<i>L. casei/ L. zeae</i>	<i>L. ca767</i>	MRS	30	cheese (Domiat)	Egypt	1987	5.9	5.4	5.8	5.9	6.2	5.7	5.4	5.7	5.8	5.7
769	<i>L. casei/ L. zeae</i>	<i>L. ca769</i>	MRS	30	ND	ND	< 1996	5.8	5.2	5.7	5.8	4.8	5.6	5.0	5.3	5.6	4.4
771	<i>L. casei/ L. zeae</i>	<i>L. ca771</i>	MRS	30	cheese (Domiat)	Egypt	1987	6.2	5.9	6.0	6.1	6.5	5.8	5.6	5.7	5.8	6.3
2064	<i>L. paracasei</i>	<i>L. pa2064</i>	MRS	30	rice	France	2016	5.9	5.9	5.8	6.0	5.0	5.7	4.9	5.5	5.6	4.4
2065	<i>L. paracasei</i>	<i>L. pa2065</i>	MRS	30	rice	France	2016	5.9	5.8	5.8	5.9	6.3	5.7	4.5	5.4	5.7	4.3
2066	<i>L. paracasei</i>	<i>L. pa2066</i>	MRS	30	peeled millet	France	2016	5.8	5.7	5.7	5.8	5.3	5.7	4.6	5.4	5.6	4.3
2067	<i>L. paracasei</i>	<i>L. pa2067</i>	MRS	30	buckwheat	France	2016	5.8	5.4	5.6	5.7	4.6	5.7	5.2	5.4	5.6	4.4
2239	<i>L. coryniformis</i>	<i>L. co2239</i>	MRS	30	grape must	France	2016	5.8	4.6	5.6	5.7	5.0	5.5	4.2	5.3	5.3	4.3
469	<i>L. curvatus</i>	<i>L. cu469</i>	MRS	30	fermented meat	Germany	1990	5.9	5.2	5.7	5.8	4.9	5.7	5.1	5.3	5.7	4.4
1513	<i>L. curvatus</i>	<i>L. cu1513</i>	MRS	30	sausage	France	2012	6.0	5.3	6.0	6.0	5.9	5.7	4.9	5.4	5.7	4.7
1806	<i>L. curvatus</i>	<i>L. cu1806</i>	MRS	30	fermented wheat	Algeria	2013	5.8	4.9	5.8	5.8	5.4	5.6	4.5	5.3	5.6	4.3
2072	<i>L. curvatus</i>	<i>L. cu2072</i>	MRS	30	buckwheat flour	France	2016	5.8	5.0	5.7	5.7	4.6	5.6	4.5	5.3	5.6	4.4
207	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. de207</i>	MRS	43	artisanal lactic starter (Gruyere de comte)	France	1963	5.6	5.1	5.7	5.6	6.0	5.5	4.5	5.5	5.5	5.1
209	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. de209</i>	MRS	43	artisanal lactic starter (Gruyere de comte)	France	1959	5.5	4.8	5.4	5.5	6.1	5.5	4.4	5.4	5.4	5.0
212	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. de212</i>	MRS	43	artisanal lactic starter (Gruyere de comte)	France	1959	5.5	5.2	5.4	5.4	6.2	5.4	4.5	5.3	5.3	4.6
213	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. de213</i>	MRS	43	artisanal lactic starter (Gruyere de comte)	France	1959	5.4	5.2	5.3	5.3	6.3	5.4	4.6	5.3	5.3	5.2
214	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. de214</i>	MRS	43	artisanal lactic starter (Gruyere de comte)	France	1959	5.6	5.3	5.6	5.5	6.2	5.4	4.3	5.4	5.4	4.3
216	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. de216</i>	MRS	43	artisanal lactic starter (Gruyere de comte)	France	1964	5.5	5.0	5.5	5.4	5.3	5.4	4.6	5.4	5.3	4.8
221	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. de221</i>	MRS	43	artisanal lactic starter (Gruyere de comte)	France	1959	5.5	4.9	5.4	5.4	6.4	5.4	4.3	5.3	5.5	5.9
223	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. de223</i>	MRS	43	artisanal lactic starter (Gruyere de comte)	France	1956	5.5	4.9	5.5	5.5	5.8	5.5	4.4	5.5	5.5	5.0
266	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. de266</i>	MRS	43	Kefir	Russia	1971	5.4	5.1	5.4	5.3	6.0	5.4	4.5	5.4	5.3	4.7
269	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. de269</i>	MRS	43	artisanal lactic starter (Emmental)	Finland	1969	5.8	5.7	5.7	5.8	6.5	5.6	5.3	5.6	5.5	6.3
313	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. de313</i>	MRS	43	sour grain mash	ND	1950	5.9	4.5	6.0	6.0	4.9	5.8	4.4	5.1	5.8	4.4
865	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. de865</i>	MRS	43	artisanal lactic starter (Gruyere de comte)	United Kingdom	2000	5.9	4.5	5.8	5.8	5.0	5.9	4.4	5.1	5.8	4.2
906	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. de906</i>	MRS	43	yak milk	Nepal	1996	6.1	6.0	6.1	6.1	6.6	6.0	5.3	5.5	5.8	6.5
1368	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. de1368</i>	MRS	43	starter (Grana Padano cheese making)	Italia	1988	5.6	4.9	5.7	5.6	6.2	5.6	4.7	5.6	5.6	5.0
1370	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. de1370</i>	MRS	43	whey (from Emmental cheese)	Switzerland	1974	5.7	5.7	5.7	5.7	6.5	5.7	5.4	5.6	5.7	6.4

CIRM-BIA number	Species	Strain code	Growth medium	Incubation temperature	Biotope	Country of origin	Year of isolation	Value of the pH reached within 10h incubation					Value of the pH reached within 48h incubation				
								Medium with no sugar (M-ns)	Medium with sucrose (M-suc)	Medium with raffinose (M-raf)	Medium with stachyose (M-sta)	Soy juice (SJ)	Medium with no sugar (M-ns)	Medium with sucrose (M-suc)	Medium with raffinose (M-raf)	Medium with stachyose (M-sta)	Soy juice (SJ)
1584	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. de1584</i>	MRS	43	artisanal yoghurt	Greece	1960	6.1	6.0	6.1	6.1	6.6	6.0	5.5	5.5	5.8	6.5
1585	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. de1585</i>	MRS	43	artisanal yoghurt	Greece	1961	6.0	6.0	5.9	5.9	6.4	5.8	5.8	5.1	5.5	6.4
1587	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. de1587</i>	MRS	43	artisanal yoghurt	Greece	1987	6.1	6.1	6.1	6.0	6.4	5.9	5.9	5.1	5.5	6.5
1592	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. de1592</i>	MRS	43	artisanal yoghurt	Greece	1986	6.0	6.0	6.0	6.0	6.4	5.9	5.8	5.1	5.5	6.5
2056	<i>L. diolivorans</i>	<i>L. di2056</i>	MRS	30	artisanal sourdough starter	France	2015	6.1	6.2	6.2	6.2	6.8	6.0	5.9	5.8	5.9	6.1
102	<i>L. helveticus</i>	<i>L. he102</i>	MRS	43	artisanal lactic starter (Gruyere de comte)	France	1963	6.4	6.2	6.2	6.2	6.8	6.3	5.3	5.3	6.1	6.8
108	<i>L. helveticus</i>	<i>L. he108</i>	MRS	43	artisanal lactic starter (Gruyere de comte)	France	1954	5.6	5.6	5.6	5.6	6.5	5.6	5.6	5.5	5.6	6.4
109	<i>L. helveticus</i>	<i>L. he109</i>	MRS	43	artisanal lactic starter (Gruyere de comte)	France	1963	5.7	5.5	5.8	5.7	6.4	5.6	5.6	5.6	5.5	6.4
110	<i>L. helveticus</i>	<i>L. he110</i>	MRS	43	artisanal lactic starter (Emmental)	Finland	1962	5.8	5.7	5.8	5.9	6.4	5.6	5.5	5.5	5.5	6.4
111	<i>L. helveticus</i>	<i>L. he111</i>	MRS	43	artisanal lactic starter (Emmental)	France	1963	5.6	5.5	5.6	5.6	6.4	5.6	5.5	5.5	5.5	6.4
112	<i>L. helveticus</i>	<i>L. he112</i>	MRS	43	artisanal lactic starter (Gruyere de comte)	France	1969	5.9	5.8	5.7	5.9	6.4	5.8	5.7	5.8	5.7	6.4
114	<i>L. helveticus</i>	<i>L. he114</i>	MRS	43	ND	Finland	< 1958	6.0	5.9	6.0	6.0	6.3	6.0	5.3	5.4	5.8	6.4
449	<i>L. helveticus</i>	<i>L. he449</i>	MRS	43	fermented milk (Koumiss, cow milk)	Russia	1971	6.2	6.2	6.2	6.2	6.5	6.0	5.5	5.2	6.1	6.5
451	<i>L. helveticus</i>	<i>L. he451</i>	MRS	43	ND	China	1986	5.7	5.6	5.6	5.7	6.4	5.6	5.5	5.5	5.6	6.4
679	<i>L. helveticus</i>	<i>L. he679</i>	MRS	43	artisanal lactic starter (Gruyere de comte)	France	1963	5.8	5.7	5.7	5.7	6.4	5.5	5.4	5.4	5.5	6.5
681	<i>L. helveticus</i>	<i>L. he681</i>	MRS	43	fermented milk	France	1976	6.3	6.4	6.4	6.4	6.8	6.2	6.2	5.7	6.2	6.8
1641	<i>L. helveticus</i>	<i>L. he1641</i>	MRS	43	artisanal lactic starter (Grana Padano)	Italia	1988	6.1	6.0	6.1	6.1	6.4	5.9	5.5	5.4	6.0	6.3
1871	<i>L. helveticus</i>	<i>L. he1871</i>	MRS	43	ND	Algeria	2000	6.0	6.1	5.7	6.0	6.5	5.9	5.3	5.3	5.8	6.3
2190	<i>L. helveticus</i>	<i>L. he2190</i>	MRS	43	artisanal lactic starter (Beaufort)	France	1987	5.8	5.6	5.8	5.7	6.4	5.5	5.5	5.7	5.5	6.4
2222	<i>L. helveticus</i>	<i>L. he2222</i>	MRS	43	sourdough	France	1960	6.1	6.1	6.1	6.1	6.3	5.9	5.9	5.2	5.6	6.5
2223	<i>L. helveticus</i>	<i>L. he2223</i>	MRS	43	sourdough	Finland	1950	6.0	6.0	6.0	6.0	6.4	5.9	5.6	5.4	5.7	6.5
651	<i>L. johnsonii</i>	<i>L. jo651</i>	MRS	37	rat	France	1965	5.6	4.7	5.5	5.6	5.1	5.4	4.4	5.2	5.4	4.3
870	<i>L. johnsonii</i>	<i>L. jo870</i>	MRS	37	urethritis	France	2000	5.4	4.5	4.9	5.0	5.0	5.2	4.3	4.7	5.0	4.4
871	<i>L. johnsonii</i>	<i>L. jo871</i>	MRS	37	cheese (cantal)	France	2007	5.4	4.8	5.1	5.3	5.2	5.3	4.4	4.8	5.0	4.6
873	<i>L. hominis</i>	<i>L. ho873</i>	MRS	37	flore digestive de rat	france	2000	5.4	5.1	5.6	5.6	6.0	5.3	4.4	4.8	5.0	5.9
878	<i>L. johnsonii</i>	<i>L. jo878</i>	MRS	37	lactic starter	Germany	1975	5.6	5.4	5.9	5.6	6.3	5.2	4.5	4.7	5.0	4.6
900	<i>L. johnsonii</i>	<i>L. jo900</i>	MRS	37	Fermented milk	France	1995	5.5	5.1	5.7	5.4	5.8	5.2	4.3	4.7	5.0	4.6
901	<i>L. johnsonii</i>	<i>L. jo901</i>	MRS	37	Fermented milk	France	1996	5.4	5.0	5.3	5.3	5.1	5.1	4.3	4.7	4.9	4.2
2079	<i>L. johnsonii</i>	<i>L. jo2079</i>	MRS	37	ND	ND	< 1996	5.5	5.5	5.7	5.6	5.8	5.2	4.3	5.1	5.2	4.1
2238	<i>L. kunkeei</i>	<i>L. ku2238</i>	MRS	30	grape must	France	2016	5.7	4.7	5.4	5.5	4.9	5.4	4.2	4.9	5.7	4.3
50	<i>L. lactis</i>	<i>L. la50</i>	M17	30	ND	Australia	1961	6.7	6.7	6.7	6.7	6.9	6.7	6.7	6.6	6.6	6.8
56	<i>L. lactis</i>	<i>L. la56</i>	M17	30	ND	Poland	< 1964	6.7	6.7	6.7	6.7	7.0	6.7	6.6	6.6	6.6	6.9
81	<i>L. lactis</i>	<i>L. la81</i>	M17	30	cheese starter	New-zealand	1960	6.7	6.7	6.7	6.7	6.9	6.7	6.6	6.6	6.6	6.9
84	<i>L. lactis</i>	<i>L. la84</i>	M17	30	cheese starter	New-zealand	1989	6.7	6.7	6.7	6.7	7.0	6.7	6.6	6.6	6.6	7.0
86	<i>L. lactis</i>	<i>L. la86</i>	M17	30	ND	United Kingdom	< 1954	6.7	6.6	6.7	6.7	6.9	6.7	6.6	6.6	6.7	7.0
88	<i>L. lactis</i>	<i>L. la88</i>	M17	30	fermented milk (Kefir)	Russia	1960	6.7	5.4	6.6	6.7	4.7	6.6	5.3	6.6	6.6	4.4
235	<i>L. lactis</i>	<i>L. la235</i>	M17	30	raw milk (organic producer)	France	2008	6.7	5.3	6.6	6.7	4.5	6.6	5.2	6.6	6.6	4.6
240	<i>L. lactis</i>	<i>L. la240</i>	M17	30	raw milk (organic producer)	France	2008	6.7	6.4	6.7	6.7	6.5	6.6	5.5	6.6	6.6	5.1
242	<i>L. lactis</i>	<i>L. la242</i>	M17	30	raw milk (organic producer)	France	2008	6.7	5.4	6.6	6.7	4.5	6.6	5.3	6.6	6.6	4.6
307	<i>L. lactis</i>	<i>L. la307</i>	M17	30	ND	France	1958	6.7	6.6	6.6	6.7	6.4	6.6	5.9	6.4	6.6	5.0
425	<i>L. lactis</i>	<i>L. la425</i>	M17	30	ND	Poland	1964	6.7	6.7	6.7	6.7	6.9	6.7	6.5	6.6	6.6	6.5

CIRM-BIA number	Species	Strain code	Growth medium	Incubation temperature	Biotope	Country of origin	Year of isolation	Value of the pH reached within 10h incubation					Value of the pH reached within 48h incubation				
								Medium with no sugar (M-ns)	Medium with sucrose (M-suc)	Medium with raffinose (M-raf)	Medium with stachyose (M-sta)	Soy juice (SJ)	Medium with no sugar (M-ns)	Medium with sucrose (M-suc)	Medium with raffinose (M-raf)	Medium with stachyose (M-sta)	Soy juice (SJ)
631	<i>L. lactis</i>	<i>L. la631</i>	M17	30	cheese (Brie)	France	1960	6.7	6.7	6.7	6.7	7.0	6.7	6.6	6.6	6.6	6.9
632	<i>L. lactis</i>	<i>L. la632</i>	M17	30	cheese starter	United Kingdom	1964	6.7	6.7	6.7	6.7	7.0	6.7	6.6	6.6	6.6	7.0
633	<i>L. lactis</i>	<i>L. la633</i>	M17	30	raw milk	France	1969	6.7	6.7	6.7	6.7	6.9	6.7	6.6	6.6	6.6	6.0
636	<i>L. lactis</i>	<i>L. la636</i>	M17	30	fermented milk (Kefir)	Russia	1971	6.7	6.7	6.7	6.7	7.0	6.7	6.6	6.6	6.6	6.9
639	<i>L. lactis</i>	<i>L. la639</i>	M17	30	cheese (Tome de Savoie)	France	1962	6.7	6.7	6.7	6.7	7.0	6.7	6.6	6.6	6.6	6.7
642	<i>L. lactis</i>	<i>L. la642</i>	M17	30	cheese (Domiat)	Egypt	1987	6.7	6.6	6.6	6.7	7.0	6.6	6.5	6.6	6.6	6.8
643	<i>L. lactis</i>	<i>L. la643</i>	M17	30	cheese starter	New-zealand	1989	6.7	6.6	6.7	6.7	7.0	6.7	6.6	6.6	6.6	6.7
644	<i>L. lactis</i>	<i>L. la644</i>	M17	30	cheese (Majojero)	Spain	1989	6.7	5.5	6.6	6.7	4.4	6.6	5.9	6.6	6.6	4.4
648	<i>L. lactis</i>	<i>L. la648</i>	M17	30	yak milk	Nepal	1996	6.7	6.5	6.6	6.7	6.6	6.6	6.5	6.6	6.6	6.6
1205	<i>L. lactis</i>	<i>L. la1205</i>	M17	30	ND	France	1966	6.6	6.5	6.4	6.6	6.9	6.6	6.5	6.5	6.6	6.6
1206	<i>L. lactis</i>	<i>L. la1206</i>	M17	30	ND	France	1966	6.7	5.6	6.7	6.7	5.3	6.7	5.5	6.6	6.6	5.0
1209	<i>L. lactis</i>	<i>L. la1209</i>	M17	30	ND	Poland	1964	6.7	6.0	6.6	6.7	6.6	6.6	5.2	6.6	6.6	4.5
1217	<i>L. lactis</i>	<i>L. la1217</i>	M17	30	ND	Germany	1989	6.7	6.6	6.7	6.7	6.5	6.7	6.1	6.6	6.6	5.3
1219	<i>L. lactis</i>	<i>L. la1219</i>	M17	30	M17 medium	ND	1988	6.6	6.6	6.5	6.6	6.9	6.6	6.6	6.5	6.6	6.2
1220	<i>L. lactis</i>	<i>L. la1220</i>	M17	30	M17 medium	ND	1988	6.7	6.6	6.7	6.7	6.9	6.7	6.6	6.6	6.6	6.9
1223	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. me1223</i>	M17	30	Not documented	Germany	1989	6.7	6.6	6.6	6.7	6.9	6.7	6.4	6.6	6.6	6.1
1548	<i>L. lactis</i>	<i>L. la1548</i>	M17	30	cow raw milk	Brazil	2010	6.7	5.3	6.7	6.7	4.4	6.6	5.3	6.6	6.6	4.4
1551	<i>L. lactis</i>	<i>L. la1551</i>	M17	30	cow raw milk	Brazil	2010	6.7	5.3	6.6	6.6	4.8	6.6	5.2	6.6	6.6	4.4
1554	<i>L. lactis</i>	<i>L. la1554</i>	M17	30	soil	Brazil	2010	6.7	6.6	6.7	6.7	6.9	6.6	6.5	6.6	6.6	6.5
1560	<i>L. lactis</i>	<i>L. la1560</i>	M17	30	cheese (Domiat)	Egypt	1987	6.7	6.7	6.7	6.7	6.9	6.7	6.6	6.6	6.6	6.8
1562	<i>L. lactis</i>	<i>L. la1562</i>	M17	30	cheese (Majojero)	Spain	1987	6.6	6.6	6.6	6.6	6.9	6.6	6.5	6.5	6.5	6.3
1563	<i>L. lactis</i>	<i>L. la1563</i>	M17	30	cheese (Domiat)	Egypt	1987	6.7	6.6	6.7	6.7	7.0	6.6	6.6	6.6	6.6	6.9
1564	<i>L. lactis</i>	<i>L. la1564</i>	M17	30	cheese (Domiat)	Egypt	1987	6.7	6.7	6.6	6.7	7.0	6.7	6.6	6.6	6.6	6.6
1568	<i>L. lactis</i>	<i>L. la1568</i>	M17	30	cheese (Domiat)	Egypt	1987	6.7	6.3	6.7	6.7	5.0	6.6	5.3	6.6	6.6	4.4
1571	<i>L. lactis</i>	<i>L. la1571</i>	M17	30	raw milk	France	1977	6.7	6.5	6.7	6.7	6.1	6.7	5.5	6.6	6.6	5.1
1572	<i>L. lactis</i>	<i>L. la1572</i>	M17	30	milk	France	1989	6.7	6.6	6.6	6.7	6.6	6.6	6.5	6.6	6.6	6.6
1578	<i>L. lactis</i>	<i>L. la1578</i>	M17	30	cheese (Domiat)	Egypt	1987	6.7	6.6	6.6	6.6	6.9	6.6	6.6	6.5	6.6	6.6
1646	<i>L. lactis</i>	<i>L. la1646</i>	M17	30	ND	New-zealand	1959	6.7	5.3	6.6	6.7	4.7	6.6	5.3	6.6	6.6	4.4
1862	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl1862</i>	M17	30	ND	ND	2000	6.7	6.5	6.7	6.7	6.7	6.7	6.5	6.6	6.6	6.8
1973	<i>L. lactis</i>	<i>L. la1973</i>	M17	30	raw milk	France	2015	6.7	5.4	6.6	6.7	4.4	6.6	5.3	6.6	6.6	4.4
2008	<i>L. lactis</i>	<i>L. la2008</i>	M17	30	cheese (Brie)	France	1960	6.8	6.7	6.7	6.8	6.6	6.6	6.0	6.6	6.6	4.5
2200	<i>L. lactis</i>	<i>L. la2200</i>	M17	30	grape must	France	2016	6.7	6.7	6.7	6.7	6.9	6.6	6.5	6.6	6.6	6.7
2201	<i>L. lactis</i>	<i>L. la2201</i>	M17	30	grape must	France	2016	6.7	5.4	6.6	6.7	4.9	6.6	5.3	6.6	6.6	4.4
2276	<i>L. lactis</i>	<i>L. la2276</i>	M17	30	ND	France	< 1965	6.8	6.7	6.7	6.8	6.8	6.7	6.1	6.7	6.7	5.5
2277	<i>L. lactis</i>	<i>L. la2277</i>	M17	30	ND	France	< 1965	6.8	6.7	6.7	6.7	6.6	6.8	6.6	6.7	6.7	6.2
2278	<i>L. lactis</i>	<i>L. la2278</i>	M17	30	ND	France	< 1965	6.7	5.1	6.7	6.7	4.6	6.7	5.7	6.7	6.7	4.3
2287	<i>L. lactis</i>	<i>L. la2287</i>	M17	30	grape must	France	2016	6.8	6.7	6.7	6.7	6.8	6.7	6.6	6.6	6.6	6.2
2218	<i>L. mali</i>	<i>L. ma2218</i>	MRS	30	grape must	France	2016	5.9	5.5	5.9	5.9	6.1	5.5	4.3	5.3	6.0	5.8
2219	<i>L. mali</i>	<i>L. ma2219</i>	MRS	30	grape must	France	2016	5.9	5.6	5.9	5.9	6.1	5.9	4.3	5.4	5.6	5.8
2241	<i>L. mali</i>	<i>L. ma2241</i>	MRS	30	grape must	France	2016	5.9	5.7	5.9	5.9	6.2	6.0	4.3	5.4	5.3	5.8
433	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. me433</i>	MRS	30	cheese	Japan	1989	6.1	5.9	5.9	6.1	6.2	5.7	4.9	5.5	5.6	6.2

CIRM-BIA number	Species	Strain code	Growth medium	Incubation temperature	Biotope	Country of origin	Year of isolation	Value of the pH reached within 10h incubation					Value of the pH reached within 48h incubation				
								Medium with no sugar (M-ns)	Medium with sucrose (M-suc)	Medium with raffinose (M-raf)	Medium with stachyose (M-sta)	Soy juice (SJ)	Medium with no sugar (M-ns)	Medium with sucrose (M-suc)	Medium with raffinose (M-raf)	Medium with stachyose (M-sta)	Soy juice (SJ)
435	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. me435</i>	MRS	30	goat cheese	France	1992	6.1	5.7	6.0	6.1	5.8	5.7	4.4	5.5	5.6	4.5
1184	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. me1184</i>	MRS	30	goat cheese	France	1999	5.8	4.9	5.7	5.9	4.9	5.4	4.3	5.0	5.4	4.5
1303	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. me1303</i>	MRS	30	goat farm cheese	France	1990	5.9	5.9	5.9	6.1	6.3	5.6	4.5	5.2	5.6	5.7
656	<i>L. curvatus</i>	<i>L. cu656</i>	MRS	30	sauerkraut	Poland	1997	5.9	5.9	6.0	5.9	6.3	5.9	5.7	5.1	6.0	5.3
770	<i>L. paracasei</i>	<i>L. pa770</i>	MRS	30	fermented drink	Japan	1971	5.9	5.8	5.9	5.8	6.3	5.8	5.6	5.7	5.8	6.1
1443	<i>L. curvatus</i>	<i>L. cu1443</i>	MRS	30	silage	France	1978	5.9	5.3	5.9	5.8	5.8	5.7	4.7	5.7	5.7	4.4
1445	<i>L. paracasei</i>	<i>L. pa1445</i>	MRS	30	sugar cane fermented	France	1996	6.0	5.7	5.9	5.9	6.3	5.7	4.6	5.4	5.7	4.3
1446	<i>L. sakei</i>	<i>L. sa1446</i>	MRS	30	starter bakery	France	1971	6.0	4.9	6.0	6.0	6.1	6.0	4.7	6.0	6.0	4.7
1458	<i>L. curvatus</i>	<i>L. cu1458</i>	MRS	30	sauerkraut	Poland	1997	5.9	5.7	6.0	6.0	6.4	6.0	5.7	5.6	5.9	6.0
1517	<i>L. paracasei</i>	<i>L. pa1517</i>	MRS	30	silage	France	2012	5.9	5.8	5.9	5.9	6.4	5.8	5.4	5.7	5.8	6.0
1869	<i>L. paracasei</i>	<i>L. pa1869</i>	MRS	30	birch sap	France	2015	5.8	5.7	5.7	5.7	5.8	5.6	5.2	5.3	5.6	4.3
2048	<i>L. paracasei</i>	<i>L. pa2048</i>	MRS	30	artisanal sourdough starter	France	2015	6.0	5.5	6.0	5.9	6.0	6.0	4.6	6.0	6.1	4.3
670	<i>L. paraplantarum</i>	<i>L. pa670</i>	MRS	30	beer	France	1995	5.7	4.8	5.6	5.7	4.8	5.4	4.6	4.7	5.3	4.4
775	<i>L. paraplantarum</i>	<i>L. pa775</i>	MRS	30	silage	France	2000	5.9	5.8	5.7	5.7	5.7	5.4	5.2	5.2	5.4	5.9
778	<i>L. paraplantarum</i>	<i>L. pa778</i>	MRS	30	fermented milk	France	1990	6.1	5.7	6.2	6.1	5.0	5.6	4.6	5.4	5.6	4.4
779	<i>L. paraplantarum</i>	<i>L. pa779</i>	MRS	30	cheese (cantal)	France	1991	6.4	6.1	6.4	6.4	6.7	5.7	4.6	5.5	5.7	4.4
782	<i>L. paraplantarum</i>	<i>L. pa782</i>	MRS	30	beer	ND	1995	6.1	5.4	5.7	5.8	4.7	5.6	4.6	4.7	5.5	4.1
785	<i>L. paraplantarum</i>	<i>L. pa785</i>	MRS	30	sauerkraut	Poland	1997	5.9	5.2	5.6	5.7	4.9	5.5	4.6	4.8	5.3	4.4
1527	<i>L. paraplantarum</i>	<i>L. pa1527</i>	MRS	30	sausage	France	2012	5.8	5.2	5.7	5.7	5.1	5.6	4.6	5.2	5.5	4.4
2279	<i>L. paraplantarum</i>	<i>L. pa2279</i>	MRS	30	ND	ND	< 1996	5.8	4.5	5.4	5.7	5.1	5.5	4.4	5.0	5.5	4.2
2280	<i>L. paraplantarum</i>	<i>L. pa2280</i>	MRS	30	human stool	France	< 1996	5.8	5.5	5.6	5.8	6.3	5.4	5.1	5.2	5.4	4.6
1490	<i>L. pentosus</i>	<i>L. pe1490</i>	MRS	30	cheese (Domiat)	Egypt	1987	5.5	4.5	5.5	5.4	4.7	5.4	4.3	5.0	5.2	4.4
2168	<i>L. pentosus</i>	<i>L. pe2168</i>	MRS	30	olive fermentation	Spain	1991	5.7	4.5	5.6	5.6	4.6	5.2	4.2	4.9	5.3	4.4
2169	<i>L. pentosus</i>	<i>L. pe2169</i>	MRS	30	olive fermentation	Spain	1991	5.5	4.7	5.5	5.5	4.8	5.4	4.2	5.2	5.3	4.4
2170	<i>L. pentosus</i>	<i>L. pe2170</i>	MRS	30	olive fermentation	Spain	1991	5.6	4.6	5.5	5.5	4.7	5.4	4.2	5.2	5.3	4.4
2176	<i>L. pentosus</i>	<i>L. pe2176</i>	MRS	30	olive fermentation	Spain	1991	6.0	5.2	5.8	5.8	5.5	5.4	4.2	5.2	5.7	4.4
2180	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl2180</i>	MRS	30	grape must	France	2016	5.8	4.5	5.4	5.5	4.7	5.3	4.2	5.0	5.6	4.4
2181	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl2181</i>	MRS	30	grape must	France	2016	5.5	4.3	5.4	5.4	4.5	5.3	4.2	5.0	5.4	4.4
2182	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl2182</i>	MRS	30	grape must	France	2016	5.5	4.3	5.4	5.4	4.7	5.3	4.2	5.0	5.6	4.4
2183	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl2183</i>	MRS	30	grape must	France	2016	5.5	4.5	5.4	5.5	4.9	5.3	4.2	5.1	5.3	4.3
2184	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl2184</i>	MRS	30	grape must	France	2016	5.7	5.0	5.7	5.7	5.1	5.5	4.4	5.1	5.4	4.4
2185	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl2185</i>	MRS	30	grape must	France	2016	5.6	4.4	5.4	5.5	5.1	5.4	4.2	4.9	5.3	4.4
2186	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl2186</i>	MRS	30	grape must	France	2016	5.6	4.5	5.4	5.6	5.0	5.3	4.2	5.0	5.4	4.3
2283	<i>L. pentosus</i>	<i>L. pe2283</i>	MRS	30	cheese (Domiat)	Egypt	1987	5.7	4.7	5.6	5.7	5.0	5.5	4.7	5.3	5.4	4.5
2284	<i>L. pentosus</i>	<i>L. pe2284</i>	MRS	30	fermented olives	Spain	1986	5.8	5.5	5.6	5.7	6.1	5.5	4.9	5.2	5.4	5.3
2285	<i>L. pentosus</i>	<i>L. pe2285</i>	MRS	30	fermented olives	Spain	1986	5.8	5.5	5.6	5.7	6.3	5.5	4.9	5.1	5.5	4.8
2286	<i>L. pentosus</i>	<i>L. pe2286</i>	MRS	30	fermented olives	Spain	1986	5.8	4.8	5.6	5.8	5.5	5.6	4.5	5.3	5.6	4.2
652	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl652</i>	MRS	30	artisanal fermented pickles	Poland	1997	5.8	4.7	5.5	5.7	5.0	5.5	4.4	5.1	5.4	4.4
653	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl653</i>	MRS	30	yak milk	France	1972	5.8	4.7	5.6	5.7	4.9	5.6	4.7	4.7	5.5	4.4
777	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl777</i>	MRS	30	cheese (Majojero)	Spain	1989	5.6	4.5	5.4	5.5	5.3	5.5	4.4	5.4	5.2	4.3
781	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl781</i>	MRS	30	fermented pork	Thailand	1994	5.6	4.3	5.4	5.6	4.9	5.5	4.4	5.0	5.4	4.3

CIRM-BIA number	Species	Strain code	Growth medium	Incubation temperature	Biotope	Country of origin	Year of isolation	Value of the pH reached within 10h incubation					Value of the pH reached within 48h incubation				
								Medium with no sugar (M-ns)	Medium with sucrose (M-suc)	Medium with raffinose (M-raf)	Medium with stachyose (M-sta)	Soy juice (SJ)	Medium with no sugar (M-ns)	Medium with sucrose (M-suc)	Medium with raffinose (M-raf)	Medium with stachyose (M-sta)	Soy juice (SJ)
845	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl845</i>	MRS	30	cheese (Domiaty)	Egypt	1987	5.6	4.4	5.3	5.5	4.8	5.4	4.4	4.8	5.3	4.3
853	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl853</i>	MRS	30	cheese (Majojero)	Spain	1986	5.8	5.6	5.7	5.7	5.1	5.6	4.6	4.8	5.4	4.5
854	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl854</i>	MRS	30	fermented olives	Spain	1986	5.6	5.2	5.6	5.6	5.7	5.4	4.4	5.4	5.3	5.6
855	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl855</i>	MRS	30	cheese	Spain	1991	5.6	4.5	5.4	5.6	5.2	5.5	4.4	5.4	5.4	4.3
1105	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl1105</i>	MRS	30	Ogi (fermented corn)	France	1971	5.8	5.3	5.6	5.7	5.0	5.6	4.7	4.8	5.5	4.4
1106	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl1106</i>	MRS	30	silage	France	1978	5.8	5.1	5.6	5.8	5.1	5.6	4.6	4.8	5.4	4.4
1108	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl1108</i>	MRS	30	starter bakery	Italia	1991	5.8	5.2	5.6	5.7	4.9	5.5	4.6	4.7	5.4	4.4
1110	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl1110</i>	MRS	30	fermented vegetables	France	1996	5.8	5.2	5.7	5.7	5.2	5.5	4.6	4.9	5.4	4.4
1111	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl1111</i>	MRS	30	sugarcane fermented (rum factory)	France	1996	5.5	4.5	5.4	5.5	4.7	5.3	4.3	4.9	5.3	4.4
1419	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl1419</i>	MRS	30	apple juice	France	2012	5.8	5.2	5.7	5.8	5.3	5.3	4.3	5.0	5.3	4.4
1420	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl1420</i>	MRS	30	apple juice	France	2012	5.6	4.4	5.5	5.5	4.7	5.4	4.3	4.9	5.3	4.4
1520	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl1520</i>	MRS	30	cheese	France	2012	5.8	5.0	5.6	5.7	4.6	5.5	4.5	4.8	5.4	4.4
1521	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl1521</i>	MRS	30	sauerkraut	France	2012	5.7	4.4	5.4	5.6	5.0	5.5	4.4	4.8	5.3	4.3
1522	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl1522</i>	MRS	30	sauerkraut	France	2012	5.8	5.3	5.8	5.8	5.4	5.3	4.4	5.0	5.3	4.4
1524	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl1524</i>	MRS	30	silage	France	2012	5.5	5.4	5.4	5.5	6.0	5.3	4.7	5.0	5.3	5.1
1526	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl1526</i>	MRS	30	silage	France	2012	5.7	5.0	5.5	5.5	5.1	5.3	4.5	5.1	5.3	5.0
1532	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl1532</i>	MRS	30	silage	France	2012	5.7	4.4	5.5	5.6	5.0	5.5	4.4	4.8	5.4	4.4
1870	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl1870</i>	MRS	30	birch sap	France	2015	5.8	5.6	5.7	5.7	6.2	5.5	5.2	5.1	5.4	5.7
2029	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl2029</i>	MRS	30	artisanal sourdough starter	France	2015	6.0	5.5	6.0	6.0	5.2	5.7	4.7	5.4	5.6	4.4
2106	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl2106</i>	MRS	30	grape must	France	2016	5.5	4.5	5.4	5.4	4.8	5.3	4.6	5.1	5.1	4.4
2107	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl2107</i>	MRS	30	grape must	France	2016	5.5	4.4	5.2	5.5	4.8	5.3	4.3	5.0	5.3	4.4
2108	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl2108</i>	MRS	30	rhum fermentation, cane juice	France	1995	5.6	4.4	5.5	5.6	5.0	5.6	4.4	5.2	5.4	4.3
2114	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl2114</i>	MRS	30	grape must	France	2016	5.7	4.4	5.4	5.6	4.8	5.4	4.4	5.0	5.4	4.4
2115	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl2115</i>	MRS	30	grape must	France	2016	5.7	4.4	5.4	5.9	4.8	5.4	4.4	4.9	5.3	4.3
2210	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl2210</i>	MRS	30	grape must	France	2016	5.5	4.4	5.4	5.5	4.7	5.4	4.2	5.0	5.3	4.3
2211	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl2211</i>	MRS	30	grape must	France	2016	5.5	4.4	5.3	5.5	4.7	5.3	4.2	4.9	5.3	4.3
2281	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl2281</i>	MRS	30	ND	ND	NA	5.7	4.5	5.5	5.7	4.6	5.4	4.6	4.9	5.4	4.4
2282	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl2282</i>	MRS	30	cheese (Domiaty)	Egypt	1987	5.7	4.5	5.5	5.7	4.8	5.4	4.5	5.2	5.4	4.4
2383	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl2383</i>	MRS	30	grape must	France	2016	5.9	4.9	5.9	5.9	5.1	5.7	4.7	5.5	5.5	4.4
2384	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl2384</i>	MRS	30	grape must	France	2016	5.9	5.4	6.0	5.9	5.2	5.6	4.7	5.2	5.5	4.3
2385	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl2385</i>	MRS	30	grape must	France	2016	5.9	5.3	6.0	6.0	5.2	5.7	4.7	5.2	5.5	4.3
2036	<i>L. pontis</i>	<i>L. po2036</i>	MRS	30	artisanal sourdough starter	France	2015	6.1	6.3	6.4	6.4	6.7	6.3	5.4	5.7	6.2	5.7
774	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rh774</i>	MRS	30	fermented milk (with bifidobacteria)	France	1964	5.9	5.7	5.8	5.8	6.3	5.7	4.6	5.7	5.7	5.3
776	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rh776</i>	MRS	30	cheese (Domiaty)	Egypt	1987	5.8	5.6	5.7	5.8	4.8	5.6	4.8	5.3	5.6	4.4
783	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rh783</i>	MRS	30	fresh cheese	France	2001	5.9	6.0	5.8	5.8	6.1	5.6	5.0	5.5	5.6	4.9
784	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rh784</i>	MRS	30	pharmaceutical preparation	France	1999	6.1	6.2	5.9	5.9	6.6	5.6	5.2	5.6	5.6	5.2
910	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rh910</i>	MRS	30	cheese (Domiaty)	Egypt	1987	5.8	5.3	5.6	5.8	6.5	5.8	4.9	5.5	5.6	5.7
913	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rh913</i>	MRS	30	ND	Egypt	1987	5.9	5.7	5.8	5.8	5.2	5.6	4.9	5.4	5.6	4.4
930	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rh930</i>	MRS	30	fermented milk	France	2001	6.0	5.6	5.7	5.8	6.2	5.6	4.4	5.2	5.5	4.3
1107	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rh1107</i>	MRS	30	pharmaceutical preparation	France	1978	5.9	5.6	5.7	5.8	5.0	5.6	4.9	5.4	5.6	4.4
1112	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rh1112</i>	MRS	30	fermented milk	France	2001	6.0	5.2	5.9	6.0	4.5	5.8	4.9	5.6	5.8	4.4

CIRM-BIA number	Species	Strain code	Growth medium	Incubation temperature	Biotope	Country of origin	Year of isolation	Value of the pH reached within 10h incubation					Value of the pH reached within 48h incubation				
								Medium with no sugar (M-ns)	Medium with sucrose (M-suc)	Medium with raffinose (M-raf)	Medium with stachyose (M-sta)	Soy juice (SJ)	Medium with no sugar (M-ns)	Medium with sucrose (M-suc)	Medium with raffinose (M-raf)	Medium with stachyose (M-sta)	Soy juice (SJ)
1436	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rh1436</i>	MRS	30	cheese (Domiat)	Egypt	1987	5.8	5.6	5.6	5.9	6.3	5.6	4.4	5.0	5.5	4.2
2116	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rh2116</i>	MRS	30	ND	France	1956	5.7	5.6	5.6	5.6	6.4	5.6	4.3	5.1	5.5	4.3
2120	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rh2120</i>	MRS	30	ND	ND	1965	5.7	5.4	5.6	5.7	4.8	5.6	5.1	5.3	5.6	4.4
2131	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rh2131</i>	MRS	30	cheese (Domiat)	Egypt	1987	5.8	5.4	5.5	5.9	6.4	5.4	4.3	4.9	5.3	4.3
2134	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rh2134</i>	MRS	30	cheese (Domiat)	Egypt	1987	5.8	5.4	5.6	5.7	6.3	5.7	4.3	5.5	5.6	4.3
1989	<i>L. sanfranciscensis</i>	<i>L. sa1989</i>	MRS	30	sourdough	USA	1971	6.2	5.4	6.1	6.1	4.6	6.0	4.7	5.8	6.0	4.4
2022	<i>L. sanfranciscensis</i>	<i>L. sa2022</i>	MRS	37	artisanal sourdough starter	France	2015	5.9	6.0	6.2	6.2	6.4	6.3	6.2	6.3	6.3	4.3
2025	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pl2025</i>	MRS	37	artisanal sourdough starter	France	2015	5.8	5.2	5.8	5.9	5.5	5.6	4.8	5.5	5.6	4.4
2033	<i>L. rossiae</i>	<i>L. ro2033</i>	MRS	37	artisanal sourdough starter	France	2015	5.8	5.8	6.1	6.0	6.3	6.2	6.1	6.2	6.2	4.5
2035	<i>L. sanfranciscensis</i>	<i>L. sa2035</i>	MRS	37	artisanal sourdough starter	France	2015	6.0	6.1	6.3	6.3	6.1	6.3	6.3	6.3	6.3	4.3
2039	<i>L. sanfranciscensis</i>	<i>L. sa2039</i>	MRS	37	artisanal sourdough starter	France	2015	5.9	6.2	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.2	6.2	5.2
2050	<i>L. sanfranciscensis</i>	<i>L. sa2050</i>	MRS	37	artisanal sourdough starter	France	2015	5.9	6.2	6.2	6.3	6.6	6.3	6.3	6.3	6.3	6.4
2019	<i>L. xiangfangensis</i>	<i>L. xi2019</i>	MRS	30	artisanal sourdough starter	France	2015	5.9	5.8	5.9	5.9	6.5	5.7	4.9	5.7	5.7	5.5
524	<i>L. casei/L. zaeae^t</i>	<i>L. ca524</i>	MRS	30	corn steep liquor	France	1987	6.2	6.0	5.6	5.8	6.7	6.3	5.2	5.7	6.1	6.1
17	<i>S. thermophilus</i>	<i>S. th17</i>	M17	43	ND	ND	<1957	6.7	6.5	6.7	6.7	5.9	6.7	5.7	5.9	6.5	4.3
18	<i>S. thermophilus</i>	<i>S. th18</i>	M17	43	artisanal lactic starter (Gruyere de comte)	France	1967	6.8	5.3	6.7	6.7	4.5	6.7	5.2	6.7	6.6	4.3
19	<i>S. thermophilus</i>	<i>S. th19</i>	M17	43	artisanal lactic starter (Gruyere de comte)	France	1967	6.8	5.2	6.7	6.7	4.3	6.7	5.2	6.7	6.7	4.3
20	<i>S. thermophilus</i>	<i>S. th20</i>	M17	43	pasteurized milk	ND	1961	6.8	5.9	6.7	6.7	5.3	6.8	5.3	6.7	6.7	4.4
23	<i>S. thermophilus</i>	<i>S. th23</i>	M17	43	yaourt	France	1955	6.8	5.8	6.8	6.7	5.8	6.8	5.4	6.8	6.8	4.3
24	<i>S. thermophilus</i>	<i>S. th24</i>	M17	43	artisanal lactic starter (Gruyere de comte)	France	1960	6.8	5.2	6.7	6.8	4.4	6.7	5.2	6.7	6.7	4.3
26	<i>S. thermophilus</i>	<i>S. th26</i>	M17	43	artisanal lactic starter (Gruyere de comte)	France	1959	6.8	5.9	6.7	6.7	5.0	6.7	5.3	6.7	6.7	4.3
28	<i>S. thermophilus</i>	<i>S. th28</i>	M17	43	artisanal lactic starter (Gruyere de comte)	France	1960	6.8	5.6	6.7	6.8	5.1	6.7	5.5	6.7	6.7	4.3
30	<i>S. thermophilus</i>	<i>S. th30</i>	M17	43	artisanal lactic starter (Gruyere de comte)	France	1963	6.8	5.9	6.7	6.8	4.7	6.8	5.6	6.7	6.8	4.3
31	<i>S. thermophilus</i>	<i>S. th31</i>	M17	43	artisanal lactic starter (Emmental)	France	1967	6.8	5.5	6.7	6.7	6.8	6.7	5.3	6.7	6.7	4.3
33	<i>S. thermophilus</i>	<i>S. th33</i>	M17	43	ND	ND	< 1968	6.8	6.6	6.8	6.8	6.4	6.8	6.2	6.8	6.8	5.6
34	<i>S. thermophilus</i>	<i>S. th34</i>	M17	43	ND	ND	< 1969	6.8	5.7	6.8	6.8	4.6	6.7	5.7	6.0	6.5	4.3
36	<i>S. thermophilus</i>	<i>S. th36</i>	M17	43	yaourt starter	France	1971	6.8	6.2	6.7	6.8	5.8	6.8	5.4	6.7	6.7	4.4
37	<i>S. thermophilus</i>	<i>S. th37</i>	M17	43	ND	Finland	2000	6.8	6.2	6.8	6.8	5.7	6.8	6.2	6.8	6.8	4.4
67	<i>S. thermophilus</i>	<i>S. th67</i>	M17	43	lactic starter (yoghurt making)	France	1971	6.8	5.7	6.7	6.8	4.5	6.8	5.6	6.8	6.8	4.4
70	<i>S. thermophilus</i>	<i>S. th70</i>	M17	43	yaourt starter	France	1971	6.8	6.6	6.7	6.8	6.9	6.5	5.3	6.2	6.3	4.6
73	<i>S. thermophilus</i>	<i>S. th73</i>	M17	43	lactic starter (yoghurt making)	France	1971	6.8	6.5	6.7	6.8	5.6	6.8	5.5	6.8	6.8	4.5
251	<i>S. thermophilus</i>	<i>S. th251</i>	M17	43	raw milk (from organic producers)	France	2008	6.6	5.9	6.0	6.5	4.3	6.6	5.7	5.0	6.3	4.3
252	<i>S. thermophilus</i>	<i>S. th252</i>	M17	43	raw milk (from organic producers)	France	2008	6.7	5.5	6.7	6.7	4.4	6.7	5.3	6.7	6.7	4.4
253	<i>S. thermophilus</i>	<i>S. th253</i>	M17	43	raw milk (from organic producers)	France	2008	6.7	6.1	6.7	6.7	5.7	6.7	5.3	6.7	6.7	4.6
255	<i>S. thermophilus</i>	<i>S. th255</i>	M17	43	raw milk (from organic producers)	France	2008	6.7	6.6	6.7	6.7	6.3	6.7	6.0	6.7	6.7	4.4
257	<i>S. thermophilus</i>	<i>S. th257</i>	M17	43	raw milk (from organic producers)	France	2008	6.7	5.5	6.7	6.7	4.4	6.7	5.3	6.7	6.7	4.4
258	<i>S. thermophilus</i>	<i>S. th258</i>	M17	43	raw milk (from organic producers)	France	2008	6.7	6.1	6.6	6.7	4.5	6.6	6.0	6.1	6.5	4.2
260	<i>S. thermophilus</i>	<i>S. th260</i>	M17	43	raw milk (from organic producers)	France	2008	6.8	5.3	6.7	6.7	4.7	6.7	5.3	6.7	6.7	4.4
261	<i>S. thermophilus</i>	<i>S. th261</i>	M17	43	raw milk (from organic producers)	France	2008	6.7	6.0	6.7	6.7	4.9	6.7	5.3	6.7	6.7	4.4
772	<i>S. thermophilus</i>	<i>S. th772</i>	M17	43	yaourt	France	1973	6.8	5.9	6.7	6.7	4.5	6.7	5.5	6.7	6.7	4.4
1035	<i>S. thermophilus</i>	<i>S. th1035</i>	M17	43	artisanal lactic starter (Gruyere de comte)	France	1974	6.8	5.9	6.8	6.8	4.8	6.7	5.5	6.7	6.7	4.4

CIRM-BIA number	Species	Strain code	Growth medium	Incubation temperature	Biotope	Country of origin	Year of isolation	Value of the pH reached within 10h incubation					Value of the pH reached within 48h incubation				
								Medium with no sugar (M-ns)	Medium with sucrose (M-suc)	Medium with raffinose (M-raf)	Medium with stachyose (M-sta)	Soy juice (SJ)	Medium with no sugar (M-ns)	Medium with sucrose (M-suc)	Medium with raffinose (M-raf)	Medium with stachyose (M-sta)	Soy juice (SJ)
251	<i>S. thermophilus</i>	S. th251	M17	43	raw milk (from organic producers)	France	2008	6.6	5.9	6.0	6.5	4.3	6.6	5.7	5.0	6.3	4.3
252	<i>S. thermophilus</i>	S. th252	M17	43	raw milk (from organic producers)	France	2008	6.7	5.5	6.7	6.7	4.4	6.7	5.3	6.7	6.7	4.4
253	<i>S. thermophilus</i>	S. th253	M17	43	raw milk (from organic producers)	France	2008	6.7	6.1	6.7	6.7	5.7	6.7	5.3	6.7	6.7	4.6
255	<i>S. thermophilus</i>	S. th255	M17	43	raw milk (from organic producers)	France	2008	6.7	6.6	6.7	6.7	6.3	6.7	6.0	6.7	6.7	4.4
257	<i>S. thermophilus</i>	S. th257	M17	43	raw milk (from organic producers)	France	2008	6.7	5.5	6.7	6.7	4.4	6.7	5.3	6.7	6.7	4.4
258	<i>S. thermophilus</i>	S. th258	M17	43	raw milk (from organic producers)	France	2008	6.7	6.1	6.6	6.7	4.5	6.6	6.0	6.1	6.5	4.2
260	<i>S. thermophilus</i>	S. th260	M17	43	raw milk (from organic producers)	France	2008	6.8	5.3	6.7	6.7	4.7	6.7	5.3	6.7	6.7	4.4
261	<i>S. thermophilus</i>	S. th261	M17	43	raw milk (from organic producers)	France	2008	6.7	6.0	6.7	6.7	4.9	6.7	5.3	6.7	6.7	4.4
772	<i>S. thermophilus</i>	S. th772	M17	43	yaourt	France	1973	6.8	5.9	6.7	6.7	4.5	6.7	5.5	6.7	6.7	4.4
1035	<i>S. thermophilus</i>	S. th1035	M17	43	artisanal lactic starter (Gruyere de comte)	France	1974	6.8	5.9	6.8	6.8	4.8	6.7	5.5	6.7	6.7	4.4
1046	<i>S. thermophilus</i>	S. th1046	M17	43	yoghurt	Japan	1971	6.8	6.2	6.7	6.8	4.9	6.8	5.8	6.8	6.8	4.4
1048	<i>S. thermophilus</i>	S. th1048	M17	43	lactic starter (yoghurt making)	Bulgaria	1978	6.8	5.7	6.7	6.8	4.4	6.8	5.5	6.8	6.7	4.4
1050	<i>S. thermophilus</i>	S. th1050	M17	43	yoghurt (ewe milk)	Greece	1973	6.8	6.4	6.8	6.8	6.7	6.8	5.4	6.8	6.7	4.6
1051	<i>S. thermophilus</i>	S. th1051	M17	43	lactic starter (yoghurt making)	Mongolia	1974	6.8	5.7	6.7	6.7	4.3	6.6	5.8	4.9	6.3	4.3
1053	<i>S. thermophilus</i>	S. th1053	M17	43	artisanal yoghurt (ewe milk)	Greece	1987	6.8	5.6	6.8	6.8	4.6	6.7	5.5	6.8	6.7	4.4
1055	<i>S. thermophilus</i>	S. th1055	M17	43	yoghurt	France	1990	6.7	5.5	6.7	6.7	4.4	6.8	5.3	6.8	6.7	4.4
1056	<i>S. thermophilus</i>	S. th1056	M17	43	yoghurt	Indonesia	1990	6.8	5.9	6.7	6.7	4.4	6.7	5.5	6.7	6.7	4.4
1057	<i>S. thermophilus</i>	S. th1057	M17	43	lactic starter (yoghurt making)	France	1991	6.8	5.5	6.7	6.8	4.7	6.8	5.4	6.7	6.7	4.4
1059	<i>S. thermophilus</i>	S. th1059	M17	43	yak milk	Nepal	1996	6.7	6.0	6.7	6.8	4.4	6.8	5.5	6.7	6.8	4.4
1120	<i>S. thermophilus</i>	S. th1120	M17	43	lactic starter (yoghurt making)	Bulgaria	1978	6.8	5.6	6.7	6.8	4.5	6.8	5.5	6.8	6.8	4.5
1123	<i>S. thermophilus</i>	S. th1123	M17	43	lactic starter (yoghurt making)	France	1975	6.8	5.5	6.7	6.8	4.4	6.8	5.5	6.8	6.8	4.4
1125	<i>S. thermophilus</i>	S. th1125	M17	43	yoghurt	Greece	1987	6.8	6.6	6.7	6.8	6.9	6.8	6.1	6.8	6.8	5.6
1126	<i>S. thermophilus</i>	S. th1126	M17	43	yoghurt	Greece	1987	6.8	6.8	6.8	6.8	7.0	6.8	5.9	6.7	6.8	4.4
1128	<i>S. thermophilus</i>	S. th1128	M17	43	artisanal yoghurt	Greece	1987	6.8	5.8	6.7	6.8	4.6	6.7	5.6	6.7	6.7	4.4
1131	<i>S. thermophilus</i>	S. th1131	M17	43	yoghurt	Greece	1987	6.8	6.2	6.7	6.8	4.6	6.8	5.8	6.8	6.8	4.5
1134	<i>S. thermophilus</i>	S. th1134	M17	43	yoghurt	Greece	1987	6.8	6.3	6.8	6.8	5.7	6.8	5.7	6.8	6.8	4.6
1135	<i>S. thermophilus</i>	S. th1135	M17	43	yoghurt	Greece	1987	6.8	5.5	6.7	6.8	4.7	6.8	5.3	6.7	6.7	4.3
1358	<i>S. thermophilus</i>	S. th1358	M17	43	artisanal lactic starter (Gruyere de comte)	France	1974	6.8	5.7	6.7	6.8	4.5	6.8	5.6	6.7	6.8	4.4
1360	<i>S. thermophilus</i>	S. th1360	M17	43	cheese	Italia	1962	6.8	6.5	6.8	6.6	5.1	6.8	5.6	6.7	6.8	4.6
1362	<i>S. thermophilus</i>	S. th1362	M17	43	Tomme (cow and sheep milk)	France	1993	6.7	5.4	6.7	6.7	4.5	6.7	5.3	6.7	6.7	4.3
1363	<i>S. thermophilus</i>	S. th1363	M17	43	sheep cheese	France	1993	6.8	5.5	6.7	6.7	4.4	6.7	6.0	6.7	6.7	4.4
1364	<i>S. thermophilus</i>	S. th1364	M17	43	fermented milk	France	1995	6.8	6.2	6.7	6.8	4.5	6.7	5.6	6.7	6.7	4.3
1615	<i>S. thermophilus</i>	S. th1615	M17	43	ND	ND	2000	6.7	5.3	6.7	6.7	4.5	6.7	5.3	6.7	6.7	4.4
1622	<i>S. thermophilus</i>	S. th1622	M17	43	artisanal lactic starter (Gruyere de comte)	France	1973	6.7	5.4	6.7	6.7	4.4	6.7	5.3	6.7	6.7	4.4
1860	<i>S. thermophilus</i>	S. th1860	M17	43	lactoserum Emmental	Austria	1991	6.7	5.9	6.7	6.7	4.5	6.7	5.4	6.7	6.7	4.4
1864	<i>S. thermophilus</i>	S. th1864	M17	43	cheese	Italia	1962	6.7	6.0	6.7	6.7	4.6	6.7	5.3	6.7	6.7	4.4
2063	<i>S. thermophilus</i>	S. th2063	M17	43	cheese (comte)	France	1993	6.8	5.3	6.8	6.8	4.4	6.6	5.9	4.8	6.2	4.3
2102	<i>S. thermophilus</i>	S. th2102	M17	43	lactic starter (Emmental)	Greece	1973	6.8	5.8	6.7	6.8	5.1	6.7	5.6	6.7	6.8	4.5
2103	<i>S. thermophilus</i>	S. th2103	M17	43	cheese	Italia	1962	6.8	6.2	6.8	6.8	4.5	6.6	5.9	4.8	6.2	4.3
2104	<i>S. thermophilus</i>	S. th2104	M17	43	whey (from Emmental cheese)	France	1993	6.7	6.0	6.7	6.7	5.9	6.7	5.3	6.7	6.7	4.4
T	T	T	MRS	30	ND	ND	ND	6.8	6.7	6.7	6.7	7.2	6.7	6.7	6.7	6.7	6.9
T	T	T	MRS	43	ND	ND	ND	6.8	6.7	6.7	6.7	7.2	6.7	6.7	6.7	6.7	6.9

[Click here to get the full version of the supplementary table 1 in excel format](#)

Supplementary table 2. Frequencies of words used by 10 to 14 judges to describe each soy juice fermented for 10h by 112 strains of lactic acid bacteria belonging to 17 different species. The frequencies are also given by species or genus (sum of the frequencies observed for FSJ fermented by strains of the corresponding species or genus). The results of the descfreq statistical test in the FactoMineR package (Lê, Josse, and Husson 2008) indicate the descriptors used significantly more frequently for each product. Bold red for $p < 0.1$, * for $p < 0.05$, ** for $p < 0.01$ and *** for $p < 0.001$.

Names; specie, CIRM-BIA reference or genera of the FSJs	acid	acre	sour	alcohol	aldehyde	almond	bitter	starch	pineapple	animal	anise	clay	seasoning	artichoke
L. ac2087	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>L. acidophilus</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L. am2078	2	0	2	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
<i>L. amylovorus</i>	2	0	2	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
L. ca667	5	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L. casei	5	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L. co2239	10	0	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>L. coryniformis</i>	10	0	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
L. cu469	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>L. curvatus</i>	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L. de313	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L. de865	3	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>L. delbrueckii</i>	6	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
L. jo651	3	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0
L. jo870	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L. jo871	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
L. jo901	2	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>L. johnsonii</i>	7	0	2	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0	1
L. ku2238	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>L. kunkeei</i>	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L. la1548	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L. la1551	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L. la1568	4	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
L. la1646	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L. la1973	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L. la2201	1	0	0	2	0	1	2	0	1	0	0	0	0	0
L. la2278	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L. la235	3	0	1	0	0	0	0	1*	0	0	0	0	0	0
L. la242	4	0	1	0	0	0	0	1*	0	0	0	0	0	0
L. la644	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L. la88	3	0	1*	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>L. lactis</i>	24	1	8	2	0	3	2	2*	1	0	0	0	0	0

[\(Extract of the supplementary table 2\) Click here to get the full version in excel format](#)

E. Conclusion

Cette étude permet d'avoir une mesure de la diversité des capacités des bactéries lactiques à fermenter le jus de soja sélectionné.

Cette étude révèle que les profils métaboliques des BL sont divers. Les caractéristiques qui composaient les profils métaboliques étudiés étaient variables au niveau des espèces et au niveau des souches. Les souches de *Streptococcus thermophilus* sont par exemple globalement les plus efficaces afin d'acidifier le jus de soja. Toutes les souches du genre *Streptococcus* ne sont cependant pas toutes aussi efficaces. Par ailleurs, les variables de ces caractéristiques ne sont pas corrélées. Les souches qui acidifient efficacement le jus de soja ne catabolisent par exemple pas systématiquement l'hexanal présent dans le jus de soja. Les souches n'ont d'ailleurs pas toutes le même rendement de conversion de sucres en acides organiques. Le criblage de BL reste donc incontournable afin de réaliser des produits fermentés originaux.

Il semble cependant y avoir une corrélation entre l'épuisement en saccharose et la production d'acide acétique. Une étude avec le jus HS enrichi en saccharose pourrait permettre de savoir si la limitation en saccharose induit une modification de la fermentation homolactique vers une fermentation mixte chez les souches du genre *Lactobacillus*. Cette adaptation du métabolisme pourrait alors être à l'origine des odeurs acide et aigres détectées dans ces jus de soja fermentés.

Comme nous venons de le montrer, les souches de BL peuvent apporter diverses qualités fonctionnelles, nutritionnelles et organoleptiques lors de la fermentation de jus de soja. Pour améliorer les caractéristiques du produit fermenté, il pourrait donc y avoir un intérêt à associer des souches avec des caractéristiques complémentaires. Cela permettrait de bénéficier des qualités des différentes souches. Il y a cependant peu de connaissances sur les effets de l'association de souches de BL en jus de soja. C'est pourquoi la partie suivante consiste à étudier les effets de l'association de BL en jus de soja.

III. Effets de l'association de bactéries lactiques sur les caractéristiques de la fermentation de jus de soja

A. Introduction

Il y a peu de connaissances sur les effets de l'association de souches de BL pour fermenter du jus de soja (Chapitre 1, Partie IV.D)

Avant de sélectionner les deux souches qui seront étudiées en partie IV et V, divers essais d'associations de souches ont été réalisés (Figure 14). Les objectifs de ces essais étaient d'une part de sélectionner une coculture destinée à être utilisée industriellement pour la fabrication de spécialités fermentées au soja (nommée par la suite coculture « d'application ») et d'autre part de sélectionner une coculture destinée à être étudiée (nommée par la suite coculture « d'études »).

Des duos de souches ont été criblés sur des critères organoleptiques portant sur les produits finis. Il s'agissait de développer un ferment technologique pour fabriquer une spécialité fermentée au soja de type yaourt. Ce criblage a permis de sélectionner la coculture « d'application ». La « sureté » des souches sélectionnées pour cette coculture « d'application » a été évaluée à posteriori (absence de production d'amines biogènes dans les produits fermentés et absence de gènes d'antibiorésistances dans les génomes des souches). Ces essais d'associations répondent ainsi à la question scientifique : quels sont les effets de l'association de bactéries lactiques sur les caractéristiques organoleptiques d'un jus de soja fermenté ? Les associations de souches à sélectionner pour la coculture « d'application » se sont basées sur les résultats de la première publication. La vitesse d'acidification et la diversité des profils aromatiques issues de l'analyse sensorielle ont été prises en compte afin d'associer des souches de façon optimale. Ainsi, les souches qui acidifiaient en moins de 10 h ont été associées avec des souches qui présentaient des caractéristiques organoleptiques appréciées.

Pour la sélection de la coculture dite « d'études », les cocultures ont été criblées sur un critère de vitesse de fermentation du jus de soja. L'objectif était de sélectionner un duo de souches pour lequel on observait une interaction positive sur la vitesse de fermentation du jus de soja, avec un temps de fermentation significativement plus court en coculture par rapport aux monocultures. Dans ce cas, les essais ont permis de répondre à une autre question scientifique : quels sont les effets de l'association de bactéries lactiques sur la vitesse de fermentation du jus de soja ?

B. Matériels et méthodes

Pour répondre à ces questions et afin d'obtenir des cocultures satisfaisantes, la stratégie d'assemblage a consisté à associer des souches avec des caractéristiques intéressantes différentes et donc complémentaires.

1 Stratégies d'associations et de criblage de la coculture « d'application »

1.1 Choix des souches

Pour la coculture dite « d'application », le choix des souches de BL était libre, du moment que les souches étaient qualifiées de « sûres » pour la consommation humaine.

1.2 Stratégie d'association des souches

Les fermentations réalisées devaient répondre à un cahier des charges fixant un taux d'inoculation maximal de 10^7 UFC/mL tout en permettant d'atteindre un pH < 4,7 en moins de 10 h de fermentation. En ce qui concerne les objectifs organoleptiques, le jus de soja fermenté (FSJ) devait être plus apprécié que le jus de soja fermenté avec les ferments actuels lors d'analyses sensorielles réalisées par un jury d'experts interne à Triballat Noyal. Les essais d'associations consistaient ensuite à associer une souche acidifiante, permettant de répondre au cahier des charges techniques, et une souche apportant des caractéristiques organoleptiques intéressantes. Les caractéristiques organoleptiques prises en compte étaient issues des tests de « sniffing » décrits dans la première publication et non issus des profils de volatils. En effet, il n'est pas possible d'extrapoler la qualité organoleptique à partir des données des composés volatils. Par exemple on a cherché à limiter des défauts de saveurs comme les « off-notes » vertes liées à l'hexanal et/ou à apporter des qualités hédoniques, comme des notes lactées ou florales. Quinze souches de cinq espèces différentes ont été sélectionnées grâce aux caractéristiques décrites des BL criblées en partie II. Ces résultats étant confidentiels, les noms des souches ont été codés (Tableau 9).

Tableau 9. Sélection des 15 souches retenues pour la réalisation de la coculture d'application. La colonne pH indique le pH atteint après 10 h de fermentation en monoculture de jus de soja et la colonne Sta indique par le signe '+' si la souche est capable d'acidifier un milieu synthétique contenant du stachyose comme unique source de carbone.

Souche	pH	Sta	Composés volatils (noms IUPAC) et/ou odeurs senties
A	4.5	-	3-hydroxybutan-2-one. Odeur douce, de vanille
B	5.0	-	2,4-dimethylbenzaldehyde. Odeur de jus de soja.
C	4.8	+	2-methylbutanoic acid, 3-hydroxybutan-2-one. Odeur de moisi et de cerise.
D	4.8	+	1-phenylethan-1-ol. Odeur florale, de miel, piquante, de parfum.
E	4.4	-	Propan-1-ol, pentane-2,3-dione, 3-hydroxybutan-2-one, 2,4-dimethylbenzaldehyde, (2E)-hept-2-enal. Odeur de soja.
F	4.5	-	Odeur de noix, de bois, âpre, de frais.
G	4.5	+	Propan-1-ol, butane-2,3-dione, pentane-2,3-dione, 2-methylthiolan-3-one. Odeur de caramel et de chocolat.
H	5.0	-	Odeur de beurre et de Sojasun.
I	4.6	-	2-methylbuten-2-al, butane-2,3-dione. Odeur de bois
J	5.0	+	Odeur de brûlé, sucrée, de cuir, doux, de parfum.
K	5.0	-	Butanoic acid, pentanoic acid, hexanoic acid, hexan-1-ol, 2-methylpropanoic acid. Odeur de saumure et de pain.
L	4.7	-	Éthanol. Odeur de crème.
M	4.4	-	butane-2,3-dione
N	4.9	-	Hexanol, furan-2-methanol, 2-hydroxypentan-3-one. Odeur de carton, chimique, de foin.
P	4.4	-	Propanol, Benzaldehyde, 2,3Butanedione, 2,3Pentanedione, Butanal, 3Thiophenonedihydro2methyl. Odeur de pain, noix

1.3 Production des jus de soja fermentés (FSJ)

À partir de ces 15 souches, les essais ont été réalisés dans les mêmes conditions et avec le même jus de soja qu'en partie II. En coculture, les duos de souches étaient inoculés de manière à ce que la concentration totale de cellules inoculées soit égale à la concentration totale de cellules inoculées en monoculture. Chaque souche constituait 50% des BL inoculées.

Pour chaque essai d'association de souches, les souches étaient également testées en monocultures afin de pouvoir comparer les paramètres de fermentation. Les jus de soja fermentés (FSJ) ainsi obtenus étaient comme en partie II, stockés 14±4 jours à 4°C avant les analyses sensorielles

1.4 Analyses sensorielles

Afin d'observer si les caractéristiques des souches pouvaient se cumuler ou se soustraire, les caractéristiques de texture, d'odeur, de saveur aigre, verte et de goût astringent étaient notées sur les FSJ obtenus. Les dégustations présentées en partie II ont été réalisées avec 8 juges experts. Les consignes étaient cependant différentes à celles décrites en partie II. Les juges devaient d'abord sentir le produit, en noter l'odeur spécifique s'il y en avait une, puis goûter le produit et en noter sur une note de 0 à 5 :

- l'épaisseur (tEp ; 0 étant liquide et 5 très épais)
- l'astringence (gAst ; 0 étant non astringent et 5 très astringent)
- les intensités des saveurs aigre et verte (sAigre et sVert ; 0 pour aucun arôme senti et 5 pour un arôme très intense)

Enfin, les juges devaient donner une note d'appréciation globale du produit. Des grilles d'analyse sensorielle étaient données aux juges pour l'évaluation des produits (Annexe C). L'ordre de dégustation des produits était défini à l'aide de la fonction *optimaldesign* du package SensoMineR. Les séries de dégustations étaient constituées de 9 ± 3 produits par dégustation. Chaque produit était évalué deux fois par chaque juge. Enfin, la capacité des juges à discriminer les produits selon les critères notés a été vérifiée et validée suite à une analyse avec la fonction *panelperf* du package SensoMineR (Annexe D). Lors de cette analyse, l'ensemble des caractéristiques décrites ci-dessus a permis aux juges de discriminer les produits. L'acidité des produits a également été évaluée par mesure du pH.

1.5 Analyses statistiques

Les résultats ont été analysés grâce à la fonction *decat* du package SensoMineR. Cette fonction permet de prendre en compte les effets des différences de notations entre les juges et entre les séances de dégustations. Pour chaque coculture, les notes moyennes obtenues pour le FSJ issu de coculture ont été comparées avec les notes moyennes obtenues par les FSJ issus des monocultures correspondantes.

2 Stratégies d'association et de criblage de la coculture « d'études »

2.1 Choix des souches

Pour la coculture « d'études », les souches de BL qui composaient cette coculture devaient, comme pour la coculture « d'application », être qualifiées de « sûres » pour la consommation humaine mais elles devaient aussi être d'espèces différentes afin de pouvoir différencier les gènes de chacune des souches lors de l'analyse méta-transcriptomique. Par ailleurs, il fallait aussi que les populations de chacune des souches puissent être facilement dénombrées en coculture. Pour cela, les deux souches devaient soit se développer sur des milieux sélectifs différents, soit se développer dans des conditions de fermentations différentes

(i.e. à des températures différentes). L'idée était par exemple d'associer une souche du genre *Streptococcus* qui se développe en milieu M17 avec une souche du genre *Lactobacillus* qui se développe en MRS, ou bien deux *Lactobacillus* correspondant à une souche thermophile (qui se développe à 43°C) et une souche mésophile (qui ne peut pas se développer à 43°C). Enfin, les souches de BL sélectionnées devaient être capables de fermenter le jus de soja en moins de 48 h.

2.2 Stratégie d'association des souches

Pour la coculture « d'études », l'objectif était d'associer deux souches : une souche capable d'acidifier à partir de saccharose et de stachyose et une souche capable d'acidifier uniquement à partir de saccharose.

Dix souches ont été sélectionnées selon les critères cités ci-dessus et grâce aux caractéristiques des BL décrites en partie II de ce chapitre (Tableau 10).

Tableau 10. Sélection des 10 souches intéressantes pour la réalisation de la coculture « d'études ».

Souches qui catabolisent le saccharose		Souches qui catabolisent le stachyose	
Réf. CIRM-BIA	Espèce	Réf. CIRM-BIA	Espèce
1035, 772	<i>S. thermophilus</i>	251, 254	<i>S. thermophilus</i>
1111, 2107	<i>L. plantarum</i>	2241	<i>L. mali</i>
865	<i>L. delbrueckii</i>	2087	<i>L. acidophilus</i>
		777	<i>L. plantarum</i>

2.3 Méthodes de comparaison des cocultures

Afin de sélectionner les cocultures « d'études », les essais ont été réalisés dans les mêmes conditions et avec le même jus de soja que pour la coculture « d'application ». Seule la durée de fermentation était différente : la fermentation était arrêtée après 24 h. Pour les cocultures « d'études », ce sont les cinétiques d'acidification suivies avec l'outil I-CINAC (Ysebaert, Frepillon, France) équipé de sondes Mettler Toledo ISM® qui étaient comparées entre coculture et monocultures et qui ont permis d'observer les effets d'interactions.

C. Résultats

1 Résultats d'essais d'associations de la coculture « d'application »

À partir des 15 souches sélectionnées (Tableau 9), 32 essais d'associations ont été réalisés. Ces résultats ne sont pas présentés dans le détail ici. Seuls les différents cas de figures qui ont été observés sont présentés.

Pour la note d'appréciation globale, un FSJ produit en coculture était jugé meilleur, trois FSJ produits en coculture étaient jugés moins bons, onze FSJ produits en coculture avaient des notes équivalentes à l'un des FSJ en monocultures et 17 FSJ avaient des notes intermédiaires aux deux FSJ en monocultures (Tableau 11).

On peut observer sur les exemples d'associations de BL que les effets sont divers et complexes (Figure 21). Les notes intermédiaires et égales correspondent généralement à des cocultures où il y a peu d'effet de l'association de BL sur la caractéristique observée. Parmi les 32 essais, il y a une majorité de cas d'associations (86%) qui ne présentait pas ou peu d'effets (toutes caractéristiques confondues).

On peut observer que la coculture ne permet pas de diminuer le goût aigre ni la texture épaisse (il n'y a aucune note du goût aigre ou de la texture inférieure en coculture par rapport à la monoculture). À l'inverse, la coculture ne permet pas de moins acidifier (il n'y a aucune valeur de pH supérieure en coculture par rapport à la monoculture) (Tableau 11).

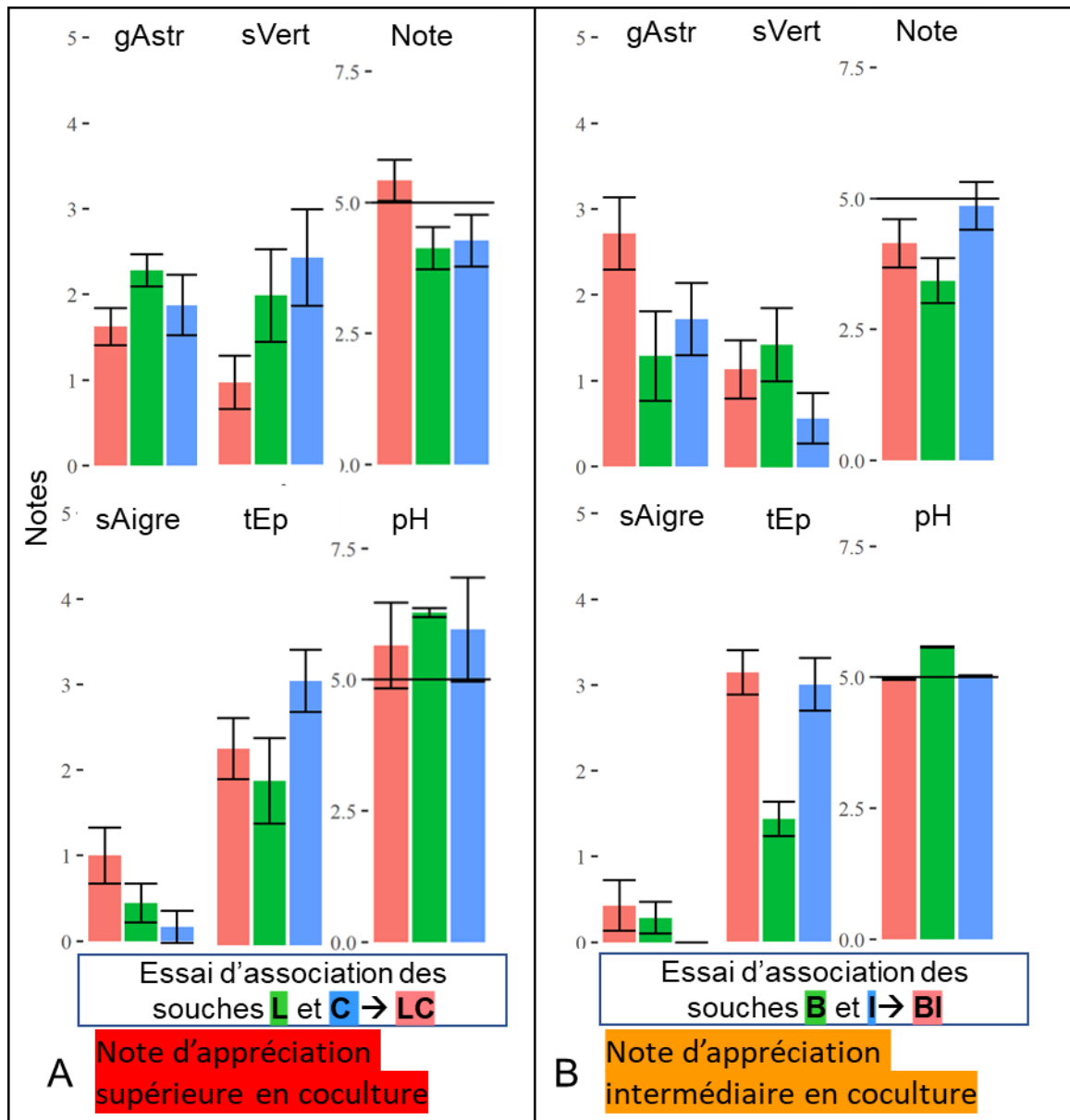
Tableau 11. Nombre d'associations parmi les 32 essais avec des notes (ou un pH) soit supérieures, égales, intermédiaires ou inférieures en coculture par rapport aux monocultures en fonction des différentes caractéristiques. gAstr correspond au goût astringent du produit, sVert à la saveur « verte », sAigre à la saveur aigre, tEp à la de texture épaisse et Note correspond à la note d'appréciation globale du produit.

Note	Caractéristiques					
	gAstr	sAigre	sVert	tEp	Note	pH
Supérieure	4	6	1	5	1	0
Égale	8	5	15	15	11	15
Intermédiaire	18	21	14	12	17	15
Inférieure	2	0	2	0	3	2

Il ne semble pas exister de règle d'association prédéfinie afin d'obtenir un meilleur jus de soja fermenté en coculture qu'en monoculture. En effet, d'après nos résultats, on ne peut pas définir de règle permettant de prévoir si la note d'appréciation globale d'un produit de fermentation d'une coculture sera supérieure à la note des monocultures correspondantes. Aucune corrélation n'a pu être clairement établie.

Les divers cas de figures observés ont été repris ensuite. Par exemple, la note d'appréciation globale d'un produit de coculture peut être supérieure en raison d'une saveur moins verte, d'un goût moins astringent malgré une texture et une saveur aigre similaires à celles des monocultures (Figure 21A). La note d'un produit de coculture peut être intermédiaire du fait d'un goût plus astringent, de saveurs vertes, aigres et d'une texture égale aux produits des monocultures (Figure 21B). La note d'un produit de coculture peut être inférieure aux produits de monocultures du fait d'un goût plus aigre malgré des saveurs vertes, d'un goût astringent similaire et d'une texture plus épaisse que les produits des monocultures (Figure

21C). Enfin, la note d'un produit de coculture peut être égale à la note d'un des produits de monoculture du fait que leurs caractéristiques aient obtenues les mêmes notes (Figure 21D).



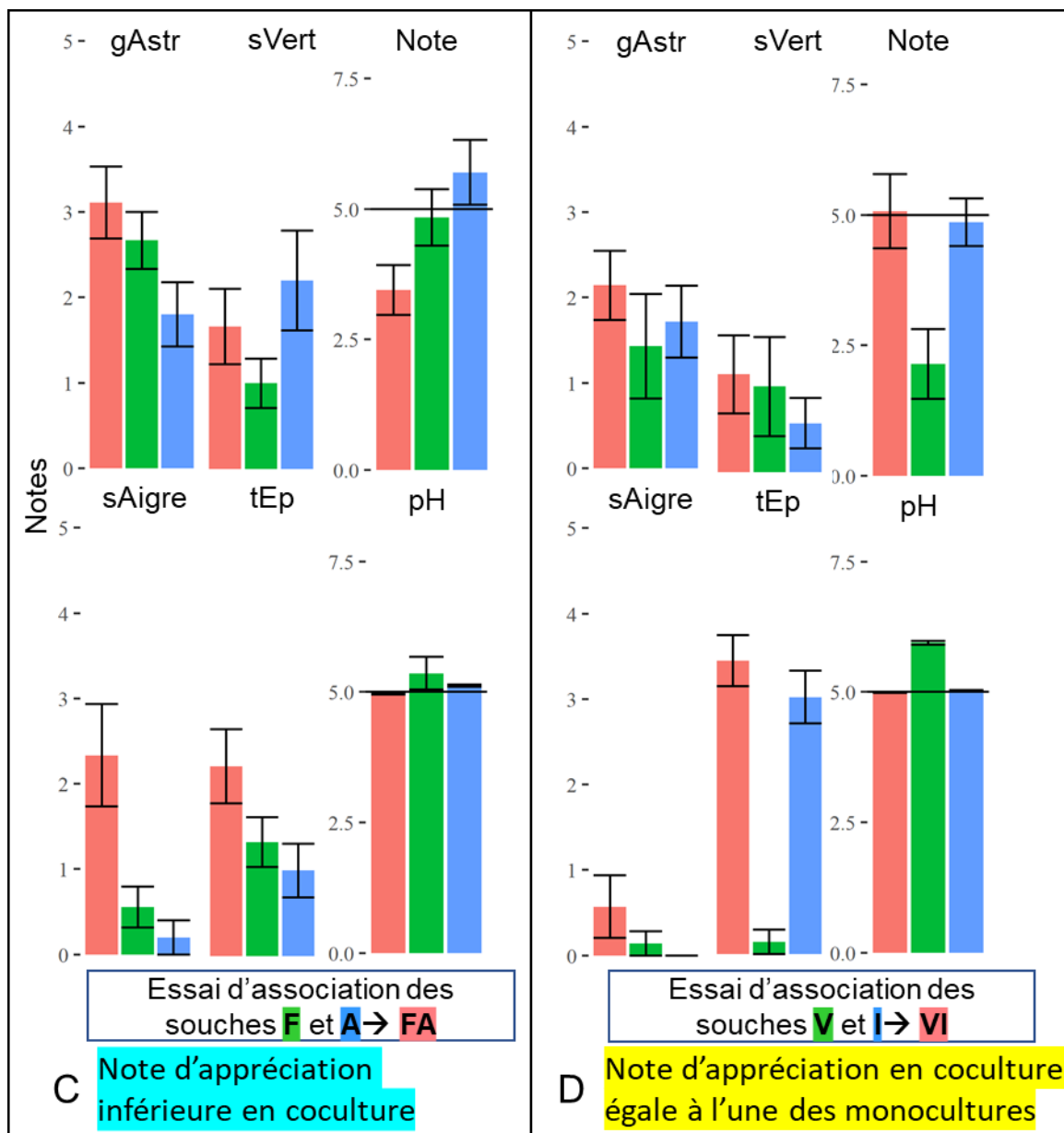


Figure 21. Notes moyennes et erreurs types données par le jury lors des analyses sensorielles des essais d'associations des souches. Les notes en vert et en bleu correspondent aux notes données aux FSJ en monoculture. Les notes en rose correspondent aux notes données aux FSJ en coculture. gAstr correspond au goût astringent du produit, sVert à la saveur « verte » du produit, sAigre à la saveur aigre, tEp à la de texture épaisse et Note à la note d'appréciation globale du produit. Les associations peuvent présenter une note d'appréciation globale du FSJ supérieure (A), intermédiaire (B), inférieure (C) ou égale (D) en coculture par rapport aux monocultures.

2 Résultats d'essais d'associations de cocultures « d'études »

A partir des 10 souches sélectionnées (Tableau 10), 12 essais d'associations ont été réalisés. Comme observé pour la coculture « d'application », les effets d'associations des souches de la coculture « d'études » étaient divers et non prévisibles a priori. Un des douze essais d'association, i.e. *L. plantarum* CIRM-BIA1111 et *S. thermophilus* CIRM-BIA251 a une durée d'acidification (i.e. durée pour atteindre un pH < 4,7) plus longue en coculture que les monocultures (Figure 22A). Deux essais ont une durée d'acidification intermédiaire en

coculture par rapport aux monocultures ; i.e. *S. thermophilus* CIRM-BIA1035 et *L. acidophilus* CIRM-BIA2087 (Figure 22B). Quatre essais ont une durée d'acidification égale en coculture à l'une des deux durées d'acidification en monoculture, i.e. *S. thermophilus* CIRM-BIA772 et *L. plantarum* CIRM-BIA777 (Figure 22C). Enfin, cinq essais ont une durée d'acidification inférieure en coculture par rapport aux monocultures. Ce dernier cas correspondait à l'interaction positive recherchée pour la coculture « d'études ». Les souches de *L. plantarum* CIRM-BIA777 et de *L. delbrueckii* CIRM-BIA865 présentaient la diminution de durée la plus importante (Figure 22D). Ces deux dernières souches ont donc été sélectionnées pour l'étude des bases moléculaires d'interactions positives en fermentation du jus de soja.

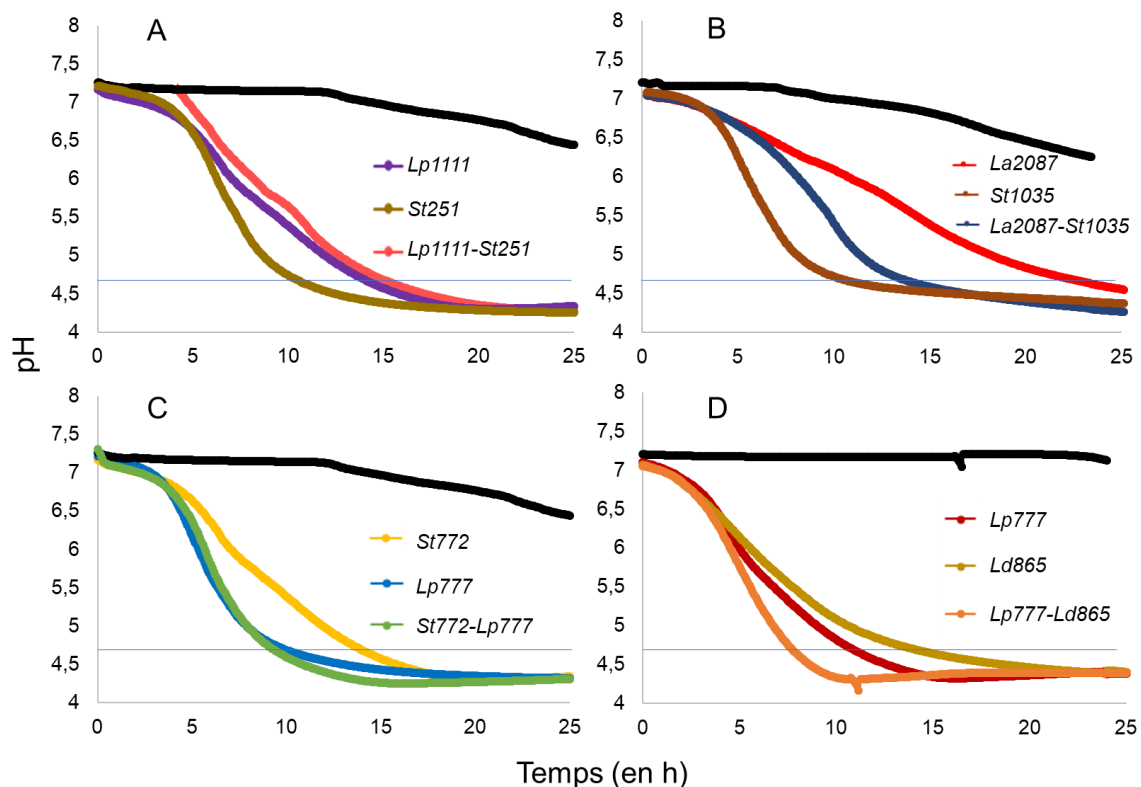


Figure 22. Cinétiques d'acidification du jus de soja par différentes cocultures composées de deux souches de BL et par les monocultures correspondantes. Le pH du jus de soja non fermenté est en noir. Le pH cible de 4,7 est indiqué par un trait bleu

D. Discussion

Les effets d'associations de souches de bactéries lactiques sur la fermentation sont divers. Les associations de souches peuvent modifier la vitesse de fermentation ainsi que les caractéristiques organoleptiques du produit de fermentation.

Pour chaque caractéristique quantifiable observée, la fermentation en coculture pouvait donner une valeur supérieure, inférieure, égale ou intermédiaire à la fermentation par les monocultures. Par ailleurs, les effets observés entre les différentes caractéristiques évaluées n'étaient pas corrélés. Cela semble d'ailleurs cohérent avec l'origine présumée de ces caractéristiques. L'astringence peut provenir de peptides libérés lors de la protéolyse et

l'arôme vert peut provenir de composés volatils du jus de soja comme l'hexanal (Chapitre 1, partie II.C).

Des phénomènes similaires ont pu être observés dans d'autres études (Canon et al., 2020c; Faust and Raes, 2012; Smid and Lacroix, 2013). L'association de *S. thermophilus* TH-4 avec *L. acidophilus* LA-5 en jus de soja peut par exemple diminuer le pH atteint après 24 h de fermentation, augmenter la population de bactéries cultivables et laisser inchangée la concentration en folate après 24 h de fermentation par rapport aux monocultures (Albuquerque et al., 2017).

On notera que dans la majorité des cas d'associations testées (86% des essais de cocultures « d'application » et 50% des essais de cocultures « d'études »), il n'y a pas d'effet visible de l'association sur les critères que nous avons évalués. Mais est-ce que cela signifie qu'il n'y a pas d'interaction entre les souches ? Il peut y avoir une compétition pour une source nutritionnelle, du « cross-feeding » ou une coopération mais qui ne serait pas visible avec les analyses réalisées ici.

En ce qui concerne les associations qui présentent une interaction positive, on peut noter que les interactions sont souche dépendantes. En effet, la souche de *Lp777* a présenté une interaction positive sur la vitesse de fermentation en coculture avec *Ld865*, alors que la vitesse de fermentation n'a pas été significativement améliorée en coculture avec *St772* (Figure 22).

Par ailleurs, sur certains critères évalués, les associations n'ont eu aucun effet. Aucune association n'a par exemple réduit la saveur aigre d'un produit par rapport aux monocultures. Certaines interactions se sont moins produites. Il n'y a par exemple qu'un cas où la coculture a acidifié moins vite qu'en monoculture. Il conviendrait de vérifier cela en réalisant davantage d'essais de cocultures de BL. D'autres interactions pourraient sinon subvenir dans d'autres conditions, à différentes températures en condition anoxique. L'étude des bases moléculaires des interactions positives des BL pourrait permettre de comprendre ces interactions afin de mieux les prédire. C'est donc ce qui a été réalisé dans la partie suivante avec la coculture de *L. plantarum* CIRMBIA777 (*Lp777*) et de *L. delbrueckii* CIRMBIA865 (*Ld865*). Cela pourrait permettre ensuite de mieux appréhender l'adaptation des métabolismes des BL en coculture et ainsi d'optimiser le processus de sélection et d'associations des souches.

IV. Complémentarité métabolique entre *L. plantarum* CIRMBIA777 et *L. delbrueckii* CIRMBIA865 en fermentation de jus de soja

A. Introduction

1 Contexte de l'étude

Un des objectifs de la thèse est de comprendre quelles sont les interactions métaboliques entre deux espèces qui peuvent être bénéfiques à la fermentation de jus de soja.

Dans la partie précédente, des associations de BL ont été sélectionnées sur leur aptitude à coopérer. Il s'agissait de détecter des associations de souches permettant de réduire la durée de fermentation du jus de soja grâce à une coopération métabolique. Cette partie consiste à identifier les bases de la coopération entre les deux souches de la coculture sélectionnée. Notre hypothèse est que les deux souches comportent des métabolismes de fermentation du jus de soja différents et complémentaires. En coculture, ce sont ces complémentarités qui permettraient d'optimiser la fermentation de jus de soja.

Les bases moléculaires (génomique et transcriptomique) de la coopération ont ainsi été étudiées chez les deux souches sélectionnées. Les génomes de *Lactobacillus delbrueckii* CIRM-BIA865 (*Ld865*) et *Lactiplantibacillus plantarum* CIRM-BIA777 (*Lp777*) ont ainsi été séquencés, assemblés et annotés fonctionnellement. Ces génomes ont été analysés afin d'identifier d'éventuelles complémentarités. Puis l'expression des gènes en monoculture a été vérifiée par des approches de transcriptomique afin de vérifier si les voies métaboliques identifiées comme complémentaires s'expriment en monoculture et potentiellement identifier des complémentarités d'expression.

B. Résumé de l'étude des métabolismes de *Ld865* et *Lp777* en fermentation de jus de soja.

Dans cette étude, nous avons dans un premier temps réalisé un suivi physicochimique et biochimique des fermentations de *Ld865* et *Lp777* en monoculture en jus de soja. Le séquençage complet des génomes des deux souches sélectionnées a ensuite été réalisé. Les voies métaboliques ont été reconstruites et les capacités métaboliques des souches ont été prédites. Leur complémentarité métabolique a été évaluée sur une base de comparaison des génomes. L'expression des gènes a également été analysée par des approches de

transcriptomique pendant ces fermentations. Ces analyses ont été réalisées à différents points de pH : pH 6,5 - pH 6,0 - pH 5,0 et pH 4,5 comme représenté en Figure 23.

Lors de ces fermentations en jus de soja, *Lp777* présentait des vitesses de modulation des paramètres physicochimiques et biochimiques plus élevées (pH : $-0,29 \pm 0,01$ upH/h, Eh : -91 ± 10 mV/upH, saccharose : $-0,32 \pm 0,01$ g/L/h, acide lactique $+0,41 \pm 0,01$ g/L/h) que *Ld865* (pH : $-0,17 \pm 0,01$ upH/h, Eh : -60 ± 7 mV/upH, saccharose : $-0,30 \pm 0,01$ g/L/h, acide lactique $+0,21 \pm 0,01$ g/L/h). En ce qui concerne la protéolyse, certains AA ont été libérés par les deux monocultures, alors que d'autres n'ont été libérés que par *Lp777* ou *Ld865* pendant la fermentation. La comparaison des génomes permet ensuite d'observer d'autres complémentarités. *Lp777* possède divers gènes et voies métaboliques non présentes ou incomplètes chez *Ld865* tels que des gènes codant l' α -galactosidase, des voies de synthèse d'AA (histidine, tryptophane, arginine et acide glutamique) ou liés à la modulation de l'Eh (synthèse de tétrahydrofolate et de glutathion).

Enfin, au niveau transcriptomique, lors de la fermentation en monoculture, *Lp777* et *Ld865* induisaient les gènes impliqués dans le catabolisme du sucrose. *Lp777* induisait l'expression de voies de synthèse d'AA alors que *Ld865* réprimait son métabolisme des AA. A l'inverse, *Ld865* semblait induire davantage de gènes de modulation de l'Eh que *Lp777*.

Divers phénomènes peuvent donc se produire en coculture. Une compétition pour le saccharose pourrait être mise en place. Cela pourrait induire une dégradation d'oligosaccharides. Un phénomène de « cross-feeding » pourrait avoir lieu en ce qui concerne les AA. *Lp777* pourrait ainsi ne pas être limité en AA et économiser son activité de biosynthèse d'AA. Enfin, une coopération permettrait à *Ld865* de bénéficier du métabolisme antioxydant de *Lp777*.

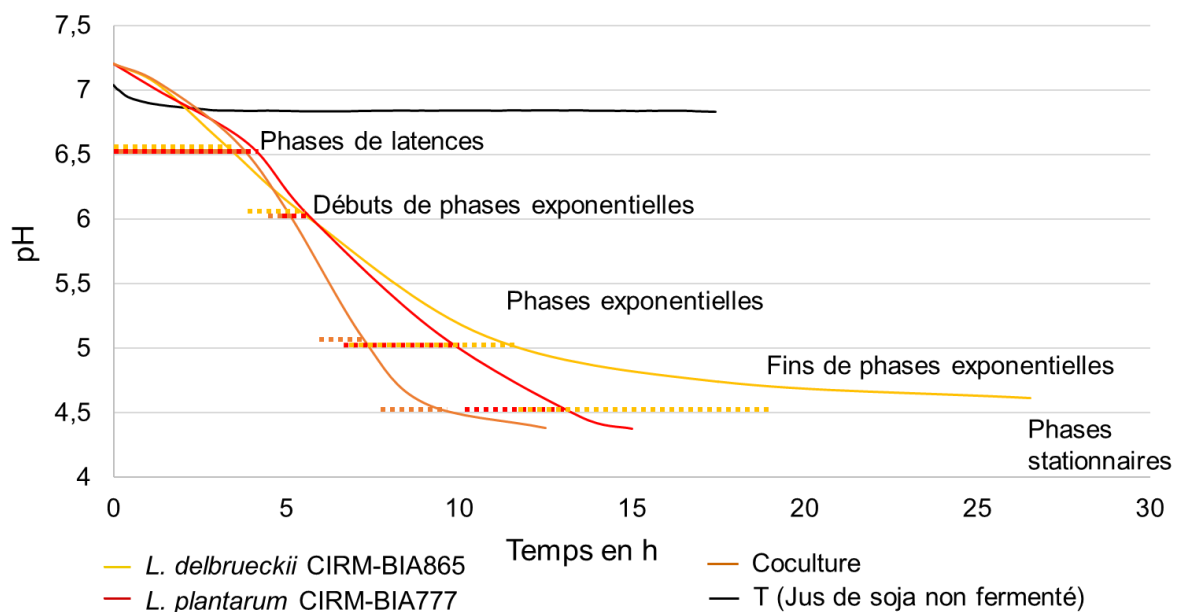


Figure 23. Stratégie d'analyse des caractéristiques biochimiques et des séquences ARN transcrites pendant la fermentation de jus de soja. ···· : Phases de fermentation

C. Étude des complémentarités métaboliques de Ld865 et Lp777 en fermentation de jus de soja.

Metabolic complementarities of *Lactiplantibacillus plantarum* CIRM-BIA777 and *Lactobacillus delbrueckii* CIRM-BIA865 in soy juice fermentation

(Draft version of the paper before submission to a scientific journal)

Olivier Harlé^{1,2}, Stéphanie-Marie Deutsch¹, Jérôme Niay², Florence Valence¹, Sandrine Parayre¹, Aurélie Nicolas¹, Gwenaële Henry¹, Anne Thierry¹, Éric Guédon¹, Hélène Falentin^{1*}

1 INRAE, Institut Agro, STLO, 35042, Rennes, France

2 Triballat Noyal, R&D UF, 35530, Noyal-sur-Vilaine, France

* Corresponding Author: helene.falentin@inrae.fr

KEYWORDS: soymilk, lactic acid bacteria, fermentation, genomics, transcriptomics, metabolomics, metabolic complementarities.

ABSTRACT:

Soy juice (SJ) is an interesting means of increasing the share of plant-based proteins in Western diets. Lactic fermentation is a sustainable and inexpensive process that can improve the organoleptic and nutritional properties of SJ. In the present study, the SJ contained 4.8 g/L of sucrose, 0.9 g/L of raffinose, 3.6 g/L of stachyose as carbon source, and 36 g/L of proteins but only 0.3 g/L of free AA. LAB can therefore present metabolic complementarities that could improve its fermentation. In the present study, we identified two LAB (*L. plantarum* CIRM-BIA777 (*Lp777*) and *L. delbrueckii* CIRM-BIA865 (*Ld865*)) that improved the SJ fermentation rate better in coculture than in monocultures, i.e. SJ fermentation time to reach a pH below 4.7 was reduced by 30%. We analyzed and compared these two LAB genomes, transcriptomes and metabolomes to identify metabolic complementarities in SJ monocultures. The two LAB presented different capacities to catabolize SJ sugars, i.e. *Lp777* can catabolize α -oligosaccharides but not *Ld865*, to modulate the oxidation-reduction potential, e.g. *Lp777* can synthesize glutathione but not *Ld865*. The two LAB released and consumed also distinct AA that could result in a proto-cooperation. We hypothesize that all these metabolic complementarities are implicated in the improvement of the SJ fermentation rate. We still have to investigate the coculture in order to understand if *Ld865* and *Lp777* do effectively benefit from these metabolic complementarities.

Introduction

Soybeans [*Glycine max*] is the 7th most produced crop in the world (“FAOSTAT,” 2018). It represents an important production of oil and proteins. Indeed, soybean contents up to 40% of protein and 20% of oil in dry matter. In a world in which we want to reduce the environmental impact of food while maintaining a healthy diet, a more balanced diet containing 50% of plant-based protein instead of a mostly animal-based protein diet is required (Springmann et al., 2018). The consumption of soybean is though interesting. In this context, fermented soy juice (FSJ), as an alternative to dairy based products, seems like a great opportunity to increase global consumption of plant-based protein while reducing that of animal proteins.

However, off-flavors and non-digestible oligosaccharides limit however the consumption of soybean (Guillon and Champ, 2002; Kaneko et al., 2011). Lactic acid fermentation can reduce these inconveniences. Indeed, during their growth, Lactic acid Bacteria (LAB) can improve the organoleptic properties of soy juice (SJ), by degrading undesirable compounds such as hexanal, or by producing compounds of interest such as lactic or citric acids (Olivier Harlé et al., 2020; Mital et al., 1974; Pinthong et al., 1980). They can also reduce soy non-digestible oligosaccharides (Singh and Vij, 2018). In parallel, lactic acid fermentation is economically interesting (Hexasearch, 2019; LLP, 2020). Biochemical and physiological aspects of lactofermented SJ have been studied. These approaches are however limited in order to understand how LAB do adapt their metabolism in SJ fermentation and though how SJ fermentation can be improved. It is essential to increase our knowledge of the physiology of LAB in order to understand their metabolism in soy juice fermentation.

Lactic acid bacteria (LAB) is a large clade (comprising more than 260 species) that results from thousands of years of evolution in thousands of different ecological niches. LAB are thus diverse at both genotypic and phenotypic levels (Zheng et al., 2020). Since LAB can be isolated, more than a hundred years ago, many phenotypes have been described. The first genome of *L. lactis* LL1403 was sequenced in 2001 (Bolotin et al., 2001), since then, thousands of genomes have been sequenced. The first transcriptomic studies helping to link the genotype to the phenotype appeared in 2005. While milk or kimchi fermentation were promptly studied in kinetics through metabolomics and transcriptomics analyses, one publication presented the metabolic adaptation of one strain, *L. casei* Zhang, in soy juice fermentation (Wang et al., 2012). It presented that SJ fermentation stimulated a complex metabolism, implicating AA and carbohydrate metabolism regulation, which helped it to grow faster than in bovine milk (Wang et al., 2013).

Due to the diversity of LAB metabolic profiles in SJ fermentation shown in our previous study (Olivier Harlé et al., 2020), LAB present metabolic complementarities that may induce positive interaction and be beneficial to fermentation (Canon et al., 2020c). The use of cocultures is interesting for SJ fermentation but as said above, few is known about it (Wang et

al., 2003a; Garro et al., 2004; Donkor et al., 2005; Farnworth et al., 2007; Yoon and Hwang, 2008).

In this context, we chose to thoroughly study two strains that exhibited positive interaction in SJ fermentation, i.e. that showed in coculture a shorter fermentation time compared to the corresponding monocultures.

Duo of LAB strains were selected from species of different clade among Lactobacilli (Inglin et al., 2018) in order to increase probability of cooperation in coculture (Little et al., 2008; Sieuwerts et al., 2008). In addition, knowing that SJ is often poor in sucrose, one strain of the duo (binary coculture) was selected for being able to use stachyose. Thirteen LAB duo were tested from Harlé et al., 2020. Four cocultures reduced SJ fermentation time but *Lactobacillus delbrueckii* CIRM-BIA 865 (*Ld865*) and *Lactiplantibacillus plantarum* CIRM-BIA 777 (*Lp777*) coculture was selected as it reduced the most SJ fermentation time (-30%) compared to monocultures.

The aim of the present study was to unravel bacterial interactions previously observed from their metabolomics, genomics and transcriptomics complementarities.

To do so, *Ld865* and *Lp777* genome features are presented first, the metabolic pathway which are complementary between *Ld865* and *Lp777* are presented next and finally a transcriptomic view of both metabolisms in monoculture is presented along SJ fermentation.

The comparison of reconstructed metabolisms of both strains helped to understand which aspects of each strains limits or conversely help soy juice fermentation. To do so, the physicochemical parameters (pH and Eh) were monitored. Biochemical aspects targeting carbohydrates, organic acids, amino acids and volatiles were also analyzed along fermentations with metabolomic approaches. The genes expressions were quantified along fermentations with transcriptomic approaches.

Materials and Methods

The strategy of analyses is described next.

○ **Bacteria and culture condition**

Lactobacillus delbrueckii CIRM-BIA 865 (*Ld865*) and *Lactiplantibacillus plantarum* CIRM-BIA 777 (*Lp777*) (formerly *Lactobacillus plantarum*), were provided by the International Centre for Microbial Resources-Food Associated Bacteria (CIRM-BIA, https://www6.inra.fr/cirm_eng/Food-Associated-Bacteria). The strains were activated from frozen glycerol stocks (-80°C) in Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth with 2 consecutive sub-cultures of 12 h inoculated at 1% v/v and incubated at 37°C.

API® gallery 50CH profiles (API System, BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) were used according to the manufacturer's instructions in order to analyze *Lp777* and *Ld865* carbohydrate fermentation profiles.

The soy juice used for fermentation was a commercial UHT soy juice (Sojade, Triballat Noyal SAS, France), previously used in Harlé et al., 2020, but from another batch ; referred to as SJ below. The same batch of SJ was used throughout the study. Cultures were carried out under static conditions.

- **Whole genome sequencing and assembly**

Cell pellets (equivalent to 10^{10} CFU) were obtained by centrifugation of MRS cultures (24 h at 37°C) of *Lp777* and *Ld865* (10 min, 5000 g, RT). DNA was extracted using DNeasy midi kit (Qiagen) according to the protocol described in Falentin et al., 2016. Genomes were sequenced by Illumina NovaSeq 2 x 150 pb and PacBio Sequel (Eurofins Genomics, Constance, Germany). Genomes were assembly using Unicycler (Wick et al., 2017) on galaxy genotoul bioinformatics platform (Toulouse, France). Genome sequences were integrated in the MicroScope platform hosted in the Genoscope for automatic annotation (Vallenet et al., 2020). The genomes will be published in the near future. Genome analyses were performed thanks to Microscope platform hosted in the Genoscope (Vallenet et al., 2020), the MetaCyc database (Caspi et al., 2018) and KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; <https://www.kegg.jp/> or <https://www.genome.jp/kegg/>).

- **Soy juices fermentation**

The experimentations were performed in triplicate from independent subcultures. SJ was inoculated in monocultures with *Lp777* or *Ld865* at 1% v/v. Incubation was conducted at 37°C and without anoxic conditions to mimic industrial conditions. Samples were collected throughout fermentation when the targeted pH 6.5, 6.0, 5.0 and 4.5 were reached. Cultures were then sampled for population count, cell size measurement, RNA extraction and cooled in ice to store it at -20°C in 40 mL straight containers with screw cap (Corning® Gosselin™) for organic acids, oligosaccharides and amino acids (AAs) analyses.

- **Acidification and oxidation-reduction potential kinetics monitoring**

The monitoring of acidification and oxidation-reduction potential (Eh) was carried out in duplicata for 20 h with iCINAC® System (Ysebaert, Frepillon, France) and Mettler Toledo ISM® probes (Ag/AgCl, E0=196 mV at 37°C, Paris, France). The Eh represents the capacity of SJ to gain and remove electrons, it is equivalent to reduce and oxide, respectively.

Probes were cleaned in pepsin 1% and HCl 10 mN for 1 h and disinfected with 0.1% sodium hypochlorite for 10 min before calibration. The values were calibrated according to reference solutions value (pH4, pH7 and 220 mV at 37°C, Mettler Toledo, Viroflay, France) before monitoring. Correction of Eh were performed according to electrode reference and Leistner and Mirna equation as in Abraham et al., 2013 with a regression factor $\alpha=46$ mV/upH in SJ at 37°C (n=40 between pH 4 and pH 7).

- **Microbial analyses: Population and cell sizes**

1 mL of FSJ was diluted in 9 mL of Tryptone salt (0.1% Tryptone, AES Laboratoire, Combourg, France; 0.85% NaCl, Labogros, Buchs, France). Serial decimal dilutions were then realized by micromethod as previously described by (Baron et al., 2006). The colony-forming units (CFU) of *Lp777* and *Ld865* population were then both counted on MRS agar pour plate after incubation under anaerobic conditions for 24 h at 30 °C for *Lp777* and 43°C for *Ld865*.

- **Oligosaccharides quantification**

Oligosaccharides were quantified in FSJ by ionic chromatography DIONEX ICS3000. Aliquots (1 g) were deproteinized by adding 40 mg of salicylic acid for 30 min at 0°C then centrifuging 5 min at 4000 g. Supernatant were then diluted by 150 fold in milli-Q® water (Merck, Darmstadt, Germany), filtered (chromafil Xtra PVDF 45/13, Macherey-Nagel, Hoerd, France) and kept frozen at -20°C until analysis. Quantification were performed with external calibration using stachyose, raffinose, sucrose, lactose, glucose, fructose and galactose (Merck, St. Quentin Fallavier, France).

- **Organic acids quantification**

Lactic, acetic, citric, succinic and pyruvic acids were analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC, Dionex, P680, Sunnyvale California) as previously described (Olivier Harlé et al., 2020).

- **Amino acids quantification**

The total and the free AA amounts were determined by ion chromatography as previously described (de Oliveira et al., 2016; Lorieau et al., 2018). Samples were diluted 3-5 fold with the lithium citrate injection buffer (0.2 M - pH 2.2) (Biochrom Ltd., Cambridge, UK).

- **From extraction to sequencing of RNA**

RNA was extracted from 1 mL of FSJ directly treated with 2 mL of RNA protect cell reagent (Qiagen, Hilden, Germany). This sample was centrifuged 5 min at 4°C, 10,000 g to discard the supernatant. The pellet was frozen at - 80°C with 2 mL of RNA protect. After defrost, the sample was centrifuged for 5 min at 4°C, 10,000 g and the supernatant was discarded. The pelleted cells were suspended in 200 µL lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8.0) with 20 mg/mL lysozyme (MP Biomedicals, Illkirch, France) and 50 U/mL mutanolysin (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) and incubated for 30 min at 24°C. Suspensions were then transferred to 2 mL tubes containing 50 mg zirconium beads (diameter: 0.1 mm; BioSpec Products, Bartlesville) and 50 µL SDS (20 %). Samples were then shaken in a Precellys Evolution (Bertin, Montigny-le-Bretonneux, France) for two cycles of 40 s at 6500 rpm.

RNA was then extracted from the cell lysate with the RNeasy Mini kit (Qiagen) and a subsequent DNase treatment (Dnase Rnase free, Ambion) according to the manufacturer's

instructions. RNA concentrations were quantified using a Nanodrop. Some extractions were realized in duplicates with phenol-chloroform, as an unique method was not optimal to extract RNA in all samples. An additional step was realized before RNeasy Mini kit: lysate were transferred in Phase Lock Gel Heavy with 900 μ L QIAzol in which 200 μ L chloroform was added, left 2 min and centrifuged 15 min at 12,000 g.

RNA quality (RIN) was evaluated using an Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). RNA labeling, hybridization and sequencing were performed by GeneWiz (Leipzig, Germany). All of the RNA samples had a RIN value greater than 6, indicating a good RNA integrity and a quantity higher than 2 μ g.

- **RNA-seq data analyses**

Sequenced reads were trimmed, adapted using Trim Galore and mapped against both strains reference genomes with Bowtie 2 (Langmead et al., 2009). No mismatch was allowed for each sequencing read and only reads that mapped to unique sequence were further analyzed. Reads mapping to each coding sequence were counted using HTSeq-count (-stranded=reverse, -a 0, -t CDS, -i db_xref, -m union, Anders et al., 2015).

For the RNA-seq data analyses, raw counts of RNA reads mapped on reference genomes in the 53 samples. Seven samples were discarded from the study because they did not present a RIN>6 (two unfermented SJ and one *Lp777* monocultured FSJ at pH 6.0) or because more than 10% of reads did not mapped on the right reference genome (a *Lp777* monocultured FSJ at pH 6.5 and three *Lp777* monocultured FSJ at pH 4.5).

The strategy of RNA-seq data analysis implemented in this study consisted to compare the genes expression dynamics for both *Ld865* and *Lp777* monoculture during the kinetics of fermentation (separately). We though compared the differentially expressed (DE) genes between phases determined by pH according to Figure 23. The beginning of exponential phase was for example investigated by comparing gene expressions between the pH 6.5 and pH 6.0. Fold changes expressed how many times genes were induced along the fermentations.

Results

- **SJ fermentation, Eh reduction and growth rates are higher for *Lp777* than for *Ld865***

Fermentation time required to reach acid pH 4.6 was lower for *Lp777* (13 h) than for *Ld865* (27 h) (Figure 24A).

Both strains were inoculated at 10^6 cfu/mL. The cell number of *Lp777* was 100-fold greater at the end of the fermentation ($5 \cdot 10^8$ cfu/mL), while *Ld865* maximal population was close to the number of inoculated cells (10^6 cfu/mL), indicating that *Ld865* did not grow in SJ monoculture (Figure 24B).

The unfermented SJ presented an extracellular Eh of 223 ± 1 mV, corresponding to an oxidizing environment. The SJ fermentation by *Ld865* and *Lp777*, in monoculture generated a reducing activity, characterized by a decrease of the extracellular Eh (Figure 24C). *Ld865* first slightly increased Eh upon 257 ± 4 mV until pH 6.5 then reduced it with an Eh reduction rate of -60 ± 7 mV/upH. *Lp777* maintained Eh stable at 218 ± 9 mV until pH 6.5 and then reduced SJ with a higher rate of -91 ± 10 mV/upH.

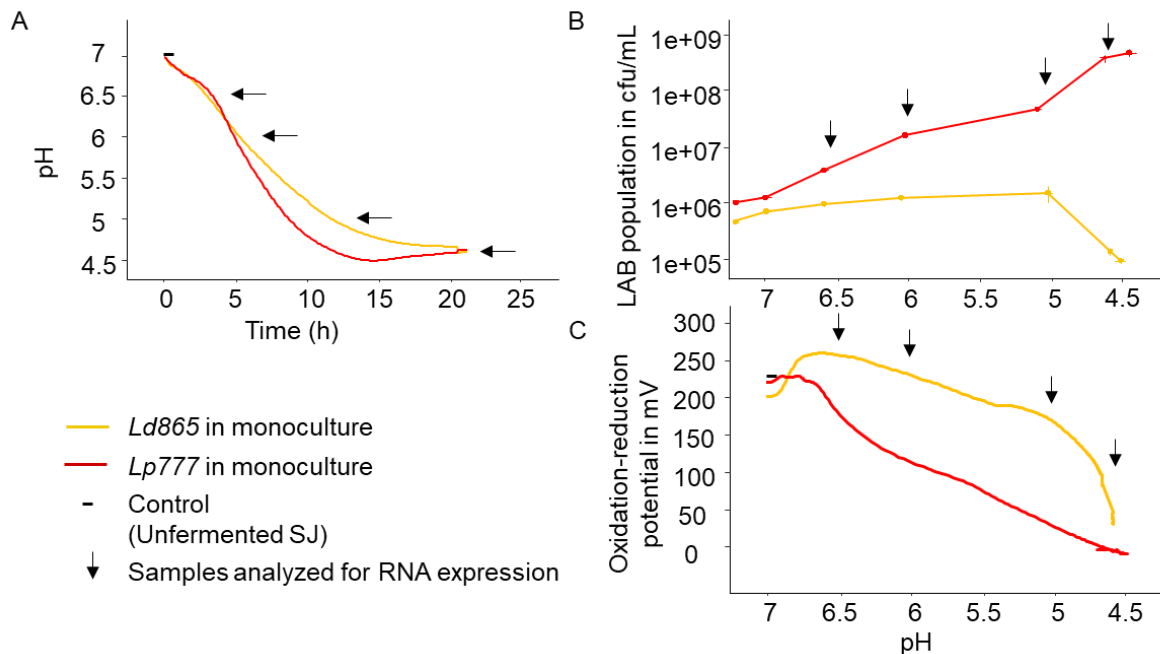


Figure 24. Fermentation of soy juice performed at 37°C by monoculture of *Lp777* or *Ld865*. A. represents acidification kinetics, B. represents LAB population growth and C. represents oxidation-reduction potential kinetics.

○ Metabolomics of *Ld865* and *Lp777* FSJ

a) *Lp777* and *Ld865* convert sucrose in lactic acid

The unfermented SJ contained 4.8 g/L of sucrose, 3.6 g/L of stachyose, 0.9 g/L of raffinose, 0.6 g/L of fructose, 0.5 g/L of glucose and 0.01 g/L of galactose. (Table 12). The sugars contents were monitored during the fermentation. Regardless of the SJ fermentation, the main consumed sugar was sucrose. There was however no sucrose exhaustion with a maximal sucrose consumption of 3.5 ± 0.1 g/L in *Ld865* monoculture (Table 12).

Lactic acid was the main produced organic acid in both monocultures. Up to 4.1 ± 0.1 g/L of lactic acid was produced in *Lp777* monoculture. Only *Lp777* FSJ contained acetic (0.3 ± 0.1 g/L) and succinic (0.1 ± 0.1 g/L) acids (Table 12).

b) *Lp777* and *Ld865* FSJ present complementary amino acids profiles

The unfermented SJ contained 35 g/L of total AA and 0.3 g/L of free AA. The amounts of total AA did not vary throughout any fermentation when compared to the unfermented SJ. The amounts of free AA varied however along SJ fermentation (Table 13).

At the end of fermentation, in the SJ fermented with *Ld865* numerous free AA were released, and the concentration of all AA were higher than that in the unfermented SJ, except for beta-alanine, arginine, asparagine, tryptophan and cysteine. In the SJ fermented with *Lp777*, most free AA were consumed at pH 4.5, except histidine, lysine, proline and glutamine, the concentrations of which increased. Note that for most AA present at high levels at the end of fermentation, their concentration decreased (consumption) during the first stages of fermentation (up to pH 6.0 or pH 5.0 according to AA) to further increase.

Table 12. Oligosaccharides and organic acids concentrations in unfermented soy juice and in SJ fermentations at different pHs. Soy juice was fermented with *Ld865* and *Lp777* in monocultures at 37°C. The color gradient is used by metabolites to highlight differences between products. Letters after the concentrations indicate statistical differences from a Tukey test with an alpha error of 0.05.

Names	pH	time (in h)	Carbohydrates concentrations (in g/L)									
			sucrose	stachyose	raffinose	glucose	fructose	galactose	melibiose	maltose	lactose	
T	7.0		4.8 a	3.6 a	0.9 ab	0.5 cde	0.6 cd	0.01 cde	0.08 b	0.02 a	0.04 a	
<i>Ld865</i>	6.5	3.3 e	4.8 a	3.8 a	0.9 ab	0.9 abc	1.2 abc	0.01 bcd	0.12 ab	0.00 c	0.02 b	
	6.0	5.8 d	4.0 ab	3.6 a	0.9 ab	1.0 ab	1.4 ab	0.01 ab	0.14 ab	0.00 c	0.02 b	
	5.0	10.8 b	2.6 cd	3.9 a	1.0 a	1.2 a	1.7 a	0.02 a	0.16 ab	0.00 c	0.03 b	
	4.5	26.6 a	1.3 f	3.9 a	0.9 ab	0.4 de	0.7 cd	0.02 a	0.10 ab	0.00 c	0.02 b	
<i>Lp777</i>	6.5	3.4 e	3.9 ab	3.4 a	0.9 ab	1.1 ab	1.4 ab	0.00 de	0.13 ab	0.02 a	0.01 c	
	6.0	5.6 d	3.4 bc	3.9 a	0.9 ab	1.0 ab	1.2 abc	0.00 cde	0.10 ab	0.01 a	0.01 d	
	5.0	9.4 c	2.1 def	3.5 a	0.9 ab	0.6 bcd	1.1 abc	0.01 cde	0.16 a	0.02 a	0.01 de	
	4.5	13.5 a	1.4 ef	3.7 a	0.9 ab	0.2 e	0.4 d	0.00 e	0.08 b	0.01 b	0.00 e	

Names	pH	time (in h)	Acids concentrations (in g/L)				
			lactate	acetate	succinate	citrate	pyruvate
T	7.0		0.0 e	0.0 d	0.0 c	0.6 bc	0.0 b
<i>Ld865</i>	6.5	3.3 e	0.2 de	0.0 d	0.0 c	0.6 bc	0.0 b
	6.0	5.8 d	1.0 c	0.1 c	0.0 c	1.6 a	0.0 b
	5.0	10.8 b	2.5 b	0.1 c	0.0 bc	1.6 a	0.0 b
	4.5	26.6 a	3.8 a	0.1 c	0.0 bc	1.5 a	0.0 b
<i>Lp777</i>	6.5	3.4 e	0.1 e	0.0 d	0.0 c	0.3 c	0.0 b
	6.0	5.6 d	0.9 cd	0.1 c	0.0 c	1.5 a	0.0 b
	5.0	9.4 c	2.5 b	0.2 b	0.1 b	1.3 ab	0.0 b
	4.5	13.5 a	4.1 a	0.3 a	0.1 a	1.1 ab	0.0 a

Table 13. Amino acids and nitrogenous compounds concentrations (in mg/L) in soy juice fermented with *Ld865* or *Lp777*. The color gradient is used by metabolites to highlight differences between products. The products are classified according to their pH. Letters after the concentrations indicate statistical differences from a Tukey test with an alpha error of 0.05. GABA: Gamma Amino Butyric Acid

Names	pH	Histidine	Lysine	Proline	Ammoniac	Valine	GABA	Ethanol-amine	Beta-alanine	Glutamine	Ornithine	Citruline	Phenyl-alanine	Leucine	Tyrosine
SJ	7.0	5.5 de	8.8 fg	3.0 ef	19.7 e	46.0 b	3.0 bcd	6.0 ab	4.9 a	0.0 e	0.8 d	1.4 d	10.4 c	9.2 c	4.2 c
<i>Ld865</i>	6.5	3.5 ef	5.5 gh	3.9 def	10.5 f	17.9 d	2.3 d	3.5 c	2.4 c	0.2 e	4.3 d	5.0 c	5.5 d	5.7 d	2.4 d
	6.0	3.5 ef	4.6 h	8.9 b	11.9 f	16.9 d	2.2 d	2.8 c	2.0 c	0.2 e	14.6 c	10.1 b	5.3 d	4.1 de	2.0 d
	5.0	9.6 b	17.5 bc	9.4 b	32.3 bc	44.5 b	4.5 a	5.0 b	2.7 bc	2.0 bc	75.1 b	20.7 a	15.7 b	15.3 b	5.9 b
	4.5	15.6 a	39.3 a	15.7 a	41.7 a	62.2 a	3.2 abcd	6.4 a	4.6 a	0.4 e	94.5 a	18.0 a	25.2 a	31.5 a	12.8 a
<i>Lp777</i>	6.5	3.3 ef	6.0 fgh	4.4 cdef	10.7 f	17.5 d	2.4 d	3.3 c	2.1 c	0.3 e	0.7 d	0.2 d	5.0 d	3.8 def	2.2 d
	6.0	2.9 f	4.9 gh	2.9 ef	9.8 f	15.1 d	2.5 cd	3.0 c	2.4 c	0.6 de	0.2 d	0.8 d	1.6 e	0.9 fg	1.2 de
	5.0	6.9 cd	13.1 de	7.1 bcd	20.0 de	33.3 c	4.2 ab	5.5 ab	3.3 abc	2.9 b	1.4 d	1.2 d	2.0 e	1.1 efg	0.0 e
	4.5	8.8 bc	18.6 b	9.1 b	21.1 de	35.5 c	3.4 abcd	6.5 a	4.9 a	4.8 a	0.7 d	1.6 d	1.0 e	0.0 g	0.0 e

Names	pH	Isoleucine	Aspartic acid	Methionine	Alanine	Glutamic acid	Glycine	Serine	Threonine	Tryptophan	Asparagine	Cysteine	Arginine	Total
SJ	7.0	6.1 b	33.4 b	3.5 b	14.6 c	47.9 c	3.8 c	4.0 cd	2.9 c	27.7 a	14.7 a	28.7 a	116 a	307 c
<i>Ld865</i>	6.5	2.9 c	18.8 c	0.0 d	6.6 def	25.7 de	2.8 cde	2.9 cde	1.7 cd	12.3 e	4.6 cdef	2.0 c	55.7 c	209 de
	6.0	2.1 cde	17.4 cd	0.0 d	6.5 def	22.3 def	2.9 cd	2.6 de	1.0 cd	13.6 de	0.8 g	2.6 c	37.0 d	198 de
	5.0	7.0 b	32.2 b	2.0 c	20.9 b	61.8 b	8.2 b	10.1 b	6.8 b	21.2 abc	3.6 efg	0.6 c	1.0 e	425 b
	4.5	19.0 a	51.7 a	8.9 a	37.7 a	136 a	17.8 a	23.4 a	22.0 a	25.7 ab	10.4 b	27.6 ab	0.0 e	736 a
<i>Lp777</i>	6.5	2.6 c	16.4 cd	0.0 d	8.1 de	24.8 de	2.0 def	2.1 ef	1.9 cd	15.7 cde	7.1 c	0.7 c	68.3 b	212 de
	6.0	0.6 ef	9.3 e	0.0 d	6.7 def	18.7 ef	0.5 f	1.4 ef	1.1 cd	13.6 de	6.6 cd	0.7 c	63.8 bc	172 e
	5.0	0.0 f	5.9 f	0.0 d	4.8 ef	22.9 def	1.1 ef	3.0 cde	0.8 cd	11.1 e	6.1 cde	0.8 c	109 a	344 c
	4.5	1.0 def	6.9 ef	0.2 d	4.6 f	13.4 f	1.1 ef	0.9 f	0.2 d	3.1 f	4.4 cdef	25.1 b	113 a	168 e

- **Genome features of *Ld865* and *Lp777***

Lactobacillus delbrueckii CIRM-BIA865 (*Ld865*) contained a single circular genome of 2,008,473 bases pairs (bp) with a GC content of 49.7%. Among the 1962 coding sequences (CDS) that had been identified, 80.1% (1572 CDSs) were classified into Clusters of Orthologous Group (COG) and 132 genes had unknown functions. The *Ld865* genome contained 9 rRNA operons and 94 tRNAs.

Lactiplantibacillus plantarum CIRM-BIA777 (*Lp777*) contained a chromosome of 3,008,473 bp with a GC content of 44.7% and 8 plasmids with sizes ranging from 7,886 to 64,262 bp. Among the 3172 coding sequences (CDS) identified, 76.1% (2413 CDSs) were classified into COG and 220 genes had unknown functions. The *Lp777* genome contained 5 rRNA operons and 68 tRNAs.

In COG categories, *Lp777* G group (Carbohydrate transport and metabolism) was composed of 294 CDS (9.3% of the genome) while 126 CDS (6.4% of *Ld865* genome) composed *Ld865* G group. In E group (Amino acid transport and metabolism), *Lp777* contained 278 CDS (8.8% of *Lp777* genome) while *Ld865* contained 194 CDS (9.9% of *Ld865* genome).

- **Identification of metabolic complementarities of *Lp777* and *Ld865***

The analyze of *Lp777* and *Ld865* bacterial genomes enabled to identify which metabolic pathways were complete or uncomplete. The comparison of *Lp777* and *Ld865* metabolic pathways could highlighted complementarities, i.e. pathways that were present in a strain and absent in the other strain. In coculture, such complementarities could benefit to SJ fermentation. *Lp777* and *Ld865* had 3-4% of their genes in common with 1188 orthologous genes.

Like COG G and E groups had not the same importance in *Lp777* and *Ld865* and as *Lp777* and *Ld865* present distinct Eh reduction rates, the study focused on specific metabolisms that appeared as the most important in SJ fermentation, i.e. metabolisms of carbohydrates, amino acids, vitamins and cofactors that can decrease the oxidative stress.

Table 14. Differential expression of *Ld865* and *Lp777* genes implicated in the metabolisms of carbohydrates, amino acids, cofactors and vitamins during fermentation of soy juice. Each line may correspond to different genes between *Ld865* and *Lp777* genes DE. Genes are classified by pathway and are annotated with their names, locus tags, products, induction and fold changes between pHs in monoculture. The column “expression” represents the base expression of genes calculated by dividing the global base expression of all genes to the base expression of the corresponding gene at pH 6.5. Red color is used to highlight fold repression (<1) and green color is used to highlight fold induction (>1) along SJ fermentation.

path	genes	locus tag	product	<i>Ld865</i> base expression				genes	locus tag	product	<i>Lp777</i> base expression			
				at pH 6.5	pH 6.5->6.0	pH 6.0 ->5.0	pH 5.0 ->4.5				at pH 6.5	pH 6.5->6.0	pH 6.0 ->5.0	
Carbohydrates catabolism and transport (t:transporter, p:permease)	meIR	LBDEL865_v1_0934	transcriptional regulator	0.12				agaS	LBPLA777_v1_0163	oligosaccharides degradation	12.9			
	meIR	LBDEL865_v1_0935		0.04		2.17		agaR	LBPLA777_v1_3049		0.26			
	scrR	LBDEL865_v1_0408		0.29		4.78		agaR	LBPLA777_v1_pd0008		0.07			
	scrA	LBDEL865_v1_0406	sucrose degradation	3.90	0.76	2.15	0.69	scrR	LBPLA777_v1_0166	sucrose degradation	2.99			
	scrB	LBDEL865_v1_0407		0.43		4.13		scrA	LBPLA777_v1_0164		17.3	1.70		
	scrK	LBDEL865_v1_0054		1.34				scrB	LBPLA777_v1_0165		6.83			
	gtfA	LBDEL865_v1_0063		0.01				scrK	LBPLA777_v1_0162		13.2			
	pgcA	LBDEL865_v1_0397		0.69				pgcA	LBPLA777_v1_0614		4.32			
	fruA	LBDEL865_v1_0171	PTS fructose t	0.97		2.18			LBPLA777_v1_2567	PTS β-glucoside transporter	0.01		4.22	
	levF	LBDEL865_v1_0375		0.87	1.47	1.98			LBPLA777_v1_2076		0.05	0.21		
								EIIBC	LBPLA777_v1_2073	0.04	0.20			
		EIIBC	LBDEL865_v1_0148	PTS β-glucoside transporter	0.12		6.33		celC	LBPLA777_v1_0777	PTS β-glucoside transporter	0.01		4.87
			LBDEL865_v1_0363		4.12	1.36	1.62	1.73	manX	LBPLA777_v1_0503		0.17	1.61	
		IIA	LBDEL865_v1_0266		0.06	0.36			manX	LBPLA777_v1_0504		0.33	1.39	
		manX	LBDEL865_v1_0374		1.82	1.49	1.78			LBPLA777_v1_3096		0.11	0.47	
		bgIP	LBDEL865_v1_0254		0.11		9.17			LBPLA777_v1_2075		0.03	0.24	
		malE	LBDEL865_v1_1780	Maltodextrin ABC transporter	0.90	0.13	6.76	2.15		LBPLA777_v1_2243	fructose p	0.11		0.53
		malF	LBDEL865_v1_1779		0.76	0.12	6.29	2.00		LBPLA777_v1_2210		1.77		
		malG	LBDEL865_v1_1778	0.70	0.12	6.37	2.09		LBPLA777_v1_1862	0.47				
		fruK	LBDEL865_v1_0170	fructokinase	0.34		2.16		fruK	LBPLA777_v1_1862	fructokinase	0.47		
		glcK	LBDEL865_v1_1869	glucokinase	2.28	2.39	1.77		glcK	LBPLA777_v1_1346	glucokinase	2.29		
										LBPLA777_v1_1589		0.84	1.46	
									galK	LBPLA777_v1_pd0011		0.01	2.10	
									galT	LBPLA777_v1_3044		0.07	4.34	
		galE	LBDEL865_v1_0382	Leloir pathway	2.96	1.48		0.53	galE	LBPLA777_v1_3045	Leloir pathway	0.04		7.66
		mdxM	LBDEL865_v1_1782		0.23	0.12	4.74	1.90	yvdM	LBPLA777_v1_0027		0.05	2.53	
									ycjU	LBPLA777_v1_0058		0.23		
		glgP	LBDEL865_v1_0392	glycogen phosphorylase	0.01				glgA	LBPLA777_v1_pc0028	glycogen metabolism	0.19		3.31
								glgB	LBPLA777_v1_pc0025	0.63		2.88		
								glgC	LBPLA777_v1_pc0026	0.12		3.04		
								glgD	LBPLA777_v1_pc0027	0.13		2.71		
								glgP	LBPLA777_v1_pc0029	0.68		3.19		

path	genes locus tag		Ld865 base expression				Ld865 DE genes				genes locus tag		Lp777 base expression				Lp777 DE genes			
			product	at pH 6.5	pH 6.5->6.0	pH 6.0 ->5.0	pH 5.0 ->4.5	product	at pH 6.5	pH 6.5->6.0			pH 6.0 ->5.0							
Amino acids biosynthesis			histidine biosynthesis						hisZ	LBPLA777_v1_2259	histidine biosynthesis	0.13			0.22					
									hisG	LBPLA777_v1_2258		0.03								
									hisI	LBPLA777_v1_2251		0.04								
									hisE	LBPLA777_v1_2252		0.02								
									hisA	LBPLA777_v1_2254		0.02								
									hisF	LBPLA777_v1_2253		0.01								
									hisH	LBPLA777_v1_2255		0.03								
									hisB	LBPLA777_v1_2256		0.05								
									hisC	LBPLA777_v1_2250		0.19			0.41					
									hisK	LBPLA777_v1_2260		0.47			1.88					
				tryptophan biosynthesis						hisD	LBPLA777_v1_2257	0.12								
										trpD	LBPLA777_v1_1419	0.01			4.15					
										LBPLA777_v1_1417	0.07									
										trpG	LBPLA777_v1_1418	0.01								
										trpF	LBPLA777_v1_1421	0.00			7.07					
										trpC	LBPLA777_v1_1420	0.01			7.37					
										trpA	LBPLA777_v1_1423	0.01								
										trpB	LBPLA777_v1_1422	0.02								
										argJ	LBPLA777_v1_0453	0.01								
					arginine biosynthesis						argB	LBPLA777_v1_0454	0.01							
										argC	LBPLA777_v1_0452	0.01								
										argD	LBPLA777_v1_0455	0.01								
		pyrAB	LBDEL865_v1_1006			0.01				pyrAB	LBPLA777_v1_2361	0.46	3.55		8.67					
		pyrAA	LBDEL865_v1_1005			0.00		7.41		pyrAA	LBPLA777_v1_2362	0.12	4.23		10.8					
										pyrAB	LBPLA777_v1_0450	0.40								
										pyrAA	LBPLA777_v1_0451	0.07			0.33					
										pyrAA	LBPLA777_v1_1537	0.35			3.12					
										pyrAB	LBPLA777_v1_1538	1.20			2.62					
		argF	LBDEL865_v1_0347			4.14	2.48			argF	LBPLA777_v1_0456	0.01								
		argG	LBDEL865_v1_1177		0.00				argG	LBPLA777_v1_0624	0.40			0.43						
		argH	LBDEL865_v1_1176		0.00				argH	LBPLA777_v1_0625	0.36			0.53						
		glnA	LBDEL865_v1_0682		4.17		2.78		glnA	LBPLA777_v1_1353	17.3			0.35						
				glutamate biosynthesis					gdhA	LBPLA777_v1_1037	7.01	3.16		0.54						
				cysteine biosynthesis						LBPLA777_v1_0217	0.75			0.08						
										mccA	LBPLA777_v1_0219	0.72			0.17					
		mccB	LBDEL865_v1_0727		0.07	0.45			mccB	LBPLA777_v1_0218	1.16			0.21						
				lysine biosynthesis						dapG	LBPLA777_v1_0822	1.63								
		yclM	LBDEL865_v1_0978			0.02				yclM	LBPLA777_v1_2046	2.84								
		asd	LBDEL865_v1_0796			0.59	0.38	0.15		asd	LBPLA777_v1_2268	6.71								
		dapA	LBDEL865_v1_0981			0.11	0.45			dapA	LBPLA777_v1_1890	1.40								
	dapA	LBDEL865_v1_0981			0.11	0.45			dapA	LBPLA777_v1_2350	0.02			2.19						
	dapB	LBDEL865_v1_0982			0.14				dapB	LBPLA777_v1_1615	0.60			1.95						
	dapH	LBDEL865_v1_0979			0.03	0.06			dapH	LBPLA777_v1_2011	0.47			1.94						
	dapI	LBDEL865_v1_0980			0.04	0.07			dapI	LBPLA777_v1_2010	1.18			1.60						
	dapF	LBDEL865_v1_0977			0.01				dapF	LBPLA777_v1_1937	1.00									
	lysA	LBDEL865_v1_0873			0.18	0.60	0.27		lysA	LBPLA777_v1_1475	3.11									
	ilvE	LBDEL865_v1_0835	BCAA transaminas	1.61	0.70	0.23		ilvE	LBPLA777_v1_2125	3.15			2.40							

path	Ld865 base expression		Ld865 DE genes				Lp777 base expression		Lp777 DE genes					
	genes	locus tag	product	at pH 6.5	pH 6.5->6.0	pH 6.0 ->5.0	pH 5.0 ->4.5	genes	locus tag	product	at pH 6.5	pH 6.5->6.0	pH 6.0 ->5.0	
proteins, peptides degradation									LBPLA777_v1_1794		0.07			
									LBPLA777_v1_0497		0.03			
									LBPLA777_v1_2620		0.13			
		pepC	LBDEL865_v1_0446	peptidase	0.88	0.67			pepC	LBPLA777_v1_0517		13.5		
								ypdF	LBPLA777_v1_1365		0.79			
									LBPLA777_v1_0294		1.40			
									LBPLA777_v1_2514		0.14			
		pepDA	LBDEL865_v1_1507	dipeptidase A	2.23		1.58		pepDB	LBPLA777_v1_0805		0.75		1.52
									LBPLA777_v1_0857		0.00			
		pepO	LBDEL865_v1_1755	peptidase	9.33	1.36		1.75	pepO	LBPLA777_v1_3012		2.17	1.42	
										LBPLA777_v1_1203		0.51		
										LBPLA777_v1_2986	peptidase	73.0		
			LBDEL865_v1_0120		0.01					LBPLA777_v1_1347		0.03		
			LBDEL865_v1_0121		0.03					LBPLA777_v1_0261		0.02		2.60
			LBDEL865_v1_0381	dipeptidase	0.04					LBPLA777_v1_0368		0.00		
			LBDEL865_v1_1265		0.15					LBPLA777_v1_0761		0.37		
		pepA	LBDEL865_v1_1506		1.87		1.52			LBPLA777_v1_2550		0.03		
										LBPLA777_v1_1013		0.03		
										LBPLA777_v1_1810		0.01		
		pcp	LBDEL865_v1_0953	pyrrolidone	0.01				pepQ	LBPLA777_v1_2005		3.00		
		dmpA	LBDEL865_v1_1401	carboxylate	0.03	0.44	3.38		pepX	LBPLA777_v1_0701		1.22		
		pepQ	LBDEL865_v1_0564	peptidase	0.61					LBPLA777_v1_0436		0.52		
									ybbK	LBPLA777_v1_0292	membrane protease	0.75		
								yugP	LBPLA777_v1_2848		0.95		0.69	
		LBDEL865_v1_1424	zinc protease	0.04					LBPLA777_v1_2044	zinc protease	0.52			
								clpL	LBPLA777_v1_3140		1.65		1.73	
									LBPLA777_v1_1154		0.02			
								rasP	LBPLA777_v1_1757	protease	0.60		1.74	
									LBPLA777_v1_1898		0.31		1.92	
								tsaB	LBPLA777_v1_0566	tsaD protease	0.71		0.77	
								yfmH	LBPLA777_v1_2043	protease	0.61			

path	<i>Ld865</i> base expression			<i>Ld865</i> DE genes				<i>Lp777</i> base expression			<i>Lp777</i> DE genes			
	genes	locus tag	product	at pH 6.5	pH 6.5->6.0	pH 6.0 ->5.0	pH 5.0 ->4.5	genes	locus tag	product	at pH 6.5	pH 6.5->6.0	pH 6.0 ->5.0	
Cofactors and vitamins metabolisms (red: reductase, po: peroxydase)								folE	LBPLA777_v1_2879	tetrahydrofolate biosynthesis	0.12		1.69	
									LBPLA777_v1_2876		0.28			
									LBPLA777_v1_2878		0.44			
									LBPLA777_v1_2880		0.08			
									LBPLA777_v1_2881		0.11			
		folC	LBDEL865_v1_1306	tetrahydrofolate biosynthesis	0.11				folC	LBPLA777_v1_2057		0.18		
									dfrA	LBPLA777_v1_1610		0.35		1.55
										LBPLA777_v1_2479		0.86		0.54
									glyA	LBPLA777_v1_2114		0.60		
									pdhD	LBPLA777_v1_1911		1.75		
									yitJ	LBPLA777_v1_1170		0.52	5.39	15.9
		folD	LBDEL865_v1_0736		0.14				folD	LBPLA777_v1_1369	folate transformations	0.30		2.05
				folate transformations					folN	LBPLA777_v1_1343		0.10		
		fhs	LBDEL865_v1_1072		1.75				fhs	LBPLA777_v1_1532		0.15		3.36
			LBDEL865_v1_0676		0.12				thyB	LBPLA777_v1_1611		0.58		1.97
		purN	LBDEL865_v1_0719		0.00				purN	LBPLA777_v1_2376		0.02		36.3
									glyA	LBPLA777_v1_2114		0.60		
										LBPLA777_v1_0631		0.25		
										LBPLA777_v1_2019		0.30		1.46
										LBPLA777_v1_2854		0.07		
		garK	LBDEL865_v1_1051		0.02					LBPLA777_v1_3078	formaldehyde assimilations	0.03		
		eno	LBDEL865_v1_0027		0.25				eno	LBPLA777_v1_0638		40.7		0.70
		eno	LBDEL865_v1_0843		28.6				eno	LBPLA777_v1_1656		0.00		3.30
			LBDEL865_v1_1278	formaldehyde assimilations	0.02				pgm	LBPLA777_v1_0182		0.56		0.63
		gpmA	LBDEL865_v1_0429		0.08				pgm	LBPLA777_v1_0736		0.79		
		gpmA	LBDEL865_v1_1744		13.1				pgm	LBPLA777_v1_0737		0.68		
		ppc	LBDEL865_v1_1518		0.75					LBPLA777_v1_2060	glutathione biosynthesis	0.05		
									gshAB	LBPLA777_v1_2078		0.23		
									gpo	LBPLA777_v1_0197	glutathione po	0.25		
									npr	LBPLA777_v1_1230	NADH peroxidase	0.04		
		npr	LBDEL865_v1_0509	NADH peroxidase	1.05	0.62			npr	LBPLA777_v1_2245		7.86		
			LBDEL865_v1_0079	glutathione reductase	1.80			0.49		LBPLA777_v1_3000	peroxidase	0.45		0.74
			LBDEL865_v1_0134		6.08		3.11		katA	LBPLA777_v1_3135	catalase peroxidase	0.37		
			LBDEL865_v1_0974		0.24	2.37	0.56			LBPLA777_v1_0333	glutathione red	0.96		1.60
		trxB	LBDEL865_v1_1406	thioredoxin red	0.35	1.63	3.73		trxB	LBPLA777_v1_0611		1.98		1.44
		ribBA	LBDEL865_v1_1902		0.18			2.28	ribBA	LBPLA777_v1_1223		0.00		9.74
			LBDEL865_v1_1904		0.15					LBPLA777_v1_1221		0.01		7.43
		ribH	LBDEL865_v1_1901	riboflavin biosynthesis	0.05				ribH	LBPLA777_v1_1224	riboflavin biosynthesis	0.01		
		ribE	LBDEL865_v1_1903		0.07				ribE	LBPLA777_v1_1222		0.00		
		ribC	LBDEL865_v1_0824		0.66					LBPLA777_v1_1739		0.87		
		LBDEL865_v1_0037	riboflavin transporter	0.12					LBPLA777_v1_0695		0.01			
		LBDEL865_v1_1194		0.78	1.65	2.11	2.54		LBPLA777_v1_1626	riboflavin t	0.66		1.86	
	bioY	LBDEL865_v1_0088	biotin/riboflavin t	0.62	2.81	3.48	2.13		LBPLA777_v1_1602	flavin monooxygen	0.02		3.30	
	pox	LBDEL865_v1_0580		9.59	0.25	2.17		pox	LBPLA777_v1_0694		0.06			
	pox	LBDEL865_v1_1968	pyruvate oxidase	12.9	0.24			pox	LBPLA777_v1_0696		0.68			
								pox	LBPLA777_v1_2305	pyruvate oxidase	0.47			
								pox	LBPLA777_v1_3143		0.01		2.46	
								pox	LBPLA777_v1_3145		4.06			

c) *Lp777* possess soy carbohydrate degradation pathways absent in *Ld865*

Both, *Lp777* and *Ld865* possessed genes coding for sucrose hydrolase (*scrB*), glucokinase (*glcK*) and fructokinase (*fruK*) enabling sucrose, glucose and fructose degradation and complete glycolysis pathways (Table 14).

On the contrary, only *Lp777* possessed genes *agaSR* coding for α -galactosidase necessary to stachyose, raffinose or melibiose degradation. In addition, only *Lp777* possessed the complete Leloir pathway (*ga/TEK*) enabling galactose degradation (Table 14).

In fermentation, both strains had glycolysis pathway but only *Lp777* had complete pentose-phosphate pathway. Products from pentose phosphate pathways can be necessary for the production of amino acids.

d) *Lp777* possess various amino acids biosynthesis pathways absent in *Ld865*

Both strains possessed genes coding for threonine, lysine biosynthesis, branched-chain-amino-acid aminotransferase (*ilvE*) and diverse proteases and peptidases that can provide free amino acids from soy proteins (Table 14). Both strains possessed *mccB* enabling cysteine biosynthesis pathway from cystathionine and cysteine degradation. *Lp777* only had however *mccA* and serine acetyltransferase gene to synthesize cysteine from serine (Table 14).

Lp777 possessed complete pathways for histidine and tryptophan biosynthesis from D-ribose-5-P and D-erythrose-4P produced in pentose phosphate pathway. These two pathways were absent in *Ld865*. *Lp777* possessed also complete pathways for arginine and glutamate biosynthesis that were uncomplete in *Ld865* (Table 14).

e) *Lp777* possess cofactor and vitamin metabolisms absent in *Ld865*

The cofactors and vitamins metabolism focused next are those implicated in the oxidation-reduction potential modulation.

Both, *Lp777* and *Ld865* presented genes coding for riboflavin biosynthesis, NADH peroxidase, pyruvate oxidase, NADPH reductase, oxidoreductase, glutathione reductase, methionine sulfoxide reductase, thioredoxine reductase (Table 14).

Lp777 possess genes coding catalase, ubiquinol reductase, urocanate reductase, NADH oxidase and complete pathway for glutathione, tetrahydrofolate biosynthesis and folate transformations, whereas *Ld865* does not possess these complete pathways (Table 14).

A specific metabolism was induced in soy juice fermentation (Table 14). As presented in material and methods, RNA-seq data analyses consisted in comparing the genes expression dynamics in SJ fermentation. We analyzed here expression dynamics of the complementary pathways presented above in monoculture.

f) *Lp777* soy oligosaccharides degradation pathway was not differentially expressed along SJ fermentations in monoculture

To identify different genes expressions that may be complementary. Base expressions and regulations of *Lp777* and *Ld865* metabolisms in monocultures were investigated by comparing DE genes between growth phases determined by pH.

Lp777 *agaS* gene coding α -galactosidase was constitutively expressed along SJ fermentation in monoculture (Table 14). *Lp777* *agaS* gene was highly expressed, 13 times more than its global gene expression. *agaR* genes coding also α -galactosidase were conversely expressed 3 and 13 times less than mean *Lp777* genes expression (Table 14).

In *Lp777*, sucrose degradation was constitutively expressed and galactose degradation metabolism was induced in exponential phase (from pH 6.0 to 5.0). *Ld865* induced sucrose, glucose and fructose pathways also during exponential phase (Figure 25, Table 14).

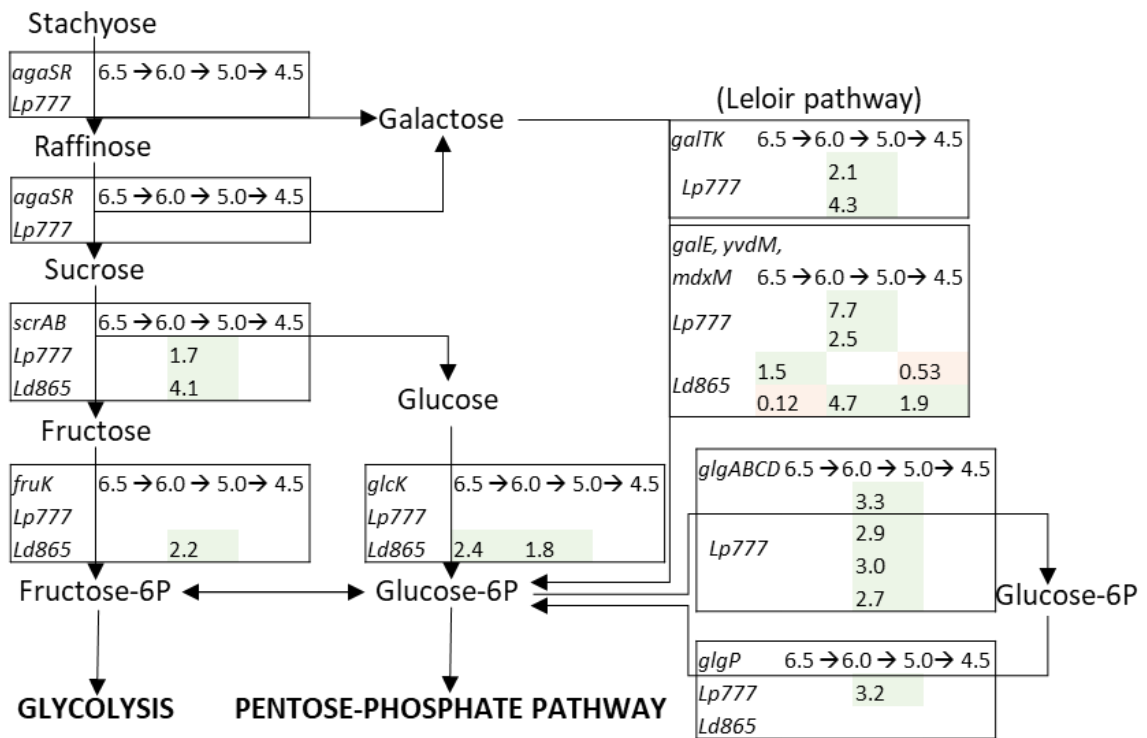


Figure 25. Differential expression of *Ld865* and *Lp777* genes implicated in soy sugars degradation along soy juice fermentation in monoculture. Tables present if genes were present in *Lp777* and/or in *Ld865* genomes and fold changes of these genes between pH 6.5 and pH 6.0, ii. between pH 6.0 and pH 5.0 and iii. between pH 5.0 and pH 4.5. Red color is used to highlight fold repression (<1) and green color is used to highlight fold induction (>1) in through SJ fermentation.

g) Complementary expressions were set up in *Ld865* and *Lp777* monocultures AA metabolisms

Both strains had about one third of genes coding for protease and peptidase that were more expressed than their global mean gene expression at pH 6.5. During exponential growth phase, 50 and 68 % genes DE coding for proteases and peptidases were upregulated in monocultures of *Ld865* and *Lp777* respectively (Table 14).

In AA anabolism, complementary expressions could be observed in genes present in both strains. All *Ld865* genes DE implicated in lysine (*asd*, *dapAHI*, *lysA*) and branched-chain AA (*ilvE*) biosynthesis were not constitutively expressed or downregulated while all *Lp777* genes DE implicated in these AA biosynthesis (*dapABHI* and *ilvE*) were constitutively expressed or upregulated (Table 14).

In *Lp777* complete pathways coding for AA biosynthesis that were uncomplete in *Ld865*, only *trpCDF* genes implicated in tryptophan biosynthesis were upregulated in exponential phase (Table 14).

Both strains downregulated genes implicated in cysteine metabolism during SJ fermentation. *Lp777* downregulated *mccAB* genes during exponential phase and *Ld865* downregulated *mccB* gene at the beginning of exponential phase (Table 14).

h) Expression regulation of genes implicated in cofactors and vitamins metabolisms during SJ fermentation were distinct between *Ld865* and *Lp777* monocultures.

In both *Lp777* and *Ld865* fermentation, genes coding for pyruvate oxidases (*pox*), NADH peroxidase (*npr*) and enolase were expressed. *Ld865* expressed in addition two genes coding for glutathione reductase, that can contribute to control the redox. *Lp777* expressed in addition a gene coding thioredoxin reductase.

At the beginning of exponential phase, no *Lp777* genes implicated in cofactors and vitamins metabolisms were DE while *Ld865* downregulated genes coding for pyruvate oxidases (*pox*), NADH peroxidase (*npr*) and upregulated reductases.

In exponential phase, both *Lp777* and *Ld865* upregulated genes coding for reductases and oxidases. Only *Lp777* upregulated however genes implicated in riboflavin biosynthesis and folate transformations. *Ld865* upregulated meanwhile biotin and riboflavin importers all along SJ fermentation.

Discussion

The present work aims to study two strains of LAB, i.e. *Lp777* and *Ld865*, to identify in each strain uncomplete/lacking metabolic pathways that impaired or reduced growth during fermentation of soy juice. It also aims to identify complementarities between the two strains which might help strain selection and association that improved SJ fermentation. For that purposes, the genomes of *Lp777* and *Ld865* were analyzed as well as their transcriptomes during fermentation of SJ.

SJ fermentation is a stressful environment as it is poor in sucrose, poor in free AA and provokes oxidative stress (Figure 24, Table 12 et Table 13). We focused on specific metabolisms that appeared therefore as the most important in SJ fermentation, i.e.

metabolisms of oligosaccharides, amino acid, vitamins and cofactors that can decrease the oxidative stress.

- ***Lp777* and *Ld865* genomes are distinct and their metabolisms are complementary**

L. plantarum specie presents the biggest genome (3075 genes) and core-genome (1037 genes) while *L. delbrueckii* specie presents the smallest genome (1873 genes) and core genome (756 genes) among *Lactobacilli* (Inglin et al., 2018). *L. plantarum* is a facultatively heterofermentative specie and *L. delbrueckii* an homofermentative specie (Vos et al., 2009). Concerning AA auxotrophy, *L. plantarum* can be auxotroph for 6 AA (Ma et al., 2016) while *L. delbrueckii* can be auxotroph for 14 AA (Hébert et al., 2004) but *L. delbrueckii* strains present a high proteolytic activity (Sasaki et al., 1995; Savijoki et al., 2006). The genomes of *L. plantarum* and *L. delbrueckii* are regrouped in distinct clades of species among Lactobacillaceae as they evolved also differently (Inglin et al., 2018; Zheng et al., 2020).

Particularly, *Lp777* and *Ld865* have 1188 orthologous genes. *Lp777* has 1210 more coding sequences (CDS) than *Ld865*. In COG categories, *Lp777* G group (Carbohydrate transport and metabolism) compose a bigger part of the genome (9.3%) than E group (Amino acid transport and metabolism, 8.8%), while, conversely, *Lp777* contains more genes in E group (9.9%) than in G group (6.6%). These results are in accordance with the phenotype observed as both strains present a high proteolytic activity (Table 13). These results are susceptible to favor a proto-cooperation like in other LAB cooperation (Li et al., 2019; Settachaimongkon et al., 2014; Sieuwerts, 2016; Sieuwerts et al., 2010). In addition, *Ld865* presents an optimal nitrogen utilization like in yogurt starter (Liu et al., 2016). It was also shown that proto-cooperation could enhance *L. plantarum* growth (Di Cagno et al., 2003; Mäkimattila et al., 2011).

- ***Lp777* and *Ld865* complementation in oligosaccharides degradation**

In a previous study, we showed that *Lp777* can use raffinose and stachyose during growth in culture medium but *Ld865* cannot (Harlé et al. 2020, part II of the thesis). In the present study we deciphered the genetic basis of these two strains to degrade these oligosaccharides. In accordance with (Olivier Harlé et al., 2020), we showed here that only *Lp777* possess a gene coding α -galactosidase and expressed it in SJ fermentation.

Analyses of sugar contents showed that both strains consumed sucrose, but no stachyose nor raffinose during SJ fermentation (Table 12). The present study showed that *Lp777* constitutively express sucrose degradation. *Ld865* upregulated most genes implicated in carbohydrate catabolism in exponential phase.

We can hypothesize that in coculture *Lp777* and *Ld865* would compete for sucrose catabolism . *Lactobacilli* α -galactosidase activity is the highest with stachyose, induced with

melibiose, raffinose, repressed with sucrose, fructose, galactose and the lowest with glucose (Farzadi et al., 2011; Garro et al., 1996; Silvestroni et al., 2002; Yoon and Hwang, 2008). Competition for sucrose might therefore induce raffinose and stachyose catabolism. No stachyose nor raffinose degradation was observed in SJ monocultures (Harlé et al., 2020, i.e. part II and Table 12). We hypothesize that a competition for sucrose in coculture may induce an upregulation of genes coding for *Lp777* α -galactosidase. It could therefore reduce stachyose or raffinose concentrations as in SJ coculture of LAB and Bifidobacteria (Wang et al., 2003).

Lp777 upregulated genes implicated in galactose catabolism in exponential phase. This upregulation might come from galactose release as galactose induced its catabolism in *L. lactis* cultivated in M17 (Grossiord et al., 2003).

- ***Lp777* and *Ld865* complementation in AA metabolism**

Lp777 and *Ld865* present various complementation in AA metabolism. Both strains possess genes coding for proteases and peptidases. One third of these genes were expressed. *Lp777* upregulated more genes coding for proteases and peptidases than *Ld865*. This last fact might result from the less effective release of AA in *Lp777* than in *Ld865* monoculture (Table 13).

Lp777 possess pathways for histidine, tryptophan, arginine and glutamate biosynthesis that are uncomplete in *Ld865*. Only tryptophan biosynthesis pathway was significantly upregulated in *Lp777* monoculture. This suggests that *Lp777* may benefit from *Ld865* tryptophan supply in coculture.

Both strains possess genes coding for AA biosynthesis like lysine and branched-chain AA. All these genes were mostly downregulated in *Ld865* monoculture and upregulated in *Lp777* monoculture. It suggests that *Lp777* may benefit from all these AA supply from *Ld865* in coculture.

- ***Lp777* and *Ld865* complementation in cofactors and vitamins metabolism**

The oxidation represents the capacity to remove electrons. LAB must limit oxidation within cells as it degrades cell structure, mutes DNA and limit protein activity (Ezraty et al., 2017). Various genes coding for cofactors and vitamins metabolisms were present in *Lp777* but absent in *Ld865*. *L. plantarum* is known for producing various vitamins (LeBlanc et al., 2013; Li et al., 2016). Glutathione and folate have been found to be important in *S. thermophilus*-*L. delbrueckii* cooperation in dairy-based yogurt fermentation (Sieuwerds, 2016). Several studies showed that vitamins of B group provided synergistic effects in soy fermentation (Tangyu et al., 2019). For example, riboflavin was implicated in *L. reuteri* and

P. freudenreichii cooperation by balancing oxidation-reduction reaction in tofu fermentation (Zhu, 2020; Zhu et al., 2020).

The presence/absence of genes encoding the synthesis of cofactors and vitamins metabolisms could be linked with their Eh kinetics presenting that *Lp777* reduces more SJ than *Ld865* during fermentation (Figure 24C). The Eh represents the capacity to gain and remove electrons, it is equivalent to reduce and oxide, respectively. LAB must keep a reducing environment to state NAD⁺, limit oxidation within cells and regulate intracellular pH (Calderini et al., 2017; Nadja Larsen et al., 2016; Martin et al., 2013). H₂O₂ and O₂ elimination with respectively catalase and NADH oxidase is a prerequisite for *L. lactis*, *E. faecalis* and *S. thermophilus* milk reduction (Jeanson et al., 2009; Tachon et al., 2010).

Conclusion

Taking as an example two strains of LAB, i.e. *Lp777* and *Ld865*, we investigated how genomes analysis could help to predict how they could cooperate to improve soy juice fermentation. Three metabolisms, i.e. carbon source, AA, vitamins and cofactors are especially important in SJ fermentation and thus have been particularly investigated.

In the present study, genomic complementarity analysis revealed that *Lp777* can produce various enzymes that could help *Ld865* in soy juice fermentation, as α -galactosidase, and also glutathion. Knowledge of *Ld865*, revealed that its proteolytic activity releases free AA and peptides that could help *Lp777* during fermentation in coculture. The transcriptomic approach helped to better understand how these LAB could cooperate. Indeed, both strains transcriptional activity in SJ fermentation revealed other metabolic complementation in the three metabolisms of interest. Finally, metabolomic analyses of sugars consumed or AA released during monoculture fermentation helped also to predict potential metabolic complementarity. Eh reduction kinetics can however be another good basis to predict metabolic complementarity.

The effective implication of these carbon sources, AA, vitamins and cofactors metabolisms has now to be studied in order to confirm the origin of *Lp777-Ld865* cooperation in SJ fermentation. This is the aim of the next part of the present thesis.

D. Conclusion

Cette étude a montré que *Lp777* et *Ld865* présentent des génomes, des transcriptomes et des métabolomes complémentaires en monoculture de jus de soja. Les métabolismes carbonés, des AA, des vitamines et des cofacteurs doivent ensuite être étudiés en coculture afin de confirmer leur implication dans la coopération entre *Lp777* et *Ld865* en fermentation de jus de soja. C'est ce qui est présenté ensuite.

V. Bases moléculaires des interactions positives entre *L. plantarum* CIRM-BIA777 et *L. delbrueckii* CIRM-BIA865 en fermentation de jus de soja.

A. Introduction

Précédemment, des associations de LAB ont été sélectionnées selon leur coopérativité. Diverses complémentarités métaboliques entre *Lp777* et *Ld865* ont été observées. Diverses interactions potentielles de compétition, de « cross-feeding » et de coopération ont été établies et pourraient être responsables de l'augmentation de la vitesse de fermentation du jus de soja en coculture.

Cette dernière partie a pour objectif d'étudier les interactions qui ont lieu entre *Lp777* et *Ld865* lors de la fermentation du jus de soja en coculture. Pour cela, les bases moléculaires des métabolismes de *Lp777* et *Ld865* en monoculture ont été comparées avec celles des cocultures. Dans un premier temps, l'ensemble des interactions sont présentées sous forme d'article. Une seconde partie compare ensuite les composés volatils identifiés en monoculture par rapport aux composés volatils produits en coculture.

Molecular bases of *Lactobacillus delbrueckii* CIRM-BIA865 and *Lactiplantibacillus plantarum* CIRM-BIA777 positive interactions in soy juice fermentation.

(Draft version of the paper before submission to a scientific journal)

Olivier Harlé^{1,2}, Stéphanie-Marie Deutsch¹, Jérôme Niay², Florence Valence¹, Sandrine Parayre¹, Aurélie Nicolas¹, Julie Aubert³, Marie-Bernadette Maillard¹, Gwenaële Henry¹, Anne Thierry¹, Éric Guédon¹, Hélène Falentin^{1*}

1INRAE, Institut Agro, STLO, 35042, Rennes, France

2Triballat Noyal, R&D UF, 35530, Noyal-sur-Vilaine, France

3INRAE, AgroParisTech, MIA, 75231, Paris, France

* Corresponding Author: helene.falentin@inrae.fr

KEYWORDS: soymilk, dual transcriptomics, metabolomics, competition and cooperation.

ABSTRACT:

Lactic acid bacteria (LAB) are largely used in food fermentations, mainly in coculture. The use of different LAB species or strains as starter can bring complementary functionalities participating to the overall quality of the fermented food. Fermentation can benefit from LAB's interactions, resulting in a more efficient fermentation process. Few is known about positive LAB's interactions that are beneficial to plant based fermentation processes. *Lactobacillus delbrueckii* CIRM-BIA865 (*Ld865*) and *Lactiplantibacillus plantarum* CIRM-BIA777 (*Lp777*) are two strains able to ferment soy juice (SJ). In SJ monocultures, *Ld865* released 17 amino acids while *Lp777* consumed 10 of the 17 amino acids released by *Ld865*. When these strains were cocultivated in SJ, the fermentation time was reduced of 30% compared to monocultures. Furthermore, *Ld865* cells were four times shorter in coculture than in monoculture and *Ld865* population increased tenfold. In this work, we aimed to reveal how *Lp777* and *Ld865* interact with each other to improve SJ fermentation. Thanks to transcriptomic and metabolic analyses carried out along the kinetic of fermentation, we compared the adaptations of their metabolisms in coculture versus in monoculture. Transcriptomics data showed, among others, that *Lp777* induced the expression of genes involved in the regulation of oxydo-reduction potential at a higher level in coculture than in monoculture. The oxydo-reduction potential measured in the SJ fermented in coculture was intermediate between those measured in *Lp777* and *Ld865* monocultures. The better regulation of the oxydo-reduction potential in coculture seems to involve methionine released and the degradation of hydrogen peroxyde by *Ld865*. *Lp777* and *Ld865* could also cooperate to metabolize carbon. In conclusion, strains of LAB with distinct and complementary metabolic profiles can be useful to take over SJ fermentation. This work opens new avenues for the selection of strains intended to cooperate in plant-based fermentation.

a) Introduction

Plant-based proteins compose 40% of protein source in Western diet (versus 60% of animal-based protein). A balanced protein source composed of 50% of plant-based protein is healthier and may contribute to meeting worldwide protein needs while limiting environmental impacts of food systems (Springmann et al., 2018). Among plant-based protein source, soybean [*Glycine max*] is interesting because of its high protein content. In this context, soy juice (SJ) represents an interesting alternative to animal milk thanks to its high protein content (35 g/L) and its capacity to produce a yogurt-type fermented soy juice (FSJ) without texturing agent (Mital and Steinkraus, 1979).

The lactic fermentation of soy juice by lactic acid bacteria (LAB) to produce a yogurt-type fermented soy product is a sustainable and inexpensive process for the preservation of soy juice.

To ferment, LABs need various nutrients including carbohydrates, amino acids (AAs), lipids and vitamins. Because SJ is a water extract of soybean, its composition vary according to the process of manufacture. Regardless of the process implemented, SJ is always an important source of proteins (35 g/L) and lipids (18 g/L) (USDA, 2019). Concerning carbohydrates, SJ can contain different amounts of sugar (ranging from 1 to 35 g/L) (Garro et al., 1998; Singh and Vij, 2018) including 50% of sucrose and 50% of stachyose and raffinose. These two oligosaccharides are poorly digestible by humans, and can cause digestive discomfort and flatulence (Guillon and Champ, 2002). Sucrose is catabolized by a majority of LABs (Olivier Harlé et al., 2020). Raffinose and stachyose contents can be reduced by some strains of *Lactobacillus* and *S. thermophilus* (Donkor et al., 2007; Hati et al., 2014; Mital and Steinkraus, 1975; Pontonio et al., 2020; T. R. Chen, 2011; Yoon and Hwang, 2008). To date, from 72 publications that studied FSJ, a unique publication presented a significant reduction of raffinose and stachyose in soy juice with a *L. plantarum* and four *L. rhamnosus* strains (Yoon and Hwang, 2008). Through fermentation, some properties of SJ can be improved, especially organoleptic properties. Lactic acid fermentation can contribute to reduce “off-flavors” and/or increasing “hedonic-flavor” compounds (Mital and Steinkraus, 1979; Siroli et al., 2019).

Several studies report that LAB strains can bring diverse functionalities in lactic fermented food (Cappello et al., 2017; Olivier Harlé et al., 2020). An approach to improve lactic fermentations consists to use diverse species or strains of LABs as starter in order to bring complementary functionalities to the overall quality (Smid and Lacroix, 2013). The food fermented with a consortia or a coculture of LABs can in addition benefit from LAB's interactions, resulting in a more efficient fermentation process, as it is the case for *L. delbrueckii* and *S. thermophilus* in milk yogurt fermentation (Sieuwerds, 2016). Milk yogurt coculture has however evolved and have been selected through centuries (Aryana and Olson, 2017). LAB interactions are diverse, specific to the strains and to the matrix and often complex (Faust and Raes, 2012; Garcia et al., 2019; Rathore et al., 2012). Scientists can help to develop cocultures able to ferment raw material and satisfying modern societal demands (Tamang et al., 2020). However, few is known about LAB's interactions that are beneficial to SJ fermentation processes (Wang et al., 2003a; Garro et al., 2004; Donkor et al., 2005; Farnworth et al., 2007; Yoon and Hwang, 2008).

In a previous study, thirteen LAB duos of strains issued from Harlé et al., 2020 were tested to increase SJ fermentation rate. The selection of LAB duos was realized in order to associate a strain able to use stachyose with a strain that ferment SJ efficiently. Among the duos tested, a unique one, constituted of *Lactobacillus delbrueckii* CIRM-BIA 865 (*Ld865*) and *Lactiplantibacillus plantarum* CIRM-BIA 777 (*Lp777*) reduced significantly SJ fermentation time in coculture compared to monocultures. In the present study, we analyzed the duo *Lp777* and *Ld865* throughout SJ fermentation by monitoring physicochemistry, metabolomics and

transcriptomics. Transcriptomics are an efficient techniques to explore metabolic adaptations and interactions (resulting from LAB-LAB interactions) in consortia The objective of the present study was therefore to explore *Lp777* and *Ld865* metabolic cooperation in coculture compared to monoculture in SJ fermentation, to decipher molecular basis of their positive interaction.

b) Materials and Methods

○ Bacteria and culture conditions

Lactiplantibacillus plantarum (formerly *Lactobacillus plantarum*, Zheng et al., 2020) CIRM-BIA 777 (*Lp777*) and *Lactobacillus delbrueckii* CIRM-BIA 865 (*Ld865*) were provided by the International Centre for Microbial Resources-Food Associated Bacteria (CIRM-BIA, https://www6.inra.fr/cirm_eng/Food-Associated-Bacteria). Before use, the strains were activated from frozen glycerol stocks (-80°C) in Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth with 2 consecutive subcultures of 12 h inoculated at 1% v/v and incubated at 37°C.

API® gallery 50CH profiles (API System, BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) were used according to the manufacturer's instructions in order to analyze *Lp777* and *Ld865* carbohydrate fermentation profiles.

The soy juice used for fermentation was a commercial UHT soy juice (Sojade, Triballat Noyal SAS, France), previously used in Harlé et al., 2020, but from another batch ; referred to as SJ below. The same batch of SJ was used throughout the study. Cultures were carried out under static conditions. In some experimentations, the SJ was supplemented with 100 mg/L of DL-methionine (Merck, France) or L-cystine (Alfa Aesar, Germany).

○ Soy juice fermentations

The experimentations were performed in triplicate from independent subcultures. SJ was inoculated in monocultures with *Lp777* or *Ld865* at 1% v/v or in coculture with *Lp777* at 0.5% and *Ld865* at 0.5% v/v. Incubation was conducted at 37°C and without anoxic conditions to mimic industrial conditions. Samples were collected throughout fermentation when the targeted pH 6.5, 6.0, 5.0 and 4.5 were reached. Cultures were then sampled for population count, cell size measurement, RNA extraction and cooled on ice to store it at -20°C in 40 mL straight containers with screw cap (Corning® Gosselin™) for organic acids, oligosaccharides and amino acids (AAs) analyses.

○ Acidification and oxidation-reduction potential kinetics monitoring

The monitoring of acidification and oxidation-reduction potential (Eh) was carried out in duplicata for 20 h with iCINAC® System (Ysebaert, Frepillon, France) and Mettler Toledo ISM® probes (Ag/AgCl, E0=196 mV at 37°C, Paris, France).

Probes were cleaned in pepsin 1% and HCl 10 mN for 1 h and disinfected with 0.1% sodium hypochlorite for 10 min before calibration. The values were calibrated according to

reference solutions value (pH4, pH7 and 220 mV at 37°C, Mettler Toledo, Viroflay, France) before monitoring. Correction of Eh were performed according to electrode reference and Leistner and Mirna equation as in Abraham et al., 2013 with a regression factor $\alpha=46$ mV/pH unit in SJ at 37°C (n=40 between pH 4 and pH 7).

- **Microbial analyses: Population and cell sizes**

1 mL of FSJ was diluted in 9 mL of Tryptone salt (0.1% Tryptone, AES Laboratoire, Combourg, France; 0.85% NaCl, Labogros, Buchs, France). Serial decimal dilutions were then realized by micromethod as previously described by (Baron et al., 2006). The colony-forming units (CFU) of *Lp777* and *Ld865* population were then both counted on MRS agar pour plate after incubation under anaerobic conditions for 24 h at 30 °C for *Lp777* and 43°C for *Ld865*. Cell population counts were confirmed thereafter with specific qPCR for *Lp777* or *Ld865* alike in Falentin et al., 2010 using specific primers for *Lp777* and designed to specifically target a region of the elongation factor Tu gene (*tuf*) as previously described in Achilleos and Berthier, 2017.

Cell sizes were evaluated with 20 measurements of each samples performed with a phase contrast Olympus BX51 (magnification x100) and Archimed software (Microvision Instruments, Evry, France).

- **Oligosaccharide quantification**

Oligosaccharides were quantified in FSJ by ionic chromatography DIONEX ICS3000. Aliquots (1 g) were deproteinized by adding 40 mg of salicylic acid for 30 min at 0°C then centrifuging 5 min at 4000 g. Supernatant were then diluted by 150 fold in milli-Q® water (Merck, Darmstadt, Germany), filtered (chromafil Xtra PVDF 45/13, Macherey-Nagel, Hoerd, France) and kept frozen at -20°C until analysis. Quantification were performed with external calibration using stachyose, raffinose, sucrose, lactose, glucose, fructose and galactose (Merck, St. Quentin Fallavier, France).

- **Organic acids quantification**

Lactic, acetic, citric, succinic and pyruvic acids were analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC, Dionex, P680, Sunnyvale California) as previously described (Olivier Harlé et al., 2020).

- **Amino acids (AA) quantification**

The total and the free AA amounts were determined by ion chromatography as described by (de Oliveira et al., 2016; Lorieau et al., 2018). Samples were diluted 3-5 fold with the lithium citrate injection buffer (0.2 M - pH 2.2) (Biochrom Ltd., Cambridge, UK).

- **From extraction to sequencing of RNA**

RNA was extracted from 1 mL of FSJ directly treated with 2 mL of RNA protect cell reagent (Qiagen, Hilden, Germany). This sample was centrifuged 5 min at 4°C, 10,000 g to discard the supernatant. The pellet was frozen at -80°C with 2 mL of RNA protect. After defrost, the sample was centrifuged again for 5 min at 4°C, 10,000 g to discard the supernatant. Cell pellets were suspended in 200 µL lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8.0) 20 mg/mL lysozyme (MP Biomedicals, Illkirch, France) and 50 U/mL mutanolysin (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) and incubated for 30 min at 24°C. Suspensions were then transferred to 2 mL tubes containing 50 mg zirconium beads (diameter: 0.1 mm; BioSpec Products, Bartlesville) and 50 µL SDS (20 %). Samples were then shaken in a Precellys Evolution (Bertin, Montigny-le-Bretonneux, France) for two cycles of 40 s at 6500 rpm.

RNA was then extracted from the cell lysate with the RNeasy Mini kit (Qiagen) and a subsequent DNase treatment (Dnase Rnase free, Ambion) according to the manufacturer's instructions. RNA concentrations were quantified using a Nanodrop. Some extraction were realized in duplicates with phenol-chloroform since an unique method was not optimal to extract RNA in every sample. An additional step was realized before RNeasy Mini kit: lysate were transferred in Phase Lock Gel Heavy with 900 µL QIAzol in which 200 µL chloroform was added, left 2 min and centrifuged 15 min at 12,000 g.

RNA quality (RIN) was evaluated using an Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). RNA labeling, hybridization and sequencing were performed by GeneWiz (Leipzig, Germany). All of the RNA samples had a RIN value greater than 6, indicating a good RNA integrity and a quantity higher than 50 mg.

- **Mapping RNA sequences against reference genomes**

Sequenced reads were trimmed, adapted using Trim Galore and mapped against both strains reference genomes with Bowtie 2 (Langmead et al., 2009). These two LAB belong to different species which make their RNA-sequences easy to distinguish in the transcriptomic analysis we made. No mismatch was allowed for each sequencing read and only reads that mapped to unique sequence were further analyzed. Reads mapping to each coding sequence were counted using HTSeq-count (-stranded=reverse, -a 0, -t CDS, -i db_xref, -m union, Anders et al., 2015).

Eight samples were discarded from the study because they did not present a RIN>6 (two unfermented SJ and one *Lp777* monocultured FSJ at pH 6.0) or because more than 10% of reads did not mapped on the right reference genome (one *Lp777* monocultured and one cocultured FSJ at pH 6.5 and three *Lp777* monocultured FSJ at pH 4.5). The discard of the 3 samples from *Lp777* monocultured FSJ at pH 4.5 disabled the comparison of *Lp777* genes expression in monoculture versus coculture at pH 4.5. Raw counts of RNA reads that mapped

on reference genomes of the 53 samples. Cross hybridizing genes were genes with more than 1% of reads that mapped on the other strain reference genome in monoculture. Among all genes, genes *dps* were discarded from the study as *Lp777* and *Ld865* *dps* sequences were cross hybridizing.

- **RNA-seq data analyses**

RNA-seq data were filtered to remove sample with less than 100,000 reads that mapped onto reference genomes. Differential expression analysis was performed with DESeq2 (Love et al., 2014) using SARTools (Varet et al., 2016) on Rstudio (RStudio Team, 2016). DESeq2 analysis was performed to compare monoculture versus coculture both sampled at a same pH, with default parameters but a blocking factor (batch parameter) corresponding to the extraction protocol (with or without phenol-chloroform). Functional classification of the transcriptomic dataset was performed using the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (Kanehisa et al., 2019) and Metacyc annotations (Caspi et al., 2018). Gene transcripts with an adjusted pvalue < 0.05 (false discovery rate correction procedure of Benjamini and Hochberg, 1995) were considered to be differentially expressed (DE) between two conditions.

The strategy of analysis implemented in this study consisted to compare the DE genes in the *Ld865-Lp777* coculture at each pH of the kinetic with each strain monoculture (separately). Fold changes expressed how many times genes were induced in coculture compared to monoculture (+co/mono) or repressed in coculture compared to monoculture (-co/mono). Locus tag and gene names were given to identify DE genes.

- **Statistical analysis**

Concentrations of compounds, Eh, times and pH values were analyzed as repeated measures with the function *aov* and compared using the Tukey HSD test from the package *agricolae* on R studio (Version 1.0.153 – © 2009–2017 RStudio, Inc.). These analyses were used for each compound to determine if the means of concentrations of distinct FSJ or groups of FSJ significantly differ (p-value < 0.05). Rates of growth, pH, Eh reduction, sucrose consumptions and organic acids production were calculated on data between pH 6.5 and 5.0.

c) Results

- **Coculture of *Ld865* and *Lp777* improves SJ fermentation, stimulates *Ld865* growth and cell division**

We compared the fermentation of the soy juice performed by the coculture of *Ld865* and *Lp777* strains with the fermentation of the soy juice performed by each strain in monoculture.

First, when soy juice was fermented by the coculture, the fermentation time required to reach acid pHs was improved. Indeed, 13 h and 27 h were required to reach pH 4.6 for *Lp777*

and *Ld865* respectively in monoculture, whereas this pH value was reached in 9 h with the coculture (Figure 26A).

Second, fermentation in coculture stimulated *Ld865* growth. Indeed, the cell number of *Ld865* was 100-fold greater in the fermentation with coculture compared to monoculture, with maximal populations of $2 \cdot 10^8$ and $2 \cdot 10^6$ cfu/mL respectively. For the strain *Lp777*, the maximal populations reached in coculture and in monoculture were close, with $4 \cdot 10^8$ cfu/mL and $5 \cdot 10^8$ cfu/mL respectively (Figure 26B). Note that the maximal population of *Ld865* in monoculture was close to the number of inoculated cells ($1 \cdot 10^6$ cfu/mL), indicating that *Ld865* did not grow in SJ monoculture.

To confirm this *Ld865* enumeration data obtained by cfu counts, the number of cells was estimated through an absolute quantification of copy numbers of target genes by real-time PCR. This was realized in monoculture and in coculture (Figure 26C). In monoculture, the quantities of *Ld865* cells immediately after inoculation and at the end of the fermentation were close ($8 \cdot 10^6$ and $7 \cdot 10^6$ DNA copy/mL respectively), confirming the absence of growth of *Ld865* observed by cfu counts by cultural method. Furthermore, this maximal quantities of *Ld865* cells in monoculture is also lower than that measured in coculture ($6 \cdot 10^7$ DNA copy/mL), demonstrating a positive effect of coculture on *Ld865* growth. For the strain *Lp777*, the maximal population estimated by the same method (with *tuf* gene) were similar in mono- and coculture ($2 \cdot 10^8$ DNA copy/mL) and were in agreement with the enumeration data.

In monoculture, as mentioned previously, the number of *Ld865* cells remained unchanged through SJ fermentation, although *Ld865* was able to acidify the SJ. In the same time, we noted that the size of *Ld865* cells increased from 4 ± 1 μ m at inoculation to 10 ± 1 μ m at pH 6.5, 19 ± 2 μ m at pH 6.0 and up to 37 ± 3 μ m at pH 5.0. The elongation of *Ld865* cells was not observed when the bacterium was cultivated with *Lp777* in SJ (5 ± 1 μ m at pH 6.5, 7 ± 1 μ m at pH 6.0, 5 ± 1 μ m at pH 5.0). When *Ld865* was cultivated in monoculture in MRS medium, no such elongation of cells was observed during acidification and the cell sizes were 4 ± 1 μ m (data not shown). This phenomenon was specific to *Ld865* cells, since *Lp777* cell sizes remained unchanged between mono- and coculture (2 ± 1 μ m) (Figure 30). To sum up, monoculture of *Ld865* in SJ promoted abnormal cell elongation. This phenomenon was reverted when cells were cocultivated with *Lp777* which benefited to SJ fermentation.

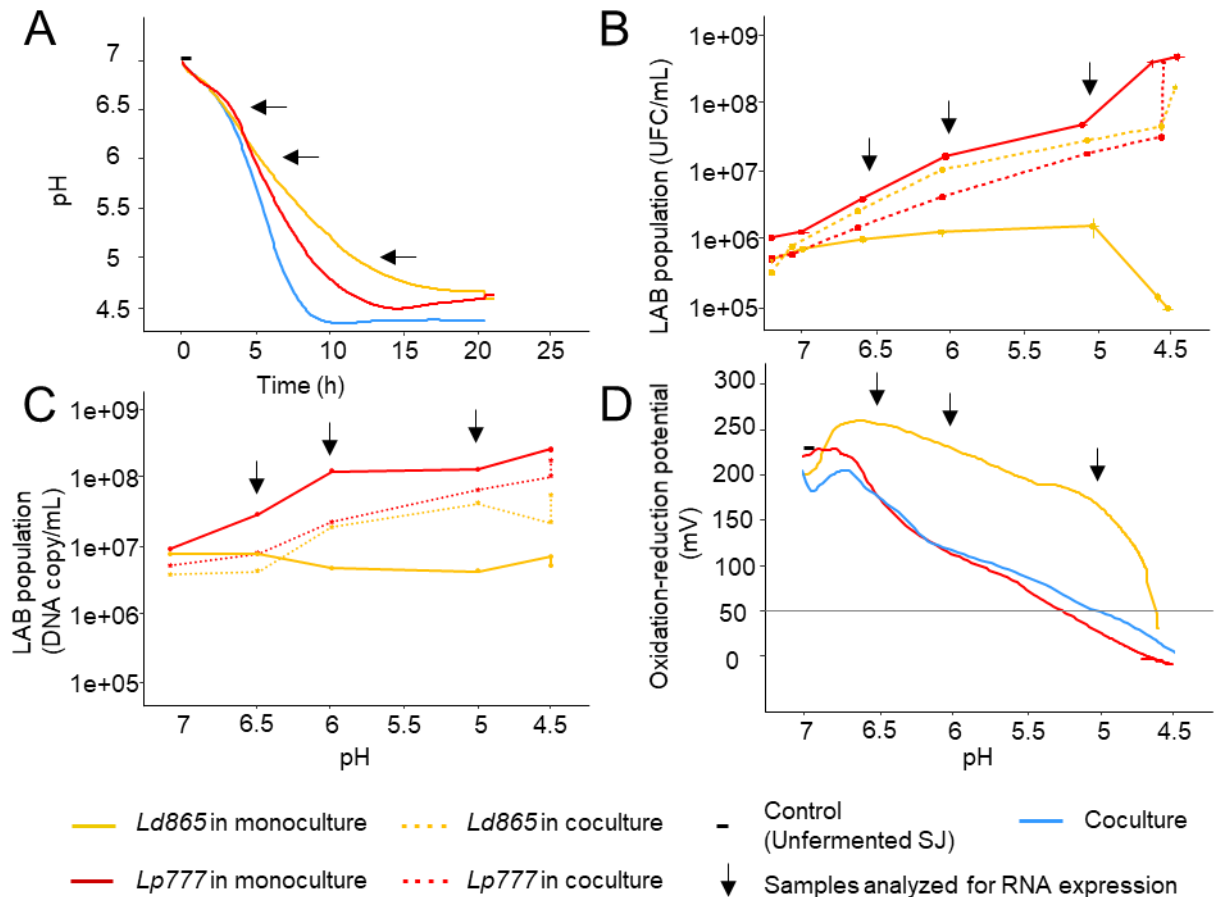


Figure 26. Fermentation of soy juice at 37°C by *Lp777* and *Ld865* in mono- and coculture. A. represents acidification kinetics during SJ fermentation, B. and C. represent LAB population growth during SJ fermentation expressed in cfu/mL and in DNA copy/mL, respectively and D. represents oxidation-reduction potential kinetics in SJ fermentation in mV. The sampling points for transcriptomic and metabolomic analyses are indicated with an arrow.

○ **Coculture of *Ld865* and *Lp777* influences the oxidation-reduction potential kinetic**

The unfermented SJ presented an extracellular Eh of 223 ± 1 mV, corresponding to an oxidizing environment. The SJ fermentation by *Ld865* and *Lp777*, in coculture and monocultures generated a reducing activity, characterized by a decrease of the extracellular Eh (Figure 26D). Coculture modified the dynamic and kinetic of changes in oxidation-reduction potential induced by individual strains during SJ fermentation. Eh reduction rate was intermediate in coculture (-78 ± 4 mV/upH) when compared to monocultures (-60 ± 7 mV/upH for *Ld865* and -91 ± 10 mV/upH for *Lp777* monoculture).

- **Fermentation of SJ by the coculture of *Ld865* and *Lp777* induces a superior release of galactose**

The unfermented SJ contained 4.8 g/L of sucrose, 3.6 g/L of stachyose, 0.9 g/L of raffinose, 0.6 g/L of fructose, 0.5 g/L of glucose and 0.01 g/L of galactose (Table 15). The oligosaccharide contents were monitored during the fermentation. Regardless of the SJ fermentation (coculture or monocultures), the main consumed carbon source was sucrose. There were no starvation in sucrose with a maximal sucrose consumption of 3.8 ± 0.1 g/L (Table 15).

Galactose was released in *Ld865*-derived cultures. Galactose amounts was superior in cocultured FSJ (0.04 g/L) than in *Ld865* monocultured FSJ (0.01 g/L). Concentrations of stachyose and raffinose did however not significantly changed during SJ fermentations.

- **Coculture induces a superior production rates of lactic, acetic and succinic acids**

The unfermented SJ contained 0.6 g/L of citric acid, but no lactic, acetic, pyruvic nor succinic acid (Table 15).

The production rate was calculated for lactic, acetic and succinic acids. Lactic acid production rate in coculture (0.70 g/L/h) was higher than lactic acid production rates in monocultures (0.41 g/L/h in *Lp777* and 0.21 g/L/h in *Ld865* monoculture) (Figure 27B). In parallel, sucrose reduction rate was higher in coculture (0.60 g/L/h) than sucrose reduction rates in monocultures (0.32 g/L/h in *Lp777* and 0.30 g/L/h in *Ld865* monoculture) (Figure 27A).

Production rates of acetic and succinic acids were superior in coculture (0.05 g/L/h for acetic and 0.02 g/L/h for succinic acids) than those in monocultures (0.03 g/L/h for acetic and 0.01 g/L/h for succinic acids) (Figure 27CD).

Table 15. Oligosaccharides and organic acids concentrations in unfermented soy juice and in fermented soy juices at different pHs. Soy juice was fermented with *Ld865* and *Lp777* in monocultures or with both strains in coculture. Color gradients are used show magnitude of concentrations of each metabolites. Letters after the concentrations indicate statistical differences from a Tukey test with an alpha error of 0.05.

Names	pH	time (in h)	Carbohydrates concentrations (in g/L)								
			sucrose	stachyose	raffinose	glucose	fructose	galactose	melibiose	maltose	lactose
T	7.0		4.8 a	3.6 a	0.9 ab	0.5 cde	0.6 cd	0.01 def	0.08 b	0.02 a	0.04 a
<i>Ld865</i>	6.5	3.3 j	4.8 a	3.8 a	0.9 ab	0.9 abc	1.2 abc	0.01 cde	0.12 ab	0.00 c	0.02 b
	6.0	5.8 g	4.0 ab	3.6 a	0.9 ab	1.0 ab	1.4 ab	0.01 bc	0.14 ab	0.00 c	0.02 b
	5.0	10.8 c	2.6 cd	3.9 a	1.0 a	1.2 a	1.7 a	0.02 b	0.16 ab	0.00 c	0.03 b
	4.5	26.6 a	1.3 fg	3.9 a	0.9 ab	0.4 de	0.7 cd	0.02 b	0.10 ab	0.00 c	0.02 b
<i>Ld865 and</i>	6.5	3.9 i	4.3 ab	3.4 a	0.8 b	1.1 a	1.6 a	0.01 def	0.16 ab	0.00 c	0.02 c
	6.0	4.7 h	3.6 b	3.4 a	0.9 ab	1.2 a	1.6 a	0.01 cd	0.15 ab	0.00 c	0.02 c
	5.0	7.2 f	2.2 de	3.7 a	0.9 ab	1.1 ab	1.6 a	0.04 a	0.17 a	0.00 c	0.01 cd
<i>Lp777</i>	4.5	8.9 e	1.0 g	3.5 a	0.9 ab	0.4 de	0.8 bcd	0.04 a	0.13 ab	0.00 c	0.01 de
	6.5	3.4 ij	3.9 ab	3.4 a	0.9 ab	1.1 ab	1.4 ab	0.00 ef	0.13 ab	0.02 a	0.01 c
	6.0	5.6 g	3.4 bc	3.9 a	0.9 ab	1.0 ab	1.2 abc	0.00 def	0.10 ab	0.01 a	0.01 e
	5.0	9.4 d	2.1 def	3.5 a	0.9 ab	0.6 bcd	1.1 abc	0.01 def	0.16 a	0.02 a	0.01 ef
<i>Lp777</i>	4.5	13.5 a	1.4 efg	3.7 a	0.9 ab	0.2 e	0.4 d	0.00 f	0.08 b	0.01 b	0.00 f

Names	pH	Acids concentrations (in g/L)				
		lactate	acetate	succinate	citrate	pyuvate
T	7.0	0.0 e	0.0 e	0.0 e	0.6 bc	0.0 b
<i>Ld865</i>	6.5	0.2 de	0.0 e	0.0 e	0.6 bc	0.0 b
	6.0	1.0 c	0.1 d	0.0 e	1.6 a	0.0 b
	5.0	2.5 b	0.1 d	0.0 de	1.6 a	0.0 b
	4.5	3.8 a	0.1 d	0.0 de	1.5 a	0.0 b
<i>Ld865 and</i>	6.5	0.1 e	0.0 e	0.0 e	0.3 c	0.0 b
	6.0	1.0 cd	0.1 d	0.0 de	1.5 a	0.0 b
	5.0	2.5 b	0.2 bc	0.1 bc	1.4 a	0.0 b
<i>Lp777</i>	4.5	4.1 a	0.2 ab	0.1 a	1.3 ab	0.0 b
	6.5	0.1 e	0.0 e	0.0 e	0.3 c	0.0 b
	6.0	0.9 cd	0.1 cd	0.0 e	1.5 a	0.0 b
	5.0	2.5 b	0.2 b	0.1 cd	1.3 ab	0.0 b
<i>Lp777</i>	4.5	4.1 a	0.3 a	0.1 ab	1.1 ab	0.0 a

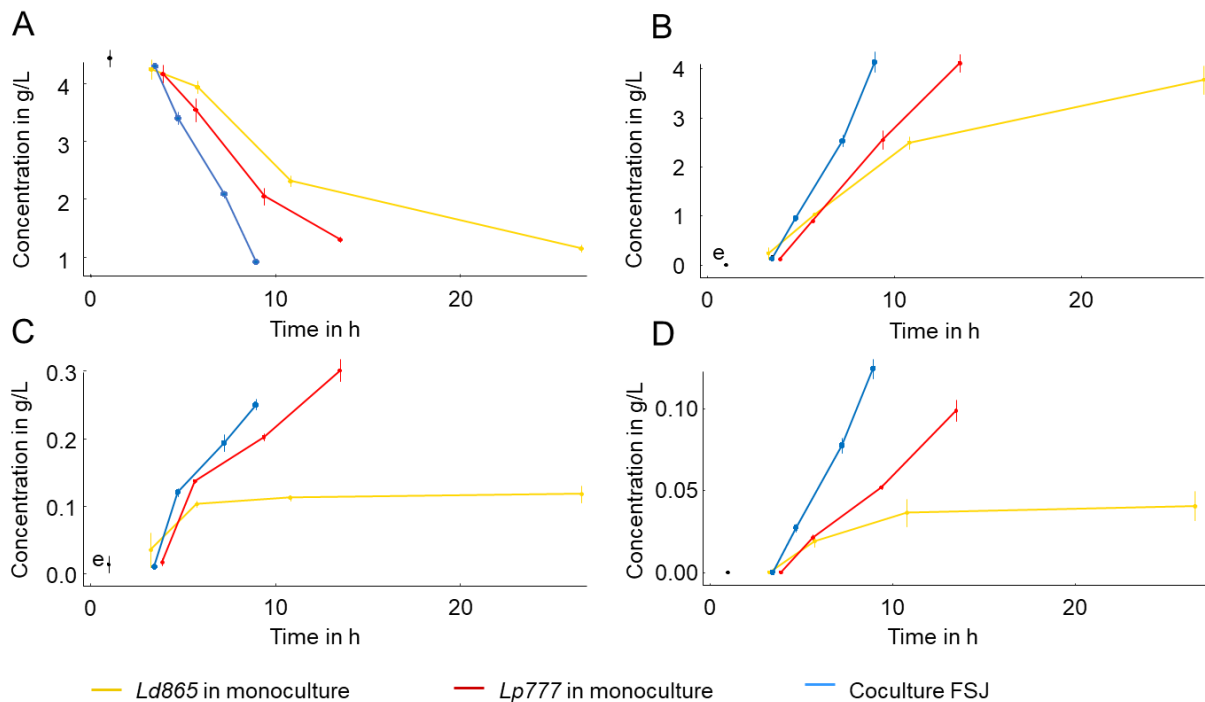


Figure 27. Sucrose consumption (A), lactic (B), acetic (C) and succinic acids (D) production of *Lp777* and *Ld865* in mono- and coculture through soy juice fermentation at 37°C.

○ **Coculture of *Ld865* and *Lp777* in SJ promotes cooperative interactions through AA exchanges**

The unfermented SJ contained 35 g/L of total AA and 0.3 g/L of free AA. The amounts of total AA did not vary throughout any fermentation when compared to the unfermented SJ. The amounts of free AA varied however along SJ fermentation (Table 16). At the end of fermentation, in the SJ fermented with the *Ld865* monoculture numerous free AA were released, and the concentration of all AA were higher than that in the unfermented SJ, except for beta-alanine, arginine, asparagine, tryptophan and cysteine. In the SJ fermented with the *Lp777* monoculture, most free AA of SJ were consumed at pH 4.5, except histidine, lysine, proline and glutamine, the concentrations of which increased. Note that for these AA, present at the highest levels at the end of fermentation, their concentration decreased (consumption) during the first stages of fermentation (up to pH 6.0 or pH 5.0 according to AA) to further increase at later points. At the end of the fermentation, in the SJ fermented with the *Ld865-Lp777* coculture, the concentration of all free AA decreased. There were a starvation of methionine since the first stage of fermentation (pH 6.5) and of tyrosine since the end of exponential phase (pH 5.0).

Table 16. Amino acids and nitrogenous compounds concentrations (in mg/L) in soy juice fermentations of *Ld865* and *Lp777* in monoculture and coculture. Fermentations were conducted at 37°C and inoculated at 1% v/v . The color gradient is used by metabolites to highlight differences between products. The products are classified according to their pH. Letters after the concentrations indicate statistical differences from a Tukey test with an alpha error of 0.05. GABA: Gamma Amino Butyric Acid

Names	pH	Histidine	Lysine	Proline	Ammoniac	Valine	GABA	Ethanol-amine	Beta-alanine	Glutamine	Ornithine	Citruline	Phenyl-alanine	Leucine	Tyrosine
SJ	7.0	5.5 de	8.8 fg	3.0 ef	19.7 e	46.0 b	3.0 bcd	6.0 ab	4.9 a	0.0 e	0.8 f	1.4 e	10.4 c	9.2 c	4.2 c
	6.5	3.5 ef	5.5 gh	3.9 def	10.5 f	17.9 d	2.3 d	3.5 c	2.4 c	0.2 e	4.3 ef	5.0 d	5.5 d	5.7 d	2.4 d
	6.0	3.5 ef	4.6 h	8.9 b	11.9 f	16.9 d	2.2 d	2.8 c	2.0 c	0.2 e	14.6 d	10.1 c	5.3 d	4.1 de	2.0 d
	5.0	9.6 b	17.5 bc	9.4 b	32.3 bc	44.5 b	4.5 a	5.0 b	2.7 bc	2.0 bc	75.1 b	20.7 ab	15.7 b	15.3 b	5.9 b
<i>Ld865</i>	4.5	15.6 a	39.3 a	15.7 a	41.7 a	62.2 a	3.2 abcd	6.4 a	4.6 a	0.4 e	94.5 a	18.0 b	25.2 a	31.5 a	12.8 a
	6.5	3.0 f	5.2 gh	4.0 def	10.7 f	16.7 d	2.4 cd	3.1 c	2.0 c	0.2 e	2.4 ef	2.9 de	4.5 d	3.5 def	2.2 d
	6.0	2.8 f	3.9 h	2.1 f	11.3 f	15.9 d	2.2 d	3.3 c	2.3 c	0.1 e	6.5 e	5.3 d	4.2 de	1.0 fg	1.3 de
	5.0	6.8 cd	9.8 ef	6.4 bcde	26.2 cd	31.8 c	3.8 abc	5.2 b	3.2 abc	1.5 cd	39.9 c	23.4 a	5.3 d	3.0 def	0.0 e
<i>Ld865</i> and <i>Lp777</i>	4.5	8.9 bc	13.9 cd	8.0 bc	33.1 b	34.3 c	2.9 bcd	6.1 ab	4.5 ab	2.3 bc	71.0 b	18.9 b	1.7 f	0.0 g	0.0 e
	6.5	3.3 ef	6.0 fgh	4.4 cdef	10.7 f	17.5 d	2.4 d	3.3 c	2.1 c	0.3 e	0.7 f	0.2 e	5.0 d	3.8 def	2.2 d
	6.0	2.9 f	4.9 gh	2.9 ef	9.8 f	15.1 d	2.5 cd	3.0 c	2.4 c	0.6 de	0.2 f	0.8 e	1.6 f	0.9 fg	1.2 de
	5.0	6.9 cd	13.1 de	7.1 bcd	20.0 de	33.3 c	4.2 ab	5.5 ab	3.3 abc	2.9 b	1.4 f	1.2 e	2.0 ef	1.1 efg	0.0 e
<i>Lp777</i>	4.5	8.8 bc	18.6 b	9.1 b	21.1 de	35.5 c	3.4 abcd	6.5 a	4.9 a	4.8 a	0.7 f	1.6 e	1.0 f	0.0 g	0.0 e

Names	pH	Isoleucine	Aspartic acid	Methionine	Alanine	Glutamic acid	Glycine	Serine	Threonine	Tryptophane	Asparagine	Cysteine	Arginine	Total
SJ	7.0	6.1 b	33.4 b	3.5 b	14.6 c	47.9 c	3.8 c	4.0 cd	2.9 c	27.7 a	14.7 a	28.7 a	116 a	307 c
	6.5	2.9 c	18.8 c	0.0 d	6.6 def	25.7 de	2.8 cde	2.9 cde	1.7 cd	12.3 e	4.6 cdef	2.0 c	55.7 cd	209 de
	6.0	2.1 cde	17.4 cd	0.0 d	6.5 def	22.3 def	2.9 cd	2.6 de	1.0 cd	13.6 de	0.8 g	2.6 c	37.0 f	198 de
	5.0	7.0 b	32.2 b	2.0 c	20.9 b	61.8 b	8.2 b	10.1 b	6.8 b	21.2 abc	3.6 efg	0.6 c	1.0 g	425 b
<i>Ld865</i>	4.5	19.0 a	51.7 a	8.9 a	37.7 a	136 a	17.8 a	23.4 a	22.0 a	25.7 ab	10.4 b	27.6 ab	0.0 g	736 a
	6.5	2.4 cd	16.6 cde	0.0 d	6.6 def	24.1 de	2.3 cde	2.3 ef	1.7 cd	12.3 e	6.1 cde	0.7 c	57.6 cd	196 e
	6.0	0.9 def	13.4 e	0.0 d	5.3 def	20.1 ef	1.6 def	2.0 ef	0.6 d	13.0 de	3.7 defg	1.2 c	49.0 de	173 e
	5.0	0.0 f	13.6 e	0.0 d	8.5 d	31.3 d	1.6 def	4.3 c	0.6 cd	21.3 abc	1.2 g	0.3 c	38.9 ef	243 d
<i>Ld865</i> and <i>Lp777</i>	4.5	0.3 f	15.0 de	0.0 d	7.6 def	45.4 c	1.9 def	2.3 ef	1.0 cd	19.3 bcd	2.4 fg	25.2 b	5.0 g	318 c
	6.5	2.6 c	16.4 cde	0.0 d	8.1 de	24.8 de	2.0 def	2.1 ef	1.9 cd	15.7 cde	7.1 c	0.7 c	68.3 b	212 de
	6.0	0.6 ef	9.3 f	0.0 d	6.7 def	18.7 ef	0.5 f	1.4 ef	1.1 cd	13.6 de	6.6 cd	0.7 c	63.8 bc	172 e
	5.0	0.0 f	5.9 g	0.0 d	4.8 ef	22.9 def	1.1 ef	3.0 cde	0.8 cd	11.1 e	6.1 cde	0.8 c	109 a	344 c
<i>Lp777</i>	4.5	1.0 def	6.9 fg	0.2 d	4.6 f	13.4 f	1.1 ef	0.9 f	0.2 d	3.1 f	4.4 cdef	25.1 b	113 a	168 e

Finally among free AA, methionine and cysteine presented interesting kinetics. Methionine was rapidly and totally consumed in SJ fermented with the *Lp777* monoculture and with the *Ld865-Lp777* coculture, while in the SJ fermented with *Ld865* in monoculture, methionine is released, and reached concentrations of 8.9 mg/L at pH 4.5. Cysteine was the only AA for which the concentration evolved similarly in *Lp777* and *Ld865* monocultures and coculture, with a sharp reduction at the beginning of fermentations, followed by an increase at the end of fermentation, to reach the initial concentration at pH4.5. Altogether, this analysis showed that *Ld865* and *Lp777* produced and/or released AA in SJ medium in monoculture that were consumed by their counterparts when they were cocultivated in SJ

- **Coculture of *Ld865* and *Lp777* induces a transcriptional reprogramming of bacterial gene expression**

To dissect the coculture-induced phenotypes at the molecular level, we performed transcriptional expression profiling of *Ld865* and *Lp777* cultivated in SJ medium in monocultures and in coculture at various pH points (Figure 26). Fifty-three samples from monocultures and coculture kinetics were subjected to RNA sequencing. 5 to 14 million reads were sequenced per sample. Globally, 1/5th of sequenced RNA reads mapped on our reference genomes, i.e. *Ld865* and *Lp777*. 97% of the reads that did not mapped on reference genomes mapped on soy genome. The total counts of RNA reads that mapped on reference genomes were equivalent between samples at same pH. Overall, an average of 591 reads mapped per genes.

For each strain, the expression of its genes was then compared in coculture versus in monoculture at the same pH value. Considering all sampling time taken together, 27% of *Lp777* genes (n=856) and 53% of *Ld865* genes (n=1035) were significantly differentially expressed (DE) in coculture compared to monocultures. Among all the DE genes, 46% of *Ld865* genes were upregulated while only 35% of *Lp777* DE genes were found to be up-regulated in coculture when compared to monoculture.

The number of DE genes between coculture and monoculture varied during the acidification kinetic and this in a different way depending on strain and time. The number of *Lp777* DE genes increased with the decrease of pH (25 DE genes at pH6.5, 117 DE genes at pH 6.0 and 785 DE genes at pH 5.0). The number of *Ld865* DE genes also increased during the first stages of acidification (from 257 DE genes at pH6.5 to 869 DE genes at pH 6.0) but decreased at the end of fermentation (588 DE genes at pH 5.0). The greatest impact of coculture on gene expression levels did not occur at the same stage of acidification for the two strains.

Every functional category (COG) was affected by coculture (Figure 28). For the strain *Ld865*, genes coding for proteins belonging to COG L (replication, recombination, repair) and R (general function) were the most affected (15% and 13% of DE genes, respectively), followed

by COG E (amino acid transport and metabolism; 9%) and M (cell wall/membrane/envelope biogenesis, 6%). For the strain *Lp777*, genes coding for proteins belonging to COG J (translation, ribosomal structure and biogenesis) and R (general function) were the most affected (17% and 13% of DE genes, respectively), followed by COG E (amino acid transport and metabolism; 8%) and G (carbohydrate transport and metabolism, 6%) (Figure 28).

Altogether these results showed that coculture differently influenced the metabolism of two strains, with *Ld865* being the most affected. To go further, a more in-depth analysis of DE genes was performed, particularly with regard to the previously described phenotypic changes induced by coculture.

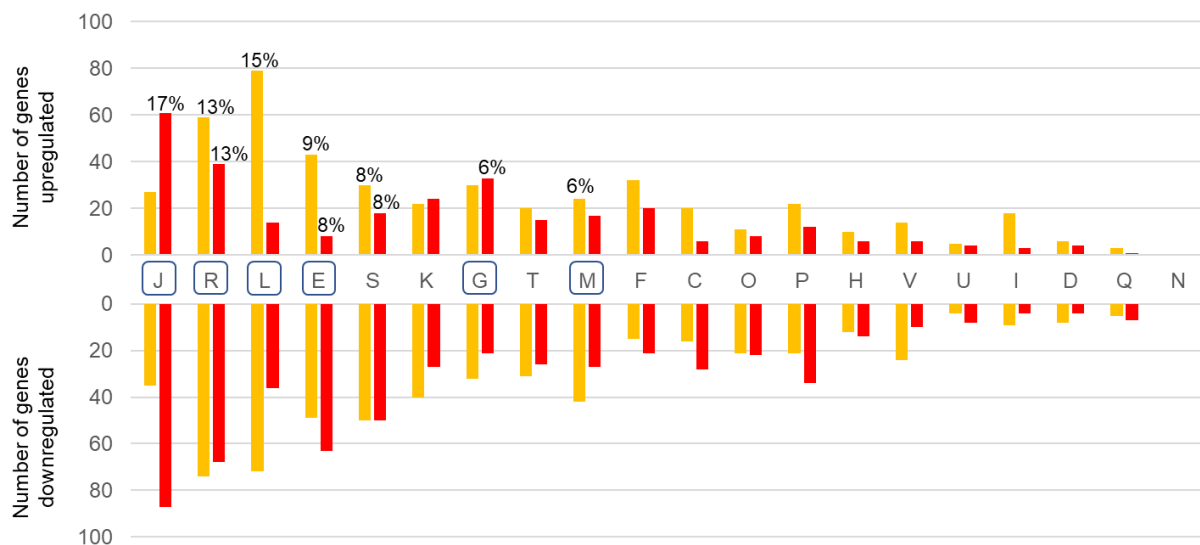


Figure 28. Distribution of *Lp777* genes (red) and *Ld865* genes (yellow) up and downregulated in coculture compared to monoculture in soy juice fermentation. The percentages indicated represent the proportion of DE genes in the top five category with most DE genes by culture, expressed as % of total DE genes. The letter codes for clusters of orthologous groups (COG) as follows: J, translation, ribosomal structure, and biogenesis; R, general function prediction only; L, DNA replication, recombination, and repair; E, amino acid transport and metabolism; S, function unknown; K, transcription; G, carbohydrate transport and metabolism; T, signal transduction mechanisms; M, cell envelope biogenesis, outer membrane; F, nucleotide transport and metabolism; C, energy production and conversion; O, post-translational modification, protein turnover, and chaperones; P, inorganic ion transport and metabolism; H, coenzyme metabolism; V, defense mechanisms; U, intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport; I, lipid metabolism; D, cell division and chromosome partitioning; Q, secondary metabolite biosynthesis, transport, and catabolism; N, cell motility and secretion.

- **Coculture impacts the expression of *Ld865* stress response and cell cycle genes**

As mentioned previously, the strain *Ld865* does not behave the same when cocultured with *Lp777*, or in monoculture. In coculture many biochemical and physiological changes are induced, i.e. *Ld865* cell size and shape (Figure 30). We thus investigated DE genes coding for proteins related to cell wall biosynthesis and cell shape maintenance. During the exponential growth phase, at pH 6.0, the expression of fifteen *Ld865* genes coding for proteins involved in cell division (*sepF*, *divMB*, *ftsY*, *WZAIL*) and peptidoglycan biosynthesis (*ponA*, *murGD*, *mraY*

and *pbpBF*) was upregulated with a 1.4-4.4 fold change (Table 17). Genes implicated in the teichoic acids biosynthesis were also upregulated (*mnaA*, *tagO*).

Coculture also induced *Ld865* purine and pyrimidine metabolisms (aminoimidazole ribonucleotide biosynthesis) at pH 6.0 and 5.0 with a 3.0-159.9 fold induction, when chromosome replication occurred in the exponential growth phase. On the contrary, genes of *Lp777* involved in replication was poorly affected by coculture.

We thus investigated DE genes coding for stress response and proteins related to cell shape maintenance (cell cycle). Most DE genes implicated in stress response (*lexA*, *cfa*, *clpCEPQRY*, *htrA* and *htpX*) in both *Ld865* (6/7) and *Lp777* (5/7) were downregulated at every pH in coculture when compared to monoculture.

These results were in agreement with *Ld865* cell size reduction and population increase in coculture compared to monoculture.

- **Coculture induces carbohydrates catabolism downregulation in *Ld865* and upregulation in *Lp777***

First, *Ld865* and *Lp777* present different capacities for carbohydrates degradation. Both strains could use sucrose, glucose and fructose. However only *Lp777* can use raffinose, stachyose and galactose. Indeed, *Ld865* did not possess *agaSR* genes coding for stachyose, raffinose or melibiose degradation (α -galactosidase) nor genes *gaKT* coding for galactose degradation (Leloir pathway). These results were in accordance with API® galleries results (Annexe E).

In coculture, at exponential phase, *Ld865* downregulated genes coding for the use of sucrose, glucose, fructose. At the end of exponential phase (pH 5.0), *Ld865* genes coding for carbohydrates transporters (*malEFG*, *fruA*, *scrA*, *msmX*, *bgIP*), sucrose (*scrBR*, *mdxL*), glucose (*glcK*, *gtaB*, *mdxM* and *bgIH*) and fructose degradation (*scrK*, *fruK*) were downregulated (Table 17).

On the contrary, *Lp777* upregulated most genes implicated in carbohydrates catabolism including genes coding for α -galactosidase (*agaR*, *ganA* with a fold-change up to 77) and β -galactosidases (*lacML*), galactose degradation (*gaIT*, *ganR*), carbohydrate transporters, including a cellobiose transporter, and *Lp777* glycogen metabolism was also completely upregulated (*glgABCDP*) (Table 17).

Table 17. Selection of genes differentially expressed with an adjusted pvalue < 0.05 in cocultured compared to monocultured FSJ at pH 6.5, 6.0 and 5.0 that are discussed in the study. Each line may correspond to different genes between *Ld865* and *Lp777* DE genes. Genes are classified by pathway and are noted with their names, locus tags, products and fold changes in coculture compared to monoculture at pH 6.5, 6.0 and 5.0. Red color is used to highlight fold repression (<1) and green color is used to highlight fold induction (>1) in coculture compared to monoculture.

path	<i>Ld865</i> DE genes						<i>Lp777</i> DE genes							
	gene	locus tag <i>Ld865</i>	product	pH 6.5	pH 6.0	pH 5.0	gene	locus tag <i>Lp777</i>	product	pH 6.5	pH 6.0	pH 5.0		
cell cycle genes	<i>ftsA</i>	LBDEL865_v1_1291	cell division proteins	2.0	3.3		<i>ftsA</i>	LBPLA777_v1_1944	cell division proteins			0.60		
	<i>ftsI</i>	LBDEL865_v1_1296		1.9	3.5	3.2	<i>ftsI</i>	LBPLA777_v1_1342						
	<i>ftsL</i>	LBDEL865_v1_1297		2.1	2.4	4.4	<i>ftsH</i>	LBPLA777_v1_0469				1.3		
	<i>ftsW</i>	LBDEL865_v1_1269			2.2		<i>ftsW</i>	LBPLA777_v1_1904				0.49		
	<i>ftsY</i>	LBDEL865_v1_0773			1.4		<i>ftsY</i>	LBPLA777_v1_1402						
	<i>ftsZ</i>	LBDEL865_v1_1290			1.8		<i>ftsZ</i>	LBPLA777_v1_1943				0.51		
	<i>divIB</i>	LBDEL865_v1_1292		1.9	3.2	3.0	<i>divIB</i>	LBPLA777_v1_1945						
	<i>sepF</i>	LBDEL865_v1_1289			1.5		<i>sepF</i>	LBPLA777_v1_1942				0.48		
		LBDEL865_v1_0136	transpeptidase	0.33	0.29	0.28	<i>yciB</i>	LBPLA777_v1_2687	transpeptidase			0.67		
		<i>murAB</i>	LBDEL865_v1_1647			0.53								
		<i>murB</i>	LBDEL865_v1_1382	peptidoglycan biosynthesis		1.5								
		<i>murE</i>	LBDEL865_v1_0167			0.72								
		<i>murF</i>	LBDEL865_v1_1645			0.74	0.33	<i>murC</i>	LBPLA777_v1_1247	peptidoglycan biosynthesis from ala			1.3	
		<i>ddl</i>	LBDEL865_v1_1794	ala ligase	0.46	0.41	0.29	<i>ddl</i>	LBPLA777_v1_2088	ala ligase			1.3	
		<i>murG</i>	LBDEL865_v1_1293	peptidoglycan glycosyltransferase	2.2	4.4			LBPLA777_v1_0847	ser, ala			1.5	
		<i>murD</i>	LBDEL865_v1_1294				4.3		LBPLA777_v1_2787	carboxypeptidase			1.4	
		<i>mraY</i>	LBDEL865_v1_1295				3.6							
		<i>pbpF</i>	LBDEL865_v1_0592				1.7							
		<i>ponA</i>	LBDEL865_v1_1079		carboxypeptidase		3.0	3.5						
		<i>pbpB</i>	LBDEL865_v1_1296			1.9	3.5	3.2						
			LBDEL865_v1_0582					2.2						
		<i>mnaA</i>	LBDEL865_v1_1471	teichoic acids biosynthesis	2.3	3.9	5.2		LBPLA777_v1_1118	teichoic acids biosynthesis			0.66	
		<i>tagO</i>	LBDEL865_v1_1417		2.0	2.2								
		LBDEL865_v1_1562			1.5									
	<i>tagD</i>	LBDEL865_v1_0285				1.9								

path	<i>Ld865</i> DE genes						<i>Lp777</i> DE genes							
	gene	locus tag <i>Ld865</i>	product	pH 6.5	pH 6.0	pH 5.0	gene	locus tag <i>Lp777</i>	product	pH 6.5	pH 6.0	pH 5.0		
carbohydrates transporters	EIIBC	LBDEL865_v1_0148	PTS β -glucoside	0.22	0.21	0.06	EIIBC	LBPLA777_v1_2076	PTS β -glucoside		3.0			
		LBDEL865_v1_0363			0.58			LBPLA777_v1_2073			3.3			
	IIA	LBDEL865_v1_0266						IIA		LBPLA777_v1_3118				3.1
		LBDEL865_v1_1773				0.42		celC		LBPLA777_v1_0777				0.21
	manX	LBDEL865_v1_0374				0.76	manX	LBPLA777_v1_0503					0.64	
	bgIP	LBDEL865_v1_0254				0.29	0.05	manX		LBPLA777_v1_0504				0.73
	scrA	LBDEL865_v1_0406		sucrose permease			0.42							
	msmX	LBDEL865_v1_1781		ABC sugar			0.14	IIC		LBPLA777_v1_2075	fru permease		3.8	
	malE	LBDEL865_v1_1780					0.10			LBPLA777_v1_pe002	PTS cellobiose	2.9		
	malF	LBDEL865_v1_1779		Maltodextrin ABC			0.09	msmX		LBPLA777_v1_0153	ABC sugar	2.3		
	malG	LBDEL865_v1_1778					0.09	glcU		LBPLA777_v1_2210	glucose uptake protein			1.5
	fruA	LBDEL865_v1_0171		PTS fructose			0.44							
	carbohydrates degradation									glgA	LBPLA777_v1_pc0029		2.9	
pgcA		LBDEL865_v1_0397	p-glucomutase			1.8	glgB	LBPLA777_v1_pc0029	glycogen metabolism	2.4				
melR		LBDEL865_v1_0934	oligosaccharide degradation		2.4	3.3	glgC	LBPLA777_v1_pc0029				2.3		
melR		LBDEL865_v1_0935			2.4		glgD	LBPLA777_v1_pc0029			2.9			
glgP		LBDEL865_v1_0392	glycogen metabolism		9.0		glgP	LBPLA777_v1_pc0029		2.4				
bgIH		LBDEL865_v1_1692	beta-glucosidase	0.48	0.42		agaR	LBPLA777_v1_3049	α -galactosidase			8.1		
gtaB		LBDEL865_v1_1466	glucose degradation		0.66	0.55	agaR	LBPLA777_v1_pd0009				8.1		
mdxM		LBDEL865_v1_1782				0.14	ganA	LBPLA777_v1_3034		22.7	52.6	76.9		
glcK		LBDEL865_v1_1869	glucokinase	0.45	0.15	0.18	lacM	LBPLA777_v1_3048	β -galactosidase		2.2			
scrK		LBDEL865_v1_0054	fructokinase	0.44	0.53	0.45	lacM	LBPLA777_v1_pd0009				1.9	2.9	
fruK		LBDEL865_v1_0170				0.55	lacL	LBPLA777_v1_3047					3.1	
							lacL	LBPLA777_v1_pd0010				1.9		
scrB		LBDEL865_v1_0407	sucrose degradation		0.57	0.26			LBPLA777_v1_pd0010			7.4	11.8	
scrR		LBDEL865_v1_0408			0.59	0.19	malL	LBPLA777_v1_2072	α -glucosidase		2.8	2.8		
mdxL		LBDEL865_v1_1787			0.62	0.44	mdxL	LBPLA777_v1_0171					2.0	
galE	LBDEL865_v1_0382	galactose degradation		0.77			LBPLA777_v1_pd0010	galactose degradation			2.1			
						galT	LBPLA777_v1_3044			2.6	3.7			
						ganR	LBPLA777_v1_3035		2.2	2.5				

path	<i>Ld865</i> DE genes						<i>Lp777</i> DE genes					
	gene	locus tag <i>Ld865</i>	product	pH 6.5	pH 6.0	pH 5.0	gene	locus tag <i>Lp777</i>	product	pH 6.5	pH 6.0	pH 5.0
Glycolys and fermentation metabolism (Figure 6A)	pgi	LBDEL865_v1_1339	P-glucose isom				pgi	LBPLA777_v1_2209	P-glucose isom			
	pfkA	LBDEL865_v1_0405	6-P fructokinase		1.9	3.8	pfkA	LBPLA777_v1_1635	6-P fructokinase			
	fba	LBDEL865_v1_0590	fructose	1.8	1.5	0.49	fba	LBPLA777_v1_0288	fructose			1.3
		LBDEL865_v1_0086	bisphosphatase		0.64	0.21			bisphosphatase			
	tpiA	LBDEL865_v1_1390	tri-P isomerase	1.7	1.4	0.47	tpiA	LBPLA777_v1_0637	tri-P isomerase			1.2
	gapA	LBDEL865_v1_1392	glyceraldehyd-P	1.8	1.3	0.37	gapA	LBPLA777_v1_0635	glyceraldehyd-P			1.3
	gapN	LBDEL865_v1_0950	dehydrogenase		3.1	7.9			dehydrogenase			
	pgk	LBDEL865_v1_1391	P-gly kinase		1.4	0.48	pgk	LBPLA777_v1_0636	P-gly kinase			1.2
	gpmA	LBDEL865_v1_1744	Pglycerate mut			1.9	gpm	LBPLA777_v1_0182	Pglycerate mut			
	eno	LBDEL865_v1_0027	enolase		0.41		eno	LBPLA777_v1_0638	enolase			1.3
	ppsA	LBDEL865_v1_0578	PEP synthase				ppsA	LBPLA777_v1_1647	PEP synthase	6.1		
	ppc	LBDEL865_v1_1518	PEP carboxylase		1.9	3.3	pycA	LBPLA777_v1_1903	pyr carboxylase			0.66
	pyk	LBDEL865_v1_1204	pyruvate kinase		1.5		pyk	LBPLA777_v1_1634	pyruvate kinase			1.4
	ldh	LBDEL865_v1_1868	lactate dehydrogenase	0.56	0.46		dld	LBPLA777_v1_pc0033	lactate			1.5
	ldh	LBDEL865_v1_0202				6.9		LBPLA777_v1_1765	dehydrogenase			
	ldhA	LBDEL865_v1_0099			0.29	0.57	lctO					
	lctO	LBDEL865_v1_0180	lactate oxygenase		0.39	0.06		LBPLA777_v1_3142	lactate oxygenase			
		LBDEL865_v1_0019			0.52		pdhD	LBPLA777_v1_1911	pyr dehydro		2.19	
		LBDEL865_v1_0313	malate			1.91	pf1B	LBPLA777_v1_2891	pyr formate lyase	2.87		
		LBDEL865_v1_0440	dehydrogenase	1.99	2.26	2.86			malate			
	LBDEL865_v1_1961				10.2		LBPLA777_v1_1655	dehydrogenase			0.23	
fumC	LBDEL865_v1_0115	fumarate hydrat		3.60			LBPLA777_v1_pa004	fumarate			0.25	
	LBDEL865_v1_1240	fumarate reduc		4.66			LBPLA777_v1_0799	reductase			0.50	

path	<i>Ld865</i> DE genes						<i>Lp777</i> DE genes					
	gene	locus tag <i>Ld865</i>	product	pH 6.5	pH 6.0	pH 5.0	gene	locus tag <i>Lp777</i>	product	pH 6.5	pH 6.0	pH 5.0
Pentose phosphate, ethanol and mevalonate pathway (Figure 6B)	zwf	LBDEL865_v1_0548	P-glucose dehy		1.7		zwf	LBPLA777_v1_2347	P-glucose dehy			
		LBDEL865_v1_1430	P-glu lactonase		1.7	0.41		LBPLA777_v1_1963	P-glu lactonase			
	gndA	LBDEL865_v1_1967	P-gluconate dehy	0.33	0.28	0.27	gndA	LBPLA777_v1_1318	P-gluconate dehy			
	xpkA	LBDEL865_v1_1485	P ketolase		0.60	0.39		LBPLA777_v1_2324	P ketolase			1.6
	pta	LBDEL865_v1_1385	P-transacetylase	0.50	0.55	0.25	pta	LBPLA777_v1_0331	P-transacetylase			0.66
		LBDEL865_v1_1134			0.05			LBPLA777_v1_0287				0.18
		LBDEL865_v1_1135	Alcohol dehydrogenase		0.36	0.22	adhE	LBPLA777_v1_3162	Alcohol dehydrogenase			0.17
		LBDEL865_v1_0460			3.2	4.6		LBPLA777_v1_pd000				
	thIA	LBDEL865_v1_1163	acetyltransferase	0.56	0.45	0.30						
	mvaS	LBDEL865_v1_1161	mevalonate synthase	0.56	0.58	0.37		LBPLA777_v1_0385	mevalonate synthase			0.75
		LBDEL865_v1_1162						LBPLA777_v1_pd003				0.70
		LBDEL865_v1_1092	mevalonate degradation		1.9			LBPLA777_v1_1492	mevalonate degradation			1.4
							fni	LBPLA777_v1_1491				2.0
proteins, peptides degradation								LBPLA777_v1_1055	glu peptidase			0.34
	map	LBDEL865_v1_1468	met peptidase		2.2			LBPLA777_v1_0220	met peptidase			1.4
		LBDEL865_v1_0149	dipeptidase	0.30	0.18	0.23		LBPLA777_v1_1473				0.47
								LBPLA777_v1_0204	asp dipeptidase			0.52
							pip	LBPLA777_v1_0076	pro peptidase			1.3
		LBDEL865_v1_0311	pro peptidase			2.1		LBPLA777_v1_2558		0.36		0.27
	pepN	LBDEL865_v1_0126	peptidase cys/gly	0.44	0.26	0.23	pepN	LBPLA777_v1_0788	cys/gly peptidase			0.56
		LBDEL865_v1_1080	acyl peptidase		2.0	4.7		LBPLA777_v1_1969				0.82
		LBDEL865_v1_0582			2.2			LBPLA777_v1_0618				0.30
	pepV	LBDEL865_v1_0419	ala peptidase		0.55			LBPLA777_v1_1088	ala peptidase			2.0
								LBPLA777_v1_2787				1.4
								LBPLA777_v1_0847				1.5
	pepX	LBDEL865_v1_0697		2.9	9.0	8.6		LBPLA777_v1_0260				0.54
	pepB	LBDEL865_v1_0181		0.49	0.23	0.19	ctpA	LBPLA777_v1_0572	protease			1.6
		LBDEL865_v1_0900			2.1	5.7	ctpA	LBPLA777_v1_1605				0.78
	pepG	LBDEL865_v1_1720			0.65		pepG	LBPLA777_v1_pd002				0.55
		LBDEL865_v1_0941	peptidase		1.8			LBPLA777_v1_3171				0.50
	pepC	LBDEL865_v1_0446		1.8	2.5	3.4		LBPLA777_v1_3173	peptidase			0.62
		LBDEL865_v1_1423			1.5			LBPLA777_v1_1519				0.59
		LBDEL865_v1_0919				2.0	ytjP	LBPLA777_v1_2300				0.51
pepO	LBDEL865_v1_1755		0.47	0.30	0.21	pepF	LBPLA777_v1_1128				0.65	
	LBDEL865_v1_0300	metal-peptidase		0.47	0.23		LBPLA777_v1_2200	metal-peptidase			0.54	

path	Ld865 DE genes						Lp777 DE genes						
	gene	locus tag <i>Ld865</i>	product	pH 6.5	pH 6.0	pH 5.0	gene	locus tag <i>Lp777</i>	product	pH 6.5	pH 6.0	pH 5.0	
Amino acids transport	tcyB	LBDEL865_v1_1686	cystine ABC t		1.5	9.8	tcyC	LBPLA777_v1_2807	cystine ABC t			1.44	
	tcyC	LBDEL865_v1_1687			1.4	5.6							
	metN	LBDEL865_v1_0102	met ABC t		0.38		metN	LBPLA777_v1_0301				0.23	
		LBDEL865_v1_1730	ala t		0.35		metI	LBPLA777_v1_0302				0.26	
	appf	LBDEL865_v1_0765	peptide ABC t			4.1	metN	LBPLA777_v1_1501	met ABC t		0.25	0.16	
	oppF	LBDEL865_v1_1722			0.76			LBPLA777_v1_2092				0.49	
		LBDEL865_v1_0433					11.6	LBPLA777_v1_2093				0.42	
		LBDEL865_v1_0467			2.3	3.0							
		LBDEL865_v1_0770				1.7							
		LBDEL865_v1_1569				0.58	2.1						
		LBDEL865_v1_1726				0.54	2.3						
		LBDEL865_v1_1766				0.23			LBPLA777_v1_0630			1.8	2.9
		LBDEL865_v1_0141					0.01		LBPLA777_v1_0177				0.37
		LBDEL865_v1_0470			0.42				LBPLA777_v1_0018	peptide ABC t			0.67
	oppB	LBDEL865_v1_0766			1.7	6.0		LBPLA777_v1_1076				1.3	
	oppB	LBDEL865_v1_1725			0.61			LBPLA777_v1_3182				0.52	
	oppA	LBDEL865_v1_1249				4.8		LBPLA777_v1_pe004				0.39	
		LBDEL865_v1_0304			2.0			LBPLA777_v1_2808	aa ABC t			0.22	
		LBDEL865_v1_1688	aa ABC t			5.7							
		LBDEL865_v1_1813			2.9	2.5							
		LBDEL865_v1_1473	aa permease	2.2	2.5								
	brnQ	LBDEL865_v1_1529			0.67	0.16							
		LBDEL865_v1_0722	branched chain		1.8	7.4							
		LBDEL865_v1_0724	aa (leu, ile, val)		4.4								
	livG	LBDEL865_v1_0725	ABC t		2.5								
	livF	LBDEL865_v1_0726			2.6								
	yehX	LBDEL865_v1_0948	glycine betaine, carnitine, choline ABC t		7.1	18.1		LBPLA777_v1_2900	proline, glycine betaine, carnitine, choline t			0.47	
	opuCA	LBDEL865_v1_0502			1.5			LBPLA777_v1_0331				0.66	
	opuCB	LBDEL865_v1_0503			1.6	2.7							
	opuCC	LBDEL865_v1_0504		1.6	3.0								
	proX	LBDEL865_v1_0949	pro, gly ABC t	1.9	7.8	10.3							
	artQ	LBDEL865_v1_0302	arginine ABC t		2.7								
artR	LBDEL865_v1_1814			2.2									

path	Ld865 DE genes						Lp777 DE genes					
	gene	locus tag <i>Ld865</i>	product	pH 6.5	pH 6.0	pH 5.0	gene	locus tag <i>Lp777</i>	product	pH 6.5	pH 6.0	pH 5.0
Amino acids transport	glnH	LBDEL865_v1_0786	gln ABC t		0.56							
		LBDEL865_v1_1497				3.2	3.1					
	glnP	LBDEL865_v1_1498		1.9	4.7	5.4						
	glnM	LBDEL865_v1_1499			4.2	5.2						
	glnH	LBDEL865_v1_1500		1.8	4.1	8.4						
	glnQ	LBDEL865_v1_1501			4.6	6.9						
	glnQ	LBDEL865_v1_1959			0.74	0.29						
Amino acid metabolism	arcA	LBDEL865_v1_0349	arginine, citruline degradation		0.32				arginino-succinate synthase			
	argF	LBDEL865_v1_0347			0.37							
	yqeA	LBDEL865_v1_0348			0.39			argG	LBPLA777_v1_0624		0.49	
	argH	LBDEL865_v1_1176	arg biosynthesis		34.9		argH	LBPLA777_v1_0625	arg biosynthesis		0.54	
	gltX	LBDEL865_v1_0471	gln biosynthesis		0.69	0.48						
	gatB	LBDEL865_v1_1547				0.34						
	gatA	LBDEL865_v1_1548				0.39						
	gatC	LBDEL865_v1_1549			0.65	0.43						
	glnA	LBDEL865_v1_0682				0.26						
	purQ	LBDEL865_v1_0715	aminoimidazole ribonucleotide biosynthesis		11.8	159.9						
	purL	LBDEL865_v1_0716			10.5	63.1						
	purF	LBDEL865_v1_0717			8.6	69.8	purF	LBPLA777_v1_2378	ribonucleotide biosynthesis			0.28
	purM	LBDEL865_v1_0718				27.1	purL	LBPLA777_v1_2379			2.1	0.30
	purN	LBDEL865_v1_0719				76.2	purQ	LBPLA777_v1_2380				0.21
purD	LBDEL865_v1_0721			3.0	52.2							

path	Ld865 DE genes						Lp777 DE genes					
	gene	locus tag <i>Ld865</i>	product	pH 6.5	pH 6.0	pH 5.0	gene	locus tag <i>Lp777</i>	product	pH 6.5	pH 6.0	pH 5.0
Amino acid metabolism		LBDEL865_v1_0335	GMP synthase		0.54		pyrAB	LBPLA777_v1_2361			3.1	
	glmS	LBDEL865_v1_1519	glucosamine		0.60	0.31	pyrAA	LBPLA777_v1_2362			2.9	
	glmU	LBDEL865_v1_1654	biosynthesis		0.69		pyrAB	LBPLA777_v1_0450	arg and pyrimidine metabolism		0.28	
	pyrAA	LBDEL865_v1_1005	arg and	8.0	29.3		pyrAA	LBPLA777_v1_0451			0.19	
	pyrAB	LBDEL865_v1_1006	pyrimidine	11.7	22.4		pyrAA	LBPLA777_v1_1537				0.66
		LBDEL865_v1_1068	metabolism		2.0		pyrAB	LBPLA777_v1_1538				0.72
		LBDEL865_v1_1131				4.69	asnB	LBPLA777_v1_2688	asn synthase		0.52	0.46
		LBDEL865_v1_1763	asparagine synthase	0.58	0.50	0.32	gadB	LBPLA777_v1_2985	glu degradation		0.42	0.31
	asnA	LBDEL865_v1_0937			3.1		alrA	LBPLA777_v1_0443	ala biosynthesis			
	purK	LBDEL865_v1_0709			4.1	10.5	purK	LBPLA777_v1_2383				0.18
	purE	LBDEL865_v1_0708	inosine-P pathway		2.9	10.4	purE	LBPLA777_v1_2384	inosine-P pathway			0.17
	purC	LBDEL865_v1_0713			6.0	113.8	purC	LBPLA777_v1_2382				0.16
	purH	LBDEL865_v1_0720			6.7	93.2	aspB	LBPLA777_v1_1497	asp degradation			0.70
	alr	LBDEL865_v1_1642	ala biosynthesis		0.68	0.52	ilvE	LBPLA777_v1_2125	BCAA transaminase			0.41
	ilvE	LBDEL865_v1_0835	3CAA transaminase			8.5						
		LBDEL865_v1_0411	threonine biosynthesis			3.0		LBPLA777_v1_1414				0.43
	thrB	LBDEL865_v1_0412		0.50	0.38		aroK	LBPLA777_v1_1741	chorismate biosynthesis			0.20
	odcI	LBDEL865_v1_1474	decarboxylase		1.7		aroF	LBPLA777_v1_1745				0.08
		LBDEL865_v1_1041	thr dehydrogenase			0.23	tyrA	LBPLA777_v1_1742	tyrosine biosynthesis			0.23
		LBDEL865_v1_0108		0.36		0.27		LBPLA777_v1_2803				0.46
	ptkA	LBDEL865_v1_0211			1.5			LBPLA777_v1_1631	tyr recombinase			0.55
		LBDEL865_v1_0212	tyrosine phosphatase		1.5		glyA	LBPLA777_v1_2114	glycine synthase			0.65
		LBDEL865_v1_0153			0.44			LBPLA777_v1_1744				0.07
		LBDEL865_v1_1360		0.42	0.25	0.33		LBPLA777_v1_1417	tryptophan biosynthesis			0.50
	proJ	LBDEL865_v1_1208	pro biosynthesis		1.9		trpD	LBPLA777_v1_1419				0.19
	lysA	LBDEL865_v1_0873				8.2		LBPLA777_v1_2803	aromatic aa transferase			0.46
	dapF	LBDEL865_v1_0977			4.5	14.5	hisB	LBPLA777_v1_2256			0.25	
	dapH	LBDEL865_v1_0979	lysine biosynthesis		4.7		hisD	LBPLA777_v1_2257	histidine biosynthesis		0.33	
	dapI	LBDEL865_v1_0980			5.9		hisZ	LBPLA777_v1_2259			0.29	
	dapB	LBDEL865_v1_0982				2.6	hisK	LBPLA777_v1_2260				0.47

path	Ld865 DE genes						Lp777 DE genes					
	gene	locus tag <i>Ld865</i>	product	pH 6.5	pH 6.0	pH 5.0	gene	locus tag <i>Lp777</i>	product	pH 6.5	pH 6.0	pH 5.0
Cysteine and methionine metabolism (Figure 7a)	serC	LBDEL865_v1_1059	serine		0.51		serC	LBPLA777_v1_0180	serine			
	serA	LBDEL865_v1_1060	biosynthesis		0.46		serA	LBPLA777_v1_2447	biosynthesis			
								LBPLA777_v1_0217		2.7		13.7
	mccA		cysteine biosynthesis				mccA	LBPLA777_v1_0219	cysteine biosynthesis	2.9	2.4	10.3
	mccB	LBDEL865_v1_0727				4.1	mccB	LBPLA777_v1_0218				6.3
	yclM	LBDEL865_v1_0978	homoserine biosynthesis	4.2	3.6	23.9	yclM	LBPLA777_v1_2046	homoserine biosynthesis			
	asd	LBDEL865_v1_0796		0.56		4.3		LBPLA777_v1_0495				
		LBDEL865_v1_0794		0.38		5.0		LBPLA777_v1_2238				0.22
	cbIA	LBDEL865_v1_0942	cys g-lyase				patB	LBPLA777_v1_2533	cys β-lyase			0.68
	metE		methionine biosynthesis				metE	LBPLA777_v1_1171	methionine biosynthesis		0.24	0.08
	yxjG	LBDEL865_v1_1233						LBPLA777_v1_1599		0.35		0.04
	metI	LBDEL865_v1_0728	cys γ-synthase			3.9	metI	LBPLA777_v1_2309				0.64
	metAA	LBDEL865_v1_0951	homoser acetyl t					LBPLA777_v1_2239	cys γ-synthase			0.14
	metK	LBDEL865_v1_0573			1.4			LBPLA777_v1_2240				0.19
	mtnN	LBDEL865_v1_1282	S-adenosyl methionine cycle				mtnN	LBPLA777_v1_1934	S-adenosyl methionine cycle			0.55
luxS	LBDEL865_v1_0103					luxS	LBPLA777_v1_0623					
Glutathione and Thioredoxin metabolism (Figure 7b)	gshR	LBDEL865_v1_0134	Glutathione reductase	0.32	0.17	0.10	gshR	LBPLA777_v1_0333	Glutathione reductase			0.73
		LBDEL865_v1_0079		0.38	0.41	0.37	nrdH	LBPLA777_v1_0545				1.8
		LBDEL865_v1_0974			0.63	3.1	gpo	LBPLA777_v1_0197	gsh peroxidase			0.72
	msrA	LBDEL865_v1_1357	methionine sulfoxide reductase				msrA	LBPLA777_v1_1582	methionine sulfoxide reductase	3.8	3.3	
							msrA	LBPLA777_v1_1712				0.48
	msrB	LBDEL865_v1_0244		0.35	0.36		msrB	LBPLA777_v1_1583		3.6	3.0	
	msrC	LBDEL865_v1_1624		0.62			msrC	LBPLA777_v1_2064				0.59
	trxB	LBDEL865_v1_1406	trx reductase	0.53	0.24		trxB	LBPLA777_v1_0611	thioredoxine reductase			0.62
							LBPLA777_v1_pe004				0.42	
						ytpP	LBPLA777_v1_2308				0.72	

path	<i>Ld865</i> DE genes						<i>Lp777</i> DE genes					
	gene	locus tag <i>Ld865</i>	product	pH 6.5	pH 6.0	pH 5.0	gene	locus tag <i>Lp777</i>	product	pH 6.5	pH 6.0	pH 5.0
reduction oxidation potential regulation	spxA	LBDEL865_v1_1448	redox regulator	0.51	0.22	0.52	spxA	LBPLA777_v1_1663	redox regulator			0.56
		LBDEL865_v1_1796	Crp/Fnr regulator	0.42	0.43	0.17	spxA	LBPLA777_v1_1972				
		LBDEL865_v1_1908	Fe-S protein	0.50	0.34	0.33		LBPLA777_v1_1882	Fe-S protein		2.7	
		LBDEL865_v1_1759		0.47	0.44	0.27		LBPLA777_v1_2278	Fe-NADP reductase			0.82
	napA	LBDEL865_v1_1921	Na(+)/H(+) antiporter		0.40	0.31	napA	LBPLA777_v1_0363	Na(+)/H(+) antiporter		0.13	0.05
		LBDEL865_v1_0838	cation transporter		0.46		nhaC	LBPLA777_v1_2909				0.22
		LBDEL865_v1_1819				1.7	3.6	nhaC	LBPLA777_v1_0170			0.23
		LBDEL865_v1_1761	riboN reductase	0.54	0.54	0.49		LBPLA777_v1_2855	NAD(P)/FAD oxidoreductase		0.66	0.51
	nrdD							LBPLA777_v1_0273	NADH dehydrogenase			0.72
	npr	LBDEL865_v1_0509	NADH peroxidase	2.7	3.9	9.6		LBPLA777_v1_2445	deH-pantoate reductase		0.41	0.27
	ydgl	LBDEL865_v1_0127	NAD(P)H reductase	0.42	0.26	0.23		LBPLA777_v1_0303				0.24
		LBDEL865_v1_1944	Fe-S protein	0.38	0.29			LBPLA777_v1_0121	keto reductase			0.72
		LBDEL865_v1_1746	oxidoreductase		0.67		ykwC	LBPLA777_v1_2247				0.50
		LBDEL865_v1_0139			0.09	0.16	0.15		LBPLA777_v1_2290	oxidoreductase		
	ssdA	LBDEL865_v1_0334	Succinate dehydrogenase	0.49	0.25	0.20		LBPLA777_v1_0903	acid dehydrogenase			0.60
		LBDEL865_v1_1760	riboN reductase	0.46	0.47	0.32	urdA	LBPLA777_v1_1213	urocanate reductase		0.50	1.3
								LBPLA777_v1_0062	monoxygenase			1.7
	pox	LBDEL865_v1_1968	pyruvate oxidase	0.39	0.60	0.44	cydB	LBPLA777_v1_0944	ubiquinol oxidase			0.63
	pox	LBDEL865_v1_0580			0.40	0.61	0.35	pox	LBPLA777_v1_3145	pyruvate oxidase		3.8

path	Ld865 DE genes						Lp777 DE genes						
	gene	locus tag <i>Ld865</i>	product	pH 6.5	pH 6.0	pH 5.0	gene	locus tag <i>Lp777</i>	product	pH 6.5	pH 6.0	pH 5.0	
Vitamin metabolism		LBDEL865_v1_1194	riboflavin t		0.28	0.48		LBPLA777_v1_1626	riboflavin t			1.8	
		LBDEL865_v1_0088	biotin/riboflavin t		0.32			LBPLA777_v1_0695					
		LBDEL865_v1_0824			1.5	2.9		LBPLA777_v1_1739					
		LBDEL865_v1_1904	riboflavin metabolism		0.03	0.03	0.10		LBPLA777_v1_1221	riboflavin metabolism			
	ribE	LBDEL865_v1_1903			0.02	0.01	0.01	ribE	LBPLA777_v1_1222				
	ribBA	LBDEL865_v1_1902			0.07	0.01	0.02	ribBA	LBPLA777_v1_1223				
	ribH	LBDEL865_v1_1901			0.03	0.05	0.01	ribH	LBPLA777_v1_1224				
		LBDEL865_v1_1139				2.5	4.3						
		LBDEL865_v1_0783		0.34	0.26	0.31	birA	LBPLA777_v1_0698					
	accD	LBDEL865_v1_1142	biotin metabolism		3.0	2.3	accD	LBPLA777_v1_1444	biotin metabolism				
	accA	LBDEL865_v1_1141			4.6		accA	LBPLA777_v1_1445					
	accC	LBDEL865_v1_1143			1.9	3.4	accC	LBPLA777_v1_1443					
	fhs	LBDEL865_v1_1072				1.9	fhs	LBPLA777_v1_1532				0.38	
	folD	LBDEL865_v1_0736					folD	LBPLA777_v1_1369	folate metabolism			0.47	
	folC	LBDEL865_v1_1306	folate metabolism		1.9		folC	LBPLA777_v1_2057					
	LBDEL865_v1_0676					folN	LBPLA777_v1_1343					0.70	
	purN	LBDEL865_v1_0719			76.2								
Stress response	lexA	LBDEL865_v1_1847	repressor SOS	0.19	0.24		cfa	LBPLA777_v1_1460	cycloprop-P-lipid synthase			0.62	
	lexA	LBDEL865_v1_0788			0.33	0.20	0.25	clpP	LBPLA777_v1_0632				1.3
	clpC	LBDEL865_v1_0104	ATP-dependant protease	0.41	0.26	0.17	clpC	LBPLA777_v1_0853	ATP-dependant protease			0.67	
	clpE	LBDEL865_v1_1454		0.38	0.22	0.14	clpE	LBPLA777_v1_1079					0.68
			stress ser protease				clpY	LBPLA777_v1_1590					0.60
	htrA	LBDEL865_v1_1835	protease	0.43	0.43	0.37	clpQ	LBPLA777_v1_1591				0.62	
	htpX	LBDEL865_v1_0944	stress protease			2.6	5.0		LBPLA777_v1_0844	acetolactate synthase			1.7
	htpX	LBDEL865_v1_1821			0.51	0.37	0.36						

In coculture, *Ld865* genes coding glycolysis were mostly induced at the beginning (pH 6.5 and pH 6.0) but repressed at the end of exponential phase (pH 5.0) of SJ fermentation.

At the beginning of coculture fermentation (pH 6.5 and pH 6.0), *Ld865* pyruvate fermentation was deviated from lactate and acetate as corresponding genes (*ldh*, *pta* and *lctO*) were downregulated to menaquinone and succinate with corresponding genes that were upregulated (*ppc* and *fumC*) (Table 17). Pyruvate degradation genes from *Lp777* were also DE. Phosphoenol pyruvate synthase (*ppsA*) and pyruvate formate lyase (*pf1B*) genes were upregulated at pH 6.5 and pyruvate dehydrogenase gene (*pdhD*) was upregulated at pH 6.0 (Table 17).

At pH 5.0, conversely to *Ld865*, *Lp777* genes involved in glycolysis (*fba*, *tpiA*, *gapA*, *pgk* and *eno*) and genes encoding pyruvate conversion into lactate (*pyk* and *dld*) were upregulated while genes coding for pyruvate fermentation to menaquinone and succinate were downregulated in coculture (*pycA*, genes coding for malate dehydrogenase and fumarate reductase) (Table 17).

The upregulation of all DE genes implicated in fermentation pathways at the beginning of coculture were in agreement with the fact that *Lp777* COG G category presented most up-regulated genes (61%). This induction coincides with an acceleration of sucrose degradation in coculture in comparison to monoculture.

- **Coculture induces most AA metabolism upregulation in *Ld865* and downregulation in *Lp777***

Depending on whether *Lp777* and *Ld865* were used in coculture or in monoculture, their expression of genes coding for degradation functions, related to AA supply and AA synthesis are different (Table 17). This included proteases and peptidases, peptide, AA transporters and AA biosynthetic enzymes.

For *Ld865*, components of glutamine (*glnHPMQ*), glycine/betaine (*opuCACBCC*, *yehX*), cystine (*tcyBC*), arginine (*artQR*) and branched chain AA importers (*livGF*) were up regulated. Genes coding for enzymes involved in biosynthesis of lysine (*lysA*, *dapBFHI*), proline (*proJ*), arginine (*argH*), branched-chain amino acids (*ilvE*) and sulfur amino acids (*mccB*, *metIK*, *ycM*) were also upregulated.

For *Lp777*, peptidases encoding genes (*pepFGN*), as well as components of methionine importers (*metIN*) and enzymes involved in the biosynthesis of arginine (*argGH*), glutamate (*aspB*), glycine (*glyA*), histidine (*hisBDZK*) and aromatic (*aroKF*, *tyrA*, *trpD*) and branched-chain amino acids (*ilvE*) were downregulated.

In this overall view of the reorientation of the metabolism in coculture versus in monocultures, some exceptions existed and had to be point out. In the strain *Ld865*, the expression of genes coding for a component of methionine importers (*metN*), two out of the three genes coding for serine biosynthesis (*serAC*), all genes coding glutamine biosynthesis

(*gatABC*, *glnA*, *gltX*) and genes participating in arginine catabolism (*arcA*, *argF*, *yqeA*) were down-regulated (Table 17). In the strain *Lp777*, the expression genes coding for a component of a cystine ABC importer (*tcyC*) and enzymes involved in cysteine biosynthesis from serine (*mccA*) or cystathionine (*mccB*) were upregulated in coculture (Table 17) with a fold-change up to 1.4, 10.3 and 6.3 respectively.

Overall, AA metabolism was mostly upregulated in *Ld865* and downregulated in *Lp777*. Both strains *Lp777* and *Ld865* did however downregulated methionine metabolism and upregulated cysteine metabolism. Note that both methionine and cysteine are implicated in Eh modulation. By the way, *Ld865* does not possess *mccA* to convert serine in cysteine nor *gshAB* to convert glutamate, cysteine and glycine in glutathione while *Lp777* does.

○ **Coculture modulates the expression of Eh homeostasis genes**

Several genes participating potentially to the modulation of the oxidation reduction potential were affected by coculture. Most of these DE genes in *Ld865* (20/22) were down-regulated in coculture at all pHs. In *Lp777*, most of these DE genes (22/26) were downregulated only at pH 5.0. Down-regulated genes included various reductases (e.g. glutathione reductases, thioredoxin reductases, methionine sulfoxide reductases, NAD(P)H reductase), oxidoreductases, succinate dehydrogenase, Fe/S cluster-containing proteins, sodium-hydrogen antiporters and redox regulators (e.g. *spxA*, Crp/Fnr-like regulator) with a 0.05-0.82 fold change according to strains.

A *Ld865* gene coding for a NADH peroxidase (*npr*) was up-regulated from pH 6.5, then in addition a gene coding for a cation transporter was upregulated from pH 6.0 and a glutathione reductase gene displayed an upregulation with these genes at pH 5.0 (while this last gene was down-regulated at pH 6.0). Two *Lp777* genes coding for methionine sulfoxide reductases were upregulated at pH 6.5 and pH 6.0. Three *Lp777* genes, one coding a Fe/S protein, one coding an urocanate reductase (catalyze the reduction of an anaerobic electron acceptor into deamino-histidine, Bogachev et al., 2012) and one coding pyruvate oxidase (*pox*) were upregulated at pH 6.0.

Other genes influencing Eh homeostasis were found to be regulated by coculture. *Ld865* genes coding for riboflavin metabolism for example were downregulated during all fermentation with 0.01-0.10 fold reduction (Table 17).

Altogether these results showed that coculture modulated differently the expression of Eh homeostasis genes. In coculture, *Lp777* upregulated first *msrAB* then *urdA* and *pox* genes while *Ld865* downregulated most genes but upregulated *npr* gene.

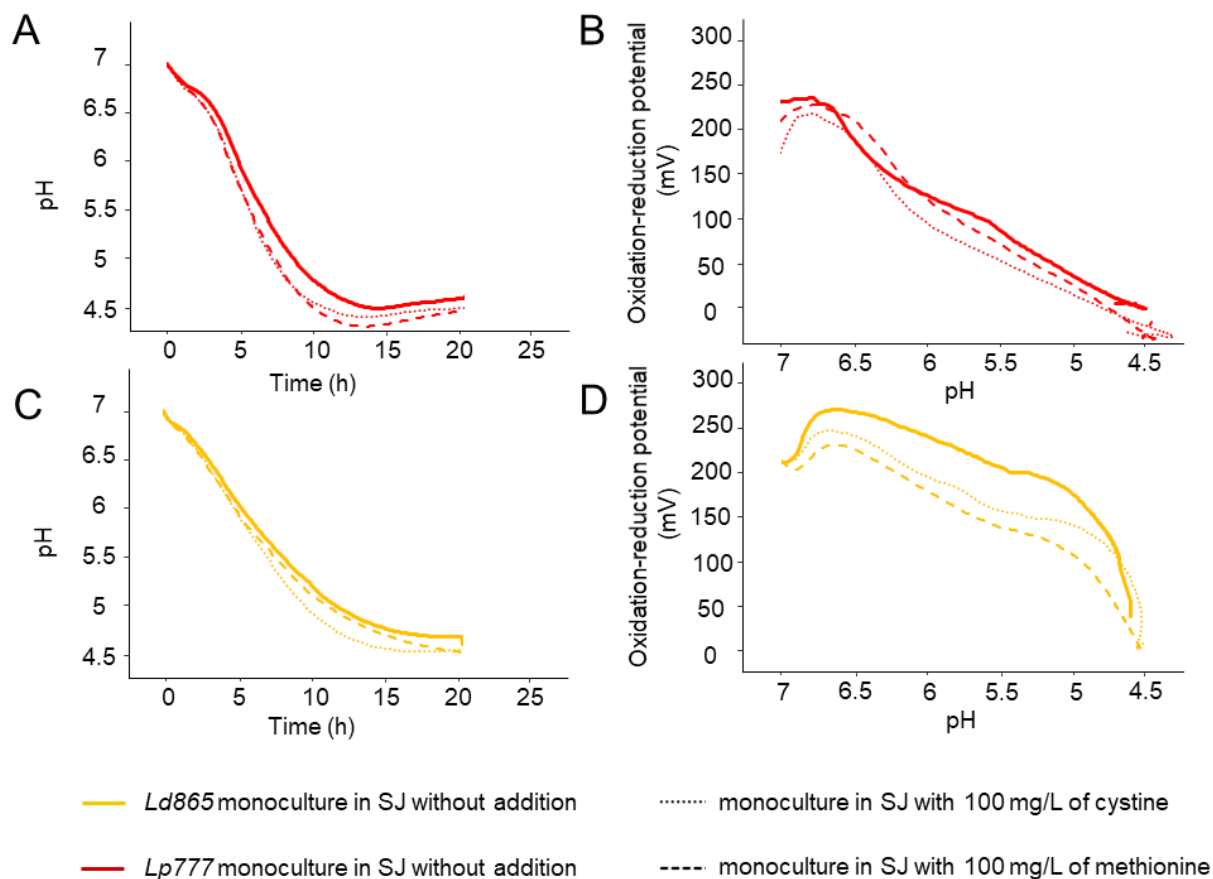


Figure 29. Fermentation of soy juice supplemented with methionine or cystine by *Lp777* or *Ld865* in monoculture. A and C represent acidification kinetics for *Lp777* and *Ld865* respectively. B and D represent oxidation-reduction potential kinetics in SJ fermentation for *Lp777* and *Ld865* respectively. E represents the rates of reduction of pH (in upH/h) and Eh (in mV/upH) in *Lp777* or *Ld865* monocultures in SJ with or without 100 mg/L of cystine or methionine. The fermentations were performed at 37°C. The final concentrations of methionine or cystine were 100 mg/L.

○ Methionine and cystine additions improves SJ fermentation

In order to understand the role of sulfur AA, fermentations were performed with *Ld865* or *Lp777* monocultures supplemented with methionine (Met) or cystine (a dimer of cysteine; Cys) at final concentrations of 100 mg/L.

In cultures with Met, the fermentation time to reach pH 4.6 was reduced to 9 h for *Lp777* monoculture (13 h without Met). For *Ld865* monoculture with Met, the fermentation time remained identical to the one without Met for *Ld865* monoculture (i.e. 27 h) (Figure 29).

Cys addition in SJ reduced both *Lp777* and *Ld865* monoculture fermentation time to 9 and 16 h, respectively (13 and 27 h without Cys) (Figure 29).

Met and Cys addition in SJ helped to reduce the Eh in these FSJ of about 34 ± 9 mV during exponential phase in both monocultures. Eh reduction rates were higher with addition of Met or Cys for *Ld865* and *Lp777* compared to SJ without addition (Figure 29E).

d) Discussion

- **The use of diverse species or strains of LAB as starter is of interest to improve SJ fermentation rate.**

There are a lack of knowledge to develop a solid strategy of LAB association. Understanding how LAB cooperate to ferment SJ is of interest in order to improve strains selection and develop cocultures with higher fermentation rate. In this study, we investigated how *Lp777-Ld865* coculture improved SJ fermentation rate. The criteria we took into consideration was the acidification rate, i.e. the time to reach a final pH4.6, which is a criteria of interest for the production of soy juice “yogurt”. The two strains selected i.e. *Ld865* and *Lp777* were previously identified as able to grow on soy juice in monoculture (Olivier Harlé et al., 2020). They were selected for the present study because of their complementary ability to ferment carbohydrates of soy juice: *Lp777* can use sucrose, stachyose and raffinose; *Ld865* can use sucrose, but not stachyose nor raffinose. Fermentation of the soy juice by the coculture of these two strains reduced of 30% the fermentation time compared to monocultures. The molecular bases of strain cooperation to improve fermentation rate were investigated.

In coculture, *Ld865* presented a 100-fold cell number increase compared to monoculture. In parallel, the cell size of *Ld865* in monoculture is much higher than in coculture (from 4 ± 1 to 37 ± 3 μm). At the transcriptomic level, numerous genes implicated in cell wall biosynthesis and cellular division were up regulated in *Ld865* in coculture during exponential growth phase compared to monoculture. *L. delbrueckii* cell elongation is common. It can result from diverse stresses. Nutritional deficiency, for example vitamin B12 (cobalamin) or lack of formic acid (Kitahara and Kusaka, 1959; Nishimura et al., 2013) and unfavorable environmental conditions such as pH, temperature, Eh, antibiotic, osmotic stress or DNA damage have been described as implicated in *L. delbrueckii*, *Lactobacillus* or *E. coli* cell elongation (Cayron et al., 2020; García-Hernández et al., 2012; Rajab et al., 2020; Ultee et al., 2019). We can thus hypothesis that *Ld865* cell elongation in SJ monoculture is a testament to a stressful environment. These stressful conditions are suppressed when *Ld865* grow in coculture with *Lp777*. Multiple stresses can be responsible for *Ld865* elongation.

- ***Lp777* and *Ld865* set up a complementary carbon catabolism in coculture**

One of the limitation of the consumption of soy-based “yogurt” is the presence of non-digestible oligosaccharides, such raffinose and stachyose, which cause abdominal discomfort (Guillon and Champ, 2002). The SJ we used contained 4.8 g/L of sucrose, 3.6 g/L of

stachyose, 0.9 g/L of raffinose, 0.6 g/L of fructose, 0.5 g/L of glucose and 0.01 g/L of galactose. Sucrose was the main fermented sugar in soy juice. Despite the ability of the strain *Lp777* to degrade raffinose and stachyose, no raffinose nor stachyose was consumed in any fermentation of the study. However, the gene encoding alpha-galactosidase was highly and progressively induced throughout the fermentation in the coculture compared to the monoculture. This apparent discrepancy can be explained by the residual sucrose (1.0 g/L at the end of the fermentation), which was not depleted at any moment of the fermentation and could have a repressor effect on the use of other sugars, as already suggested in soy kefir fermented by *Lactococcus lactis* and species belonging to *Leuconostoc* genus (Baú et al., 2015). In kefir, the degradation of stachyose and raffinose only occurred after the total consumption of glucose and fructose. In soy juice fermented by *Leuconostoc mesenteroides* and *L. curvatus*, raffinose degradation was partially inhibited by fructose and sucrose (Yoon and Hwang, 2008). The optimum of alpha-galactosidase activity also depends on the strain and on the pH (Bhatia et al., 2020). For *L. curvatus* at pH 6.0, the enzyme only reached 40 % of its optimal activity (Yoon and Hwang, 2008). In the literature, few studies present a significant raffinose and stachyose consumption in SJ fermentation with *Lactobacilli* (Hati et al., 2014; Mital and Steinkraus, 1975; Omogbai et al., 2005; Singh and Vij, 2018; Yoon and Hwang, 2008).

The transient galactose release observed in the present study is also in agreement with galactose release associated with raffinose and stachyose reduction (Hou et al., 2000; Yoon and Hwang, 2008; Zúñiga et al., 2021). We hypothesize that raffinose and stachyose degradation probably occurred in *Ld865-Lp777* coculture but at a low level not observable with the quantification method. We hypothesize then that coculture may have induced stachyose and raffinose degradation as observed in coculture of LAB and *Bifidobacteria* (Wang et al., 2003). A study of a longer fermentation or a study with a SJ with a lower initial sucrose amount could help to highlight a better oligosaccharide degradation in coculture compared to monoculture.

At the transcriptomic level, in coculture, *Lp777* and *Ld865* stimulated glycolysis at the beginning of SJ fermentation. This is in accordance with sucrose consumption and the lactic acid production rates which are higher in the coculture than in monocultures. The positive effect of coculture on soy juice fermentation has already been observed for diverse strains like some belonging to *Bifidobacterium* genus and *Propionibacterium freudenreichii* (Wu et al., 2012), *Bacillus subtilis* and *L. plantarum* (Yang et al., 2013) or *S. thermophilus* and diverse *Lactobacilli* (Albuquerque et al., 2017).

Ld865 downregulated genes coding for the use of most affordable carbon source (sucrose) while *Lp777* upregulated most genes implicated in carbohydrates catabolism (Table 17). Both strains genes implicated in secondary carbohydrates metabolisms, glycogen,

cellobiose, raffinose and stachyose were upregulated (Table 17). These findings suggest that species induce survival strategies in response to competition alike *Leuconostoc gelidum*, *Lactococcus piscium*, and *Lactobacillus oligofermentans* in MRS medium (Andreevskaya et al., 2018). Indeed, glycogen metabolism could be upregulated when raffinose is provided and repressed by glucose alike for *L. acidophilus* (Goh and Klaenhammer, 2014).

Compared to monocultures, both strains fermentation metabolisms are modulated in coculture. There is a partial rerouting of pyruvate metabolism, and as a consequence an increase of organic acid release like for *L. lactis* with *L. paracasei* in cheddar cheese making conditions (Desfossés-Foucault et al., 2014) and *L. delbrueckii* with *S. thermophilus* (Fernandez et al., 2008; Sieuwerts, 2016; Sieuwerts et al., 2008). Remind that lactic, acetic and succinic acid production rates were superior in coculture.

Pyruvate pathway may be partly shifted when NADH/NAD⁺ ratio varies as in *L. lactis* and *L. plantarum* (Kleerebezem et al., 2000; Tsuji et al., 2013) in condition of limited carbon-source. In *Lactobacilli*, pyruvate pathway is also modulated by anaerobia (Gänzle, 2015) or by lactic acid accumulation in cell causing end-product inhibition, then pyruvate accumulation and/or low NAD⁺ levels (Pieterse et al., 2005). Another complementary carbon metabolism might involve CO₂ as between yogurt's LAB (Sieuwerts, 2016) since *Lp777* genes *pdhD*, *alsS* and *pox* that produce CO₂ and *Ld865* gene *ppc* that consume CO₂ are all upregulated. The higher acetic production rate might then come from acetyl-phosphate produced by *pox*. The higher acetic and succinic acid production rate might otherwise come from the increased pyruvate pool and though its rerouting like it was observed for *L. plantarum* NCIMB8826 (Satoh et al., 2008) or *L. delbrueckii* ATCC11842 (Fernandez et al., 2008).

Note finally that *Lp777* activity is less modified in coculture in comparison to *Ld865* activity. *Lp777* presents a shorter lag phase, a higher growth rate, a higher cell number and higher oxidative stress tolerance increasing its dominance in SJ fermentation alike *L. curvatus* and *L. sakei* strains in sausage fermentations (Janßen et al., 2020) or alike *Saccharomyces cerevisiae* dominate oenological fermentation (Oliver Harlé et al., 2020). This must be why cocultured FSJ characteristics are more like *Lp777* FSJ than *Ld865* FSJ (Figure 27, Table 15 and 13).

- ***Lp777* and *Ld865* set up an amino acid complementary metabolism in coculture**

L. plantarum and *L. delbrueckii* strains can be auxotroph for many AA as alanine, arginine, glutamine, isoleucine, leucine, valine, tyrosine, methionine, cysteine and phenylalanine (Botma, 2018; Hébert et al., 2004; Inglin et al., 2018; Ma et al., 2016). The SJ has a limited amount of free AA. During fermentation, distinct AA are released by each monoculture (Table 16). We can hypothesize that a free AA pool is fed by each culture in coculture (Figure 5). Free AA amounts were however not increased in coculture compared to

monocultures (Table 16). So we induce that both strains might benefit from AA provided by the other strain or reduce their activity releasing AA in the SJ.

It is known that *L. plantarum* and *L. delbrueckii* proteolytic activity can play an important role in proto-cooperation with *S. thermophilus* as observed in cow's milk fermentation (Sieuwert et al., 2010; Settachaimongkon et al., 2014; Sieuwerts, 2016; Li et al., 2019). In the present study, only peptidase genes from *Ld865* were induced in coculture whereas corresponding genes in *Lp777* were repressed. Alike in cow milk yogurt, in this soy juice fermented with the coculture, *Lp777* benefits from *Ld865* proteolytic activities. This proto-cooperation must benefit to SJ coculture as it was shown that LAB proteases and free AA can enhance *L. plantarum* growth (Di Cagno et al., 2003; Mäkimattila et al., 2011). Free AA pool reduction can also enhance a more optimal *L. delbrueckii* nitrogen utilization (Liu et al., 2016).

Indeed, *Ld865* peptides, AA transporters, arginine and lysine biosynthesis were upregulated. In parallel, *Lp777* downregulated genes coding for peptides, AA transporters and most AA biosynthesis except for cysteine biosynthesis and cystine transport which were upregulated in coculture (Table 17). We can hypothesize that when free AA issued from proteolysis are available, in the soy juice, the LAB spent less energy for AA biosynthesis. This hypothesis would reflect why *Lp777* COG genes from amino acid metabolism clusters were mostly downregulated (89%) (Figure 3). In media with high contents of peptides and amino acids, and in absence of acidic conditions, *L. plantarum* nitrogen transport and metabolism was also shown to be downregulated (Filannino et al., 2018).

Next in this study, we focused on methionine and cysteine that are implicated respectively in thioredoxine and glutathione metabolisms and have antioxidant properties. Both metabolisms have an important role in *Lactobacillus* Eh regulation (Al-Madboly et al., 2020; Jänsch et al., 2007; Qiao et al., 2018; Serrano et al., 2007). SJ presents low amounts of methionine and cysteine (Table 16). Furthermore, a transcriptomic study of SJ fermented with *L. casei* Zhang in monoculture had already highlighted importance of methionine and cysteine metabolism (Wang et al., 2012).

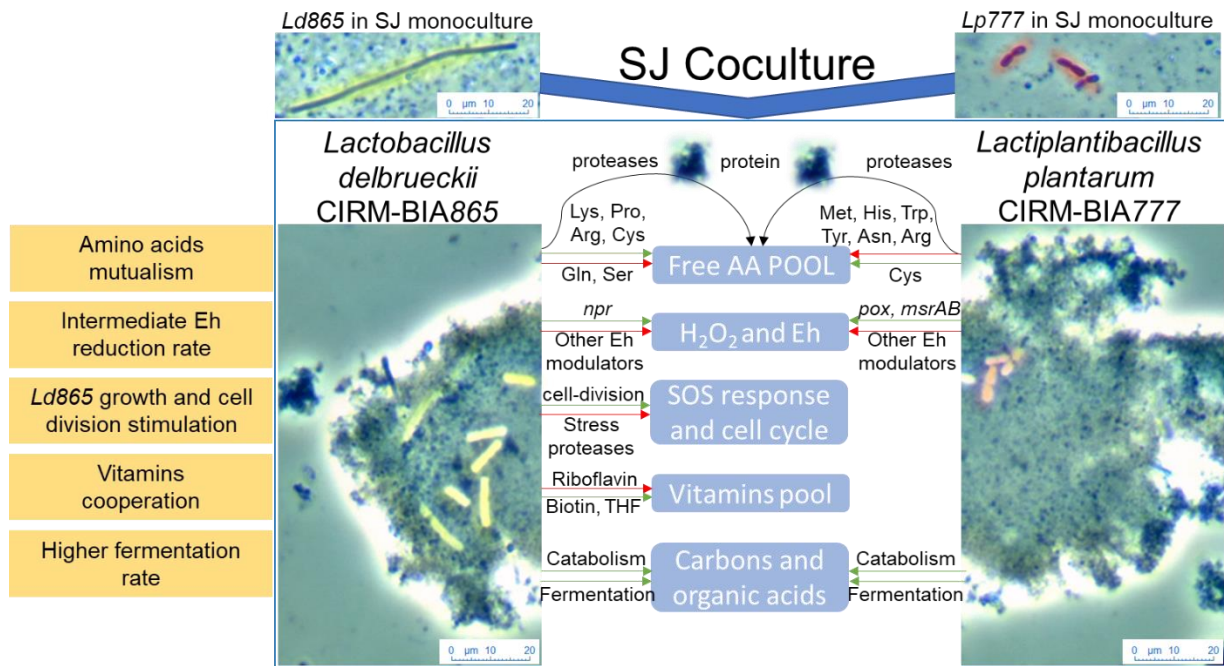


Figure 30. Phase contrast optical microscope observations (magnification x100) and representations of molecular bases of *Lp777-Ld865* positive interactions in soy juice coculture. Arrows represents metabolisms that are upregulated (green) and downregulated (red). Black arrows indicate basic activity which is not clearly up- nor downregulated. These metabolisms influence diverse pools of metabolites (Blue boxes). Each metabolite pool modulation reflect on coculture positive interactions (yellow boxes). Abbreviation given correspond to its biosynthesis pathway. Lys: Lysine, Pro: Proline, Arg: Arginine, Cys: Cysteine, Met: Methionine, His: Histidine, Trp: Tryptophan, Tyr: Tyrosine, Asn: Asparagine, Gln: Glutamine, Ser: Serine, THF: TetraHydroFolate, Eh: Oxidation-Reduction Potential, *npr* : gene coding for NADH peroxidase, *pox* : gene coding for pyruvate oxidase and *msr* : gene coding for methionine sulfoxide reductase.

Different ways led to fulfill the needs in cysteine of both *Ld865* and *Lp777*. First, both of the cystine (dimer of cysteine) transporter from *Ld865* and *Lp777* were highly induced during coculture. Secondly, in coculture *Lp777* upregulated cysteine biosynthesis from serine with up to 10.3-13.7 fold induction in coculture at pH 5.0 (Table 17). This cysteine biosynthesis might be stimulated due to serine pool feed by *Ld865* proteolytic activity. Concerning methionine metabolism, *Lp777* upregulated methionine sulfoxide reductase probably to repair protein like in *L. plantarum* CAUH2 (Zhai et al., 2020). Both *Lp777* and *Ld865* downregulated methionine transport, probably because free methionine is rapidly depleted from the medium. Methionine biosynthesis was also downregulated. We can then induce that the two strains could grow in the absence of methionine like *L. paracasei* strains (Irmler et al., 2008).

The AA contents variations can be influenced and can influence AA metabolisms autoregulation. The autoregulation of sulfur amino acid metabolism is yet to be discovered in LAB (Wüthrich et al., 2018). This sulfur AA cometabolism suggests-alike for *L. delbrueckii* and *S. thermophilus* in milk a major influence on fermenting cooperation (Herve-Jimenez et al., 2008). These sulfur AA metabolisms in coculture can also be linked with Eh homeostasis genes and oxidative stress induced by SJ fermentation conditions alike for *L. acidophilus*

(Calderini et al., 2017). Indeed, tests with methionine and cystine addition in monocultures confirmed an improvement with a reduction of SJ fermentation times of 30% and Eh reduction of about 34 ± 9 mV (Figure 29). Note that the supplementation of a soy juice with methionine and cysteine did not lead to any increase of the growth of *S. thermophilus* LMD-9 (Boulay et al., 2020). This indicates that the needs for sulfur AA have to be evaluated in a strain/ specie dependent manner.

- **Coculture may permits a cooperation with cofactors and Eh regulation**

The present study is the first at our best knowledge to investigate Eh kinetic in SJ fermentation. In our conditions, the Eh kinetic in SJ fermentation was apparently similar to milk fermentation (Morandi et al., 2016). Bacteria in SJ fermentation must though cope with oxidative stress like in milk fermentation (T. Wang et al., 2015). LAB must keep a reducing environment to state NAD^+ , limit oxidation within cells and regulate intracellular pH (Calderini et al., 2017; Nadja Larsen et al., 2016; Martin et al., 2013). LAB have diverse Eh profiles during fermentation and they have multiple ways to regulate Eh. *L. plantarum* produces H_2O_2 (pyruvate oxidase activity) but better tolerate oxidation because of intracellular manganese accumulation and also presents a higher reducing activity than *L. delbrueckii* (Brasca et al., 2007). In the present study, monocultures Eh kinetics are distinct.

Lp777-Ld865 SJ coculture Eh reduction rate was intermediary to those in monocultures. Higher reducing activity was already observed in SJ coculture with *Lactobacillus* and *Bifidobacteria* in SJ (Wang et al., 2006).

The benefit from *Lp777* Eh regulation to *Ld865* in coculture may be that *Ld865* does less have to manage Eh. Indeed most genes participating in the modulation of the oxidation reduction potential or in stress response were downregulated (Table 17). Note that few genes implicated in Eh reduction were however upregulated (*Ld865* NADH peroxidase (*npr*) and *Lp777* methionine sulfoxide reductase (*msrAB*)). *Ld865* NADH peroxidase (*npr*) upregulation might be implicated in another cooperation as it detoxifies the H_2O_2 produced by *Lp777* pyruvate oxidase (*pox*) which is also upregulated in coculture. This cooperation in relation to H_2O_2 was similar to yogurt fermentation (Sasaki et al., 2014).

Glutathione reduction genes downregulation in coculture do indicate a lower oxidative and acid stress in coculture than in monocultures, like it has been described for diverse *Lactobacilli* and *S. thermophilus* (De Angelis and Gobbetti, 2011; T. Wang et al., 2015; Wang et al., 2016). In *Lp777*, *cfa* gene, that reduces membrane fluidity, is downregulated in coculture, indicating also that it is less stressed in coculture than in monoculture, like it was observed for *L. plantarum* NCIMB8826 in fruit juices (Srisukchayakul et al., 2018). The oxidative stress reduction might be responsible of the *Ld865* increased growth in coculture as it was shown for

L. plantarum (Serrano et al., 2007). It may also be responsible of the downregulation of riboflavin metabolism (Pallotta, 2019).

In vitamin metabolisms, even if they were not quantified, we can hypothesize other cooperation as *Ld865* genes coding biotine, folate, purine and pyrimidine metabolisms are upregulated in coculture alike in yogurt fermentation (Sieuwerts, 2016).

e) Conclusion

This is the first study focusing on molecular bases of a LAB coculture in SJ fermentation. This study points out that SJ fermentation was stressful for LAB cultivation because of its low sucrose content, its low free AA contents and as it is also an oxidative environment. The two strains we worked with in the SJ fermentation were however not affected in the same way by this stressful cultivation: *Ld865* was most impacted, particularly we observed an abnormal elongation of cells. When The SJ was fermented with the *Ld865-Lp777* coculture, the interactions between strains are mostly indirect and diverse, and contribute to reduce the stressful conditions of the environment. The major interactions concerned sulfur AA metabolisms with Eh modulation metabolism and galactose co-metabolism like for *S. thermophilus* and *Lactobacilli* (Oliveira et al., 2012; Sieuwerts, 2016).

In addition, some links exist between these metabolisms. For example, AA and sugars symports and antiports can be improved thanks to Eh reduction as for *E. coli*, *L. plantarum* and *L. casei* (Fernández and Zúñiga, 2006; Jeckelmann and Erni, 2020; Ouvry et al., 2002; Riondet et al., 2000). A more reducing environment could also improve proteolysis due to reduction of disulfide bonds as did *Lactobacilli* in sourdough (Gänzle et al., 2008; Thiele et al., 2002). Hydrolysis of soy protein isolate can in return provide antioxidant peptides (Roblet et al., 2012).

All three characteristics are likely improved with *Ld865-Lp777* coculture in SJ. We presented lastly in this study a proof that highlights Met and Cys importance in SJ fermentation. We should then investigate next the importance of carbon sources and Eh homeostasis in SJ fermentation.

Acknowledgments

"We are grateful to the genotoul bioinformatics platform Toulouse Occitanie (Bioinfo Genotoul, doi: 10.15454/1.5572369328961167E12) for providing help, computing and storage resources"

B. Conclusion

Cette étude permet de mettre en évidence trois facteurs de stress de *Lp777* et de *Ld865* en fermentation de jus de soja : deux stress nutritionnels (la limitation du jus de soja en sucres et en AA libres) et un stress oxydant.

Ces trois stress ont été réduits par la coculture de *Lp777* et *Ld865*. Les interactions majeures qui ont permis de réduire ces stress sont un « cross-feeding » d'AA et une coopération afin de limiter le stress oxydant et cataboliser les sucres. Ces interactions positives sont impliquées dans l'amélioration de la vitesse de fermentation en coculture par rapport aux monocultures. En effet, nous avons enfin montré que l'ajout de méthionine ou de cystine (un dimère de cystéine) pouvait permettre d'améliorer la vitesse de fermentation du jus de soja en monocultures. Ces acides aminés sont impliqués dans la modulation du potentiel d'oxydoréduction. Il reste donc encore à chercher quel mécanisme permet d'améliorer la vitesse de fermentation.

L'amélioration de la vitesse de fermentation n'est pas le seul bénéfice de cette coopération. C'est pourquoi, dans la partie suivante, nous avons exploré et comparé les composés volatils produits en mono- et cocultures de jus de soja.

C. Comparaison des composés volatils produits en mono- et coculture.

1 Introduction

Il a été montré dans la partie précédente que *Lp777* et *Ld865* interagissent par des mécanismes de coopération afin de limiter le stress oxydant, afin de cataboliser les sucres et par du « cross-feeding » de plusieurs AA.

Ces interactions sont positives car elles permettent d'améliorer la vitesse de fermentation du jus de soja. Nous avons montré en partie III que l'association de BL en jus de soja pouvait permettre d'améliorer le profil organoleptique des FSJ. Nous nous sommes donc intéressés dans cette dernière partie aux profils en composés volatils des jus de soja fermentés par *Lp777* et *Ld865* en mono et coculture.

2 Matériel et méthodes

L'analyse des composés volatils a été réalisée sur les fermentations de la partie précédente (partie V) Les échantillons ont été prélevés pendant les fermentations, aux pH 6.5, 6.0, 5.0 et 4.5 et ont été immédiatement congelés à -80°C en attendant d'être analysés. Les méthodes d'analyses étaient les mêmes que celles décrites dans Harlé et al., 2020 (partie II.D).

3 Résultats

Trente-trois composés volatils ont été identifiés en jus de soja fermentés par *Lp777* et *Ld865* (Tableau 18).

Parmi ces trente-trois composés volatils, onze sont présents à des concentrations équivalentes ou supérieures en jus de soja non fermenté qu'en jus de soja fermenté (Tableau 19). Parmi ces onze composés, six composés, le 2-méthylpropanol, le 2-éthylfuran, le 2-pentylfuran, l'acide propanoïque, le propan-2-one et l'heptane-2-one ne varient pas significativement en concentrations dans aucune des fermentations lactiques réalisées. Les cinq autres composés, le pentanal, l'hexanal, le propan-1-ol, le butan-1-ol et le 3-méthylbutanal diminuent en concentration dans l'ensemble des cultures de *Lp777* et *Ld865* (Tableau 19).

Tableau 18. Composés volatils identifiés dans les jus de soja non fermentés et fermentés par *L. plantarum* CIRM-BIA777 et *L. delbrueckii* CIRM-BIA865 en mono- et cocultures à 37°C.

CAS Number	Volatile compounds (IUPAC Name)	Odor descriptor ^a	m/z	Identification ^b	Linear Retention Index, calculated	p value ^c
75-07-0	acetaldehyde	aldehyde;ether;fruity	44	DB,LRI,S	640	3.89E-04
67-64-1	propanone	apple;ether;pear;solvent	43	DB,LRI	826	3.41E-14
141-78-6	ethyl acetate	anise;balsam;ethereal;fruity;green	70	DB,LRI,S	958	3.91E-02
78-93-3	butan-2-one	acetone;camphor;ether;fruity	72	DB,LRI,S	890	6.63E-08
590-86-3	3-methylbutanal	chocolate;ethereal;malt;fatty;peach;	58	DB,LRI,S	901	2.10E-12
3208-16-0	2-ethylfuran	burnt;earthy;malty;sweet	81	DB,LRI	935	1.62E-07
110-62-3	pentanal	almond;berry;bready	58	DB,LRI,S	963	2.93E-08
431-03-8	butane-2,3-dione	butter;vinegar;coffee;caramel;creamy	86	DB,LRI,S	969	1.18E-02
71-23-8	propan-1-ol	alcohol;fermented;fusel;musty;peanut	31	DB,LRI	1076	3.49E-07
66-25-1	hexanal	fatty;fruity;green;fresh;sweaty	44	DB,LRI	1076	4.85E-07
78-83-1	2-methylpropan-1-ol	bitter;ether;solvent;wine	33	DB,LRI	1119	2.82E-01
71-36-3	butan-2-ol	balsam;fruit;oil;vanilla;fusel	56	DB,LRI	1153	3.65E-10
110-43-0	heptan-2-one	cinnamon;woody;coconut;fruity;herbal	58	DB,LRI,S	1177	4.30E-22
3777-69-3	2-pentylfuran	beany;butter;earthy;fruity;green	81	DB,LRI	1220	3.22E-05
763-32-6	3-methylbut-3-en-1-ol	fruit;sweet	56	DB,LRI	1246	7.55E-08
71-41-0	pentan-1-ol	balsam;fusel;oil;sweet;vanilla	70	DB,LRI	1247	7.69E-09
513-86-0 ou 5	3-hydroxybutan-2-one	butter;cream;fatty;dairy;sweet	43	DB,LRI	1272	1.32E-01
116-09-6	1-hydroxypropan-2-one	caramelic;ethereal;pungent;sweet	43	DB,LRI	1288	1.51E-03
123-32-0	2,5-dimethylpyrazine	chocolate;nutty;peanut;musty;earthy;powdery;ro	108	DB,LRI	1300	1.64E-10
18829-55-5	(2E)-hept-2-enal	fatty;green	41	DB,LRI	1304	5.21E-08
821-55-6	nonan-2-one	earthy;fishy;fresh;green;herbal;hotmilk	58	DB,LRI	1376	2.72E-05
64-19-7	acetic acid	sour;acetic;vinegar	60	DB,LRI,S	1447	1.39E-01
100-52-7	benzaldehyde	almond;walnut;cinnamon;bitter;cherry	106	DB,LRI,S	1507	4.75E-01
64-18-6	formic acid	formyl;pungent;vinegar	46	DB,LRI	1522	2.71E-02
79-09-4	propanoic acid	pungent;rancid;soy	73	DB,LRI	1533	1.28E-02
107-92-6	butanoic acid	acetic;butter;cheese;fruit;rancid	60	DB,LRI,S	1619	1.46E-01
109-52-4	pentanoic acid	acidic;putrid;rancid;sweat;animal	60	DB,LRI,S	1734	3.38E-01
142-62-1	hexanoic acid	cheese;fatty;sour;sweat	60	DB,LRI,S	1839	5.49E-01
60-12-8	phenylethanol	hyacinth;gardenia;fresh;sweet	122	DB,LRI	1872	7.19E-11
111-14-8	heptanoic acid	cheese;rancid;sour;sweat	73	DB,LRI,S	1931	2.29E-02
124-07-2	octanoic acid	cheese;fatty;rancid;sweat;vegetable	60	DB,LRI,S	2027	3.93E-02
112-05-0	nonanoic acid	cheese;dairy;fat;green;dirty	60	DB,LRI	2116	6.26E-02
334-48-5	decanoic acid	citrus;fatty;rancid;sour	73	DB,LRI	2203	3.40E-02

^a Odor described from thegoodscentscompany.com and foodb.ca (2019)

^b Identification based on: LRI, linear retention index and DB, mass spectral data Library NIST 2008 et S standards

^c p value, for each volatile compound, of the anova to determine the effect of the conditions

Tableau 19. Comparaison des concentrations relatives en composés volatils identifiés en jus de soja non fermenté et fermentés par *L. plantarum* CIRM-BIA777 et *L. delbrueckii* CIRM-BIA865 en mono- et cocultures à 37°C. Résultats présentés en Log10. Le gradient de couleurs permet d'aider la visualisation des différences par composé. Les lettres indiquent les différences de concentrations obtenues par un test de Tukey avec une erreur alpha de 0,1.

		Compounds more present in unfermented SJ											Compounds more present in FSJs				
Names	pH	pentanal	hexanal	propan-1-ol	butan-1-ol	2-methylpropanol	3-methylbutanal	2-pentylfuran	2-ethylfuran	propanoic acid	propan-2-one	heptan-2-one	butan-2-one	ethyl acetate	phenylethanol	pentan-1-ol	3-methylbut-3-en-1-ol
T	7.0	8.1 abc	8.8 b	7.2 ab	8.7 a	6.1 a	8.2 a	9.0 abc	8.8 a	8.0 ab	9.0 a	7.9 a	8.1 b	7.4 b	6.1 h	7.6 e	7.2 e
Ld865	6.5	8.1 a	9.0 a	7.3 a	7.5 b	6.6 a	8.0 b	9.1 a	8.9 a	7.9 ab	8.9 a	8.1 a	8.1 b	7.6 b	6.2 gh	7.7 cde	7.3 e
	6.0	8.0 abcd	8.8 bc	7.2 bc	7.2 b	6.4 a	7.9 bc	9.0 abcd	8.8 a	8.3 ab	9.0 a	8.0 a	8.1 b	7.3 b	6.2 gh	7.6 de	7.3 e
	5.0	7.8 de	8.6 de	6.9 def	7.8 b	6.8 a	7.8 bcd	8.9 abcd	8.8 a	7.8 b	8.8 a	8.1 a	8.2 b	7.4 b	6.3 fgh	7.7 cde	7.3 e
	4.5	7.8 de	8.5 de	6.9 def	7.3 b	6.5 a	7.8 bcd	8.6 d	8.6 a	8.1 ab	8.9 a	8.2 a	8.2 ab	7.7 b	6.5 defg	7.7 bcde	7.4 cde
Ld865 and Lp777	6.5	8.1 ab	8.8 b	7.2 ab	7.6 b	6.3 a	8.0 b	9.1 ab	8.8 a	8.2 ab	9.0 a	8.0 a	8.4 a	8.3 a	6.4 efgh	7.7 bcde	7.4 de
	6.0	8.1 abc	8.7 bcd	7.1 bcd	7.6 b	6.6 a	7.9 bcd	9.0 abcd	8.8 a	8.2 ab	9.0 a	8.0 a	8.3 ab	7.9 b	6.6 de	7.8 bcde	7.5 cde
	5.0	7.8 de	8.5 e	6.9 ef	7.9 b	6.6 a	7.6 bcd	8.8 abcd	8.7 a	8.1 ab	8.9 a	8.1 a	8.2 b	7.7 b	6.8 bc	7.9 bcd	7.6 bc
	4.5	7.9 cde	8.5 de	6.9 ef	8.0 b	6.7 a	7.6 bcd	8.6 cd	8.6 a	8.3 a	8.8 a	8.2 a	8.2 b	7.5 b	6.9 ab	7.9 ab	7.7 b
Lp777	6.5	8.0 bcde	8.7 cd	7.0 cde	8.0 b	6.8 a	7.8 bcd	9.1 ab	8.8 a	8.1 ab	8.9 a	8.0 a	8.3 ab	8.0 ab	6.6 def	7.7 bcde	7.4 de
	6.0	7.9 de	8.5 e	6.9 ef	7.8 b	6.6 a	7.7 bcd	9.0 ab	8.8 a	8.1 ab	9.0 a	8.0 a	8.2 b	7.6 b	6.7 cd	7.8 bcd	7.6 bcd
	5.0	7.7 e	8.3 e	6.7 f	8.0 b	6.9 a	7.4 d	8.8 bcd	8.7 a	7.8 b	8.9 a	8.1 a	8.2 b	7.3 b	6.8 b	7.9 bc	7.7 b
	4.5	7.8 de	8.4 e	6.9 ef	7.9 b	6.0 a	7.4 cd	8.9 abcd	8.8 a	7.9 ab	8.9 a	8.2 a	8.2 ab	7.1 b	6.9 a	8.1 a	7.9 a

		Compounds more present in FSJs																
Names	pH	butanoic acid	acetic acid	pentanoic acid	butane-2,3-dione	3-hydroxybutan-2-one	3-hydroxypropan-2-one	hexanoic acid	oxolan-2-one	benzaldehyde	hept-2-enal	acetaldehyde	formic acid	heptanoic acid	octanoic acid	Nonanoic acid	Decanoic acid	nonan-2-one
T	7.0	7.4 c	9.4 b	7.1 d	7.8 c	7.7 e	8.1 e	7.5 e	6.1 b	7.8 b	7.4 b	9.2 c	7.5 c	6.8 c	7.4 b	7.6 bc	6.6 b	6.7 e
Ld865	6.5	7.5 c	9.5 b	7.5 d	7.8 c	7.9 de	8.3 cde	7.7 de	6.1 b	7.9 ab	7.5 b	9.2 c	7.5 c	6.9 bc	7.4 b	7.7 bc	6.7 ab	7.0 de
	6.0	7.4 c	9.5 b	7.5 d	8.0 bc	7.9 de	8.3 de	7.7 de	6.2 b	7.8 b	7.5 b	9.3 c	7.5 c	6.9 bc	7.5 b	7.8 abc	6.7 ab	7.2 d
	5.0	7.6 c	9.4 b	7.7 cd	8.1 bc	8.5 cde	8.6 bc	7.8 de	6.3 ab	7.9 ab	7.5 b	9.2 c	7.5 c	7.1 abc	7.5 b	7.7 bc	6.8 ab	7.4 c
	4.5	7.8 bc	9.7 b	8.2 bc	8.1 bc	8.9 cd	8.8 a	8.2 abc	6.3 ab	7.9 ab	7.7 b	9.3 c	7.6 c	7.3 ab	7.7 ab	7.9 ab	6.9 ab	7.6 b
Ld865 and Lp777	6.5	7.4 c	9.5 b	7.3 d	7.9 c	8.3 de	8.2 de	7.5 e	6.1 b	7.9 ab	7.5 b	9.3 c	7.6 c	6.8 c	7.3 b	7.6 bc	6.6 b	7.0 de
	6.0	7.4 c	9.2 b	7.4 d	7.9 bc	8.4 de	8.3 de	7.5 e	6.1 b	7.9 ab	7.6 b	9.3 c	7.5 c	6.8 c	7.2 b	7.5 bc	6.6 b	7.1 de
	5.0	7.7 bc	9.7 b	7.9 cd	8.2 b	9.0 c	8.5 cd	8.1 bcd	6.2 ab	7.9 ab	7.7 b	9.3 bc	7.7 bc	7.2 abc	7.6 ab	7.8 abc	6.8 ab	7.5 c
	4.5	8.0 ab	10 a	8.4 ab	8.6 a	9.6 b	8.7 ab	8.4 a	6.4 a	8.0 a	7.9 a	9.5 ab	8.0 a	7.4 a	7.9 a	8.0 a	7.0 a	7.8 a
Lp777	6.5	7.5 c	9.4 b	7.2 d	7.7 c	8.0 de	8.3 de	7.5 e	6.1 b	7.8 b	7.5 b	9.2 c	7.5 c	6.8 c	7.3 b	7.6 bc	6.7 b	6.8 e
	6.0	7.4 c	9.2 b	7.3 d	7.7 c	8.1 de	8.3 de	7.5 e	6.2 b	7.8 b	7.6 b	9.3 c	7.7 bc	6.9 c	7.3 b	7.4 c	6.6 b	6.8 e
	5.0	7.7 c	9.7 b	7.8 cd	7.8 c	8.6 cde	8.6 bc	8.0 cd	6.2 b	7.9 ab	7.7 b	9.3 c	7.6 c	7.2 abc	7.6 ab	7.8 abc	6.8 ab	6.9 de
	4.5	8.0 a	10 a	8.4 a	8.5 a	9.7 a	8.8 a	8.3 ab	6.3 ab	8.0 a	8.0 a	9.6 a	7.9 ab	7.0 bc	7.6 ab	7.8 abc	6.8 ab	7.2 d

Parmi les vingt-deux composés volatils présents en concentration supérieure dans les FSJ que dans le jus de soja non fermenté, quinze ont été identifiés en concentration supérieure uniquement dans les FSJ contenant *Lp777* (Tableau 19). Aucun composé volatil n'est uniquement produit dans les FSJ contenant *Ld865*. Cinq composés sont produits dans l'ensemble des FSJ (3-hydroxybutan-2-one, 3-hydroxypropan-2-one, acide hexanoïque, acide heptanoïque et nonan-2-one) (Tableau 19). Ces derniers composés produits dans tous les FSJ peuvent être responsables d'odeurs 'lactique' et 'aigre' (Tableau 18). Enfin, deux composés (le butan-2-one et l'acétate d'éthyle) ne sont présents en concentration supérieure qu'en début de fermentation, au pH 6.5, des cultures comportant *Lp777* (Tableau 19).

Un seul composé, le nonan-2-one, est présent en concentration supérieure en coculture que dans les monocultures de *Lp777* ou de *Ld865*. Aucun composé n'est à l'inverse présent en concentration supérieure en monoculture qu'en coculture.

4 Discussion

En ce qui concerne les résultats du jus de soja non fermenté et des FSJ obtenus en monoculture, les profils sont en accord avec les profils obtenus pour les souches de *Lactobacillus* (partie II).

La coculture en jus de soja modifie peu le profil en composés volatils des FSJ. Un faible effet de la coculture sur le nombre de composés identifiés en fermentation avait également été identifié en yaourt (Settachaimongkon et al., 2014). La proto-coopération d'une souche faiblement protéolytique de *S. thermophilus* avec une souche de *L. delbrueckii* avait par contre augmenté la synthèse de composés volatils issus du métabolisme des AA en fermentation de yaourt (3-methylbutan-2-ol, octan-2-one, 3-acetyl-2,5-dimethyl-furan, acides 3-methylbutanoïque, 2-methyl-propanoïque et pentanoïque) (Settachaimongkon et al., 2014).

Un unique composé, le nonan-2-one est produit en plus grande quantité en coculture qu'en monoculture. La production de nonan-2-one serait liée au métabolisme des lipides chez *L. lactis* (Dhaisne et al., 2013). D'autres phénomènes d'interactions peuvent donc provenir du métabolisme des lipides non investigué dans cette thèse. Il serait intéressant d'étudier les gènes DE qui concernent les voies de la lipolyse et du catabolisme des acides gras (beta-oxydation et décarboxylation).

Chapitre 3. Discussion générale, conclusions et perspectives

Un des intérêts de la fermentation lactique du jus de soja est d'en améliorer les qualités nutritionnelles et organoleptiques. Cette fermentation consiste à utiliser des bactéries lactiques afin de transformer les sucres du jus de soja en acide lactique. Cela a pour effet d'apporter un goût acide et de gélifier le jus de soja. Cette gélification donne au produit l'aspect et la texture d'un yaourt. La fermentation lactique du jus de soja peut par ailleurs permettre de dégrader des composés volatils désagréables, des oligosaccharides non digestibles, tout en libérant des composés nutritionnels et des composés volatils hédoniques. La fermentation lactique est très bien étudiée en lait et milieu synthétique. En ce qui concerne le jus de soja, mieux en connaître la fermentation pourrait permettre par exemple de diversifier les profils organoleptiques des produits, de les enrichir en composés d'intérêt nutritionnel (vitamines par exemple), de réduire plus efficacement les composés à l'origine des « off-notes », mais aussi de l'astringence. La consommation des produits au soja serait ainsi plus appréciée, notamment par les consommateurs occidentaux, ce qui pourrait permettre d'augmenter la part de protéines végétales dans l'alimentation.

Toutefois, les qualités fermentaires, nutritionnelles et organoleptiques des spécialités fermentées au soja nature sont conditionnées par les caractéristiques des jus de soja, les caractéristiques fermentaires des BL et les contraintes industrielles et du marché.

Les graines de soja contiennent $7 \pm 1\%$ de sucres totaux. Le saccharose constitue la moitié de ces sucres, tandis que des oligosaccharides non digestibles (stachyose et raffinose) en constituent l'autre moitié. Les graines de soja contiennent aussi jusqu'à 40% de protéines.

Les protéines de soja sont cependant pauvres en méthionine et cystéine (2.2% en masse) (Evans and Bandemer, 1967). Enfin, les graines de soja contiennent 20% de lipides.

Le jus de soja peut être issu de divers procédés de traitement des graines de soja. Ces traitements peuvent rendre le jus de soja oxydant (Tang et al., 2012). Du fait des divers procédés existants, il existe des jus de soja aux caractéristiques diverses. Les jus de soja sont généralement standardisés en protéines (36 ± 3 g/L). Le jus de soja étudié dans cette thèse était standardisé à 35 ± 1 g/L de protéines et contenait 0,3 g/L d'AA libres, 4,2 g/L de saccharose, 0,7 g/L de raffinose et 3,1 g/L de stachyose.

Les contraintes industrielles et du marché nécessitent que les durées de fermentations soient inférieures à 10 h tout en atteignant un pH < 4,7. Lors de la fermentation, le levain doit résister aux éventuelles attaques phagiques. Il doit aussi être suffisamment complexe afin de limiter les contrefaçons. Pour ces deux dernières raisons, les levains constitués de plusieurs souches de la même espèce ou d'espèces différentes, sont généralement préférés aux levains mono-souches. Enfin, le produit fermenté développé doit aussi être sûr pour la consommation.

Le développement de levains mixtes, constitués de plusieurs souches d'une même espèce ou d'espèces différentes est aussi une stratégie d'intérêt. L'utilisation de levains mixtes peut permettre d'améliorer à la fois les qualités fermentaires, nutritionnelles et organoleptiques des FSJ (Albuquerque et al., 2017; Wang et al., 2006; Wu et al., 2012). Les résultats de fermentations végétales qui mettent en œuvre des souches en cocultures sont cependant encore difficilement prévisibles du fait de la faible compréhension des interactions microbiennes en matrice végétale (Tangyu et al., 2019).

Les travaux de cette thèse visent à apporter des connaissances qui permettront de choisir, sur des bases éclairées, des souches à associer pour fermenter un jus de soja de manière optimale (sanitairement, industriellement et organoleptiquement). Ils répondent à la question scientifique : quelles sont les bases moléculaires des interactions positives entre BL en fermentation de jus de soja ? La discussion générale des résultats est structurée en quatre parties : I. Les caractéristiques des BL en fermentation de jus de soja, II. Les associations de BL pour fermenter le jus de soja, III. Le stress des BL en fermentation de jus de soja et IV. Les perspectives de la thèse.

I. Caractéristiques des BL en fermentation de jus de soja

Cette thèse a d'abord consisté à cribler des souches de bactéries lactiques afin de décrire leurs caractéristiques et leurs capacités potentielles pour fermenter du jus de soja. Puisque le jus de soja peut être pauvre en saccharose, nous avons cherché à savoir si les BL pouvaient fermenter le jus de soja en utilisant les autres sources de carbones, en particulier le

raffinose et/ou le stachyose. 276 souches de BL ont été criblées. Leurs capacités à acidifier des milieux synthétiques avec ces différentes sources de carbone et à acidifier du jus de soja ont été identifiées. Parmi les souches capables d'acidifier un milieu synthétique ne contenant que du saccharose, toutes étaient capables de fermenter le jus de soja. En revanche parmi les souches uniquement capables d'acidifier un milieu synthétique ne contenant que du raffinose ou du stachyose, la moitié étaient capables de fermenter le jus de soja. Enfin, parmi les souches capables de fermenter le jus de soja et d'acidifier un milieu synthétique ne contenant que du raffinose ou du stachyose, aucune souche n'a permis de réduire la teneur en raffinose ni en stachyose du jus de soja.

Pourquoi, parmi les souches uniquement capables d'utiliser le raffinose et/ou le stachyose, une souche sur deux ne peut fermenter le jus de soja en moins de 48 h ? Et pourquoi parmi les souches qui fermentent le jus de soja et qui sont capables d'utiliser le raffinose et/ou le stachyose, aucune ne réduit les teneurs de ces oligosaccharides en jus de soja ? Les données de la bibliographie, permettent d'émettre deux hypothèses, qui pourraient se cumuler.

La première hypothèse serait que l' α -galactosidase est peu produite en fermentation de jus de soja. Comme présenté en partie IV du chapitre 1, la production d' α -galactosidase est maximale avec du stachyose ou du raffinose comme unique source de carbone mais est réprimée en présence de sucrose, glucose ou fructose (Baú et al., 2015; Bhatia et al., 2020; Carević et al., 2016; Garro et al., 1996; Yoon and Hwang, 2008). Des ions Cu^{2+} , Zn^{2+} and Fe^{2+} (10 mM) peuvent inhiber la synthèse d' α -galactosidase, comme chez *L. helveticus* (Bhatia et al., 2020; Han et al., 2014).

Le jus de soja utilisé dans cette thèse contenait davantage de saccharose (4,2 g/L) que de raffinose (0,7 g/L) et de stachyose (3,1 g/L). La présence de saccharose a donc pu limiter la production d' α -galactosidase des BL testées.

La seconde hypothèse est que l'enzyme produite soit peu active en fermentation de jus de soja. Les sucres limitent la production d' α -galactosidases mais peuvent aussi inhiber leur activité (Morales-Quintana et al., 2017). Les α -galactosidases purifiées de *Lactobacillus* ont montré divers températures et pH auxquels l'activité était maximale du pH 5.5 au pH 8.0 (Bhatia et al., 2020; Garro et al., 1996; LeBlanc et al., 2004; Yoon and Hwang, 2008). Le jus de soja avait un pH initial de 7.2 mais atteint un pH inférieur à 5.5 lorsque le saccharose du jus de soja est consommé.

Il est possible que dans notre étude l' α -galactosidase ne soit produite que lorsque les conditions ne sont plus favorables à son activité. Le jus de soja utilisé et les conditions de fermentations mises en œuvre ne seraient alors pas optimales pour que l' α -galactosidase de certaines souches soit active. Il faudrait tester l'effet des composants présents en jus de soja

sur l'activité des α -galactosidases des souches utilisées. Ces essais pourraient donner des pistes d'optimisation de l'activité des α -galactosidases des BL en fermentation de jus de soja.

Suite à ce premier criblage, les capacités des BL à réduire et produire des composés volatils en jus de soja ont été étudiées. Certaines souches de *S. thermophilus* étaient capables de diminuer des composés responsables du goût « vert » du jus de soja comme l'hexanal ou le pentylfuran. Certaines souches étaient capables de produire des composés volatils à l'origine de l'odeur « beurré » comme le butane-2,3-dione par des souches de *S. thermophilus* ou de l'odeur « floral » comme le phényléthan-1-ol par une souche de *L. plantarum* (Olivier Harlé et al., 2020). Ces caractères dépendent des espèces et souches utilisées. Parmi les 276 souches testées, 25 espèces étaient représentées. Les FSJ de souches de *L. lactis* présentaient par exemple des odeurs de « choux » et de « bouillon » non identifiées dans les FSJ d'autres espèces (Olivier Harlé et al., 2020). 164 odeurs et 35 composés volatils ont été identifiés en FSJ (Olivier Harlé et al., 2020). Peu de souches permettaient cependant de réduire les « off-notes » du soja tout en apportant des arômes hédoniques. C'est pourquoi l'utilisation de cocultures de souches de BL pourrait permettre de répondre à ces deux objectifs.

II. Associations de BL et interactions en fermentation de jus de soja

L'association de BL est une solution qui pourrait permettre d'améliorer en même temps, les qualités fermentaires, nutritionnelles et organoleptiques des FSJ. Dans ce travail, les objectifs des associations étaient de réaliser une coculture « d'application » avec un meilleur profil organoleptique en coculture qu'en monoculture et une coculture « d'étude » avec une vitesse d'acidification plus élevée en coculture qu'en monoculture. La stratégie d'association des cocultures a été basée sur la complémentarité métabolique des BL. Les complémentarités métaboliques et les interactions entre BL en coculture sont peu étudiées en jus de soja. Parmi les 32 cocultures « d'application » et les 12 cocultures « d'études » testées, une coculture « d'application » présentait une meilleure note d'appréciation globale et 4 cocultures « d'études » présentaient une vitesse d'acidification plus élevée que les monocultures.

Les souches des cocultures « d'études » ont été sélectionnées selon leurs complémentarités à utiliser les différents sucres du soja. Seule la coculture constituée de *Lactiplantibacillus plantarum* CIRM-BIA777 (*Lp777*) et *Lactobacillus delbrueckii* CIRM-BIA865 (*Ld865*) a été étudiée en détails. C'est la coculture qui a permis d'obtenir l'amélioration de la vitesse d'acidification la plus importante et ainsi de réduire le temps de fermentation de 30%. L'étude des génomes de ces deux souches a révélé les bases génétiques de leur capacité à dégrader les sucres du soja. Selon les génomes, *Lp777* peut produire de l' α -galactosidase

mais pas *Ld865*, ce qui est en accord avec leurs capacités à utiliser du raffinose (vérifié en galerie API, Annexe E). Ces deux souches sont représentatives de leur espèce puisque moins de 10% des souches de *L. delbrueckii* et plus de 90% des souches de *L. plantarum* sont capables de dégrader le raffinose (Vos et al., 2009).

Une coopération entre *Lp777* et *Ld865* pour l'utilisation des sucres du jus de soja est donc prévisible. Par exemple, les deux souches catabolisent du saccharose et donc en réduisent la concentration dans le milieu extracellulaire. Ce catabolisme peut induire la libération de glucose et de fructose qui peuvent alors être utilisés par les bactéries en coculture. Cette coopération peut cependant devenir un phénomène de compétition pendant la fermentation puisque la source de saccharose est limitée en jus de soja. Cela peut induire des comportements d'adaptation des BL, par exemple l'induction de la production d' α -galactosidase en coculture.

Toutefois, on a constaté que la complémentarité métabolique entre les deux souches n'a pas permis de dégrader complètement le raffinose et le stachyose.

L'étude des génomes a aussi révélé d'autres complémentarités qui pourraient expliquer l'amélioration de l'acidification en coculture. Il y a donc une complémentarité génomique au niveau de la dégradation des sucres, mais aussi au niveau du métabolisme des AA, de la synthèse de vitamines et de cofacteurs impliqués dans la modulation du potentiel d'oxydoréduction.

Les études des transcriptomes et métabolomes lors de la croissance des deux souches en monoculture ont permis de révéler d'autres complémentations. L'ensemble des analyses ainsi que l'étude de la bibliographie permettent de faire des hypothèses d'interactions entre *Lp777* et *Ld865*.

Du « cross feeding » pourrait par exemple être prédit puisqu'il est connu que *L. delbrueckii* est une espèce protéolytique. Dans l'analyse des monocultures en jus de soja, il a été montré que *Ld865* libérait divers AA et que *Lp777* épuisait certains de ces AA. Des interactions de commensalisme pouvaient également être prédites. En monoculture de jus de soja, *Lp777* réduisait par exemple davantage l'Eh que *Ld865*. La plupart de ces phénomènes prédictibles se sont produits en coculture.

Cette partie confirme que sélectionner les souches sur leurs complémentarités métaboliques est d'intérêt pour rechercher des interactions positives entre des BL. La complémentarité métabolique au niveau biochimique et génomique a été remarquée par Sieuwerts et al., 2008 dans la yaourt au lait de vache entre les espèces *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. Cette thèse présente en plus l'intérêt d'étudier les complémentarités au niveau transcriptomique tout au long de la cinétique de fermentation. Toutes les interactions ne peuvent cependant pas être prédites. Certaines interactions ont été observées uniquement par l'investigation des phénomènes d'interaction

en comparant la coculture avec les monocultures. Par exemple, en coculture, *Lp777* a produit davantage de H₂O₂ (le gène *pox* est induit 4,1 fois) et *Ld865* a réduit davantage de H₂O₂ (le gène *npr* est induit 9,6 fois) que dans leurs monocultures.

III. Le stress des BL en fermentation de jus de soja

La comparaison de la coculture avec les monocultures a permis de mettre en évidence des caractéristiques clés de la fermentation du jus de soja qui peuvent affecter la croissance des souches, notamment des stress. Ces stress ont été mis en évidence grâce à la comparaison des fermentations du SJ en mono- et cocultures.

Deux stress nutritionnels ont été observés en fermentation de jus de soja :

La limitation en saccharose du jus de soja était identifiée dès la sélection du jus utilisé pour la thèse. Les analyses transcriptomiques en coculture ont révélé que la mise en coculture induisait des phénomènes de compétition et de coopération. Un phénomène de « cross-feeding » pourrait également être mis en place en coculture.

La limitation en acides aminés libres du jus de soja a été identifiée par les analyses biochimiques et transcriptomiques. La mise en coculture a mis en exergue ce stress nutritionnel. Un phénomène de « cross-feeding » pourrait être mis en place en coculture. Les essais d'ajouts de 100 mg/L de cystine ont permis d'améliorer les vitesses d'acidification des deux monocultures. L'ajout de 100 mg/L de méthionine a permis d'améliorer la vitesse d'acidification de *Lp777* en monoculture.

Le jus de soja provoque également un stress oxydant sur les deux souches de BL étudiées. Les deux souches exprimaient en effet des gènes codant pour des protéines antioxydantes comme la NADH peroxydase (*npr*), le glutathion et la thioredoxine. La méthionine et la cystéine sont impliquées dans ces mécanismes cellulaires de modulation de l'Eh. Leurs carences pourraient donc induire un stress nutritionnel et un stress oxydant.

Pour chaque stress potentiel, des essais de fermentation de jus de soja avec différents ajouts, de sucres, d'AA et d'antioxydants, seuls ou en duos permettraient de confirmer l'importance de ces stress. L'élongation et la division des cellules de *Ld865* en monoculture est par ailleurs un autre marqueur du stress subit en fermentation de jus de soja. La réduction de cette élongation et l'augmentation de la population de *Ld865* en coculture traduit la levée de ces stress.

Ces stress identifiés et les effets de la levée de ces stress induisent divers perspectives.

IV. Perspectives

La révélation des capacités fermentaires des BL en jus de soja, des effets d'associations, des phénomènes d'interactions et des stress induits en fermentation de jus de soja permettent d'établir diverses perspectives. Ces perspectives sont divisées en deux parties : A. L'amélioration de la fermentation lactique de jus soja et B. Comprendre les interactions entre BL en fermentation de jus de soja.

A. L'amélioration de la fermentation lactique du jus de soja

Les conditions de fermentations peuvent être modifiées afin de réduire les différents facteurs de stress :

Afin de réduire les stress nutritionnels, du sucre ou des acides aminés libres pourraient être ajoutés au jus de soja afin d'améliorer la vitesse de fermentation. Dans le contexte industriel, cela doit s'effectuer par une complémentation, d'un ingrédient perçu comme « naturel », i.e. peu transformé et connu des consommateurs. Les céréales comme le blé, le riz ou le maïs peuvent apporter des sucres et des acides aminés soufrés peu présents dans les légumineuses (Shewry, 2007). Par ailleurs, le jus de soja complète les apports de ces céréales qui sont pauvres en lysine. L'utilisation d'auxiliaire de procédé comme des enzymes immobilisées pourrait également être intéressante afin de soit dégrader les oligosaccharides, soit les protéines du jus de soja (Adhikari (Nee Pramanik), 2019). Afin d'augmenter la quantité de composés d'arômes, ces complémentations pourraient également permettre d'apporter des cétoacides accepteurs de groupements amines pour la transamination, qui est peut être limitée en jus de soja comme elle l'est en lait (Thierry et al., 2015)

En ce qui concerne la réduction du stress oxydant, la fermentation pourrait se faire avec un jus préalablement réduit, par exemple par bullage de CO₂, de N₂, par dégazage ou par une fermentation réalisée en atmosphère contrôlée. L'efficacité de ce procédé pourrait être testé via l'utilisation de fermenteurs. Le stress oxydant peut avoir divers effets. Il peut avoir un effet sur le métabolisme de modulation du potentiel d'oxydoréduction, sur le métabolisme carboné, sur le métabolisme de certains acides aminés et sur la synthèse de composés volatils comme pour *L. lactis* en lait (N. Larsen et al., 2016).

Des critères de sélection des souches peuvent sinon désormais s'ajouter à ceux utilisés au début de cette thèse :

En fermentation de jus de soja, le choix de souches pourrait désormais être réalisé a priori afin de répondre aux trois principaux facteurs de stress identifiés. C'est-à-dire qu'en plus d'identifier des souches capables d'acidifier à partir des différents sucres du jus de soja, il

serait nécessaire de les cribler selon leur activité protéolytique et leur capacité à produire des vitamines et des cofacteurs impliqués dans la modulation de l'Eh. Ces connaissances permettraient de développer des cocultures plus complexes.

Les ratios d'inoculation ou une inoculation séquentielle pourraient également être bénéfiques pour des BL (Garcia et al., 2019). Il serait dans notre cas intéressant de tester d'inoculer 10% de *Lp777* pour 90% de *Ld865* afin de limiter la dominance rapide de *Lp777* en fermentation de jus de soja comme c'est le cas en œnologie pour limiter la dominance de *S. cerevisiae* et laisser les souches sous dominantes s'exprimer (González-Royo et al., 2015).

Les diverses approches abordées dans cette thèse sont complémentaires. Les approches de complémentarités métaboliques pourraient être utilisées afin de développer des arômes désirés dans un aliment (Garrigues et al., 2013; McAuliffe et al., 2019). Chaque approche permet de révéler les différentes capacités métaboliques des BL, les différents stress provoqués en fermentation et donc d'envisager des complémentarités métaboliques qui pourraient conduire à des interactions positives en cocultures. Par exemple, si une souche de *L. casei* ne présente pas de gènes codant pour une thioredoxine réductase, ni pour un glutathion, cette souche perd la capacité à résister au stress oxydant (Serata et al., 2012). Ces souches ne croient alors plus en condition aérobie. Elles peuvent cependant croître si du glutathion est présent dans le milieu (Serata et al., 2012). On peut imaginer qu'une approche transcriptomique peut permettre de détecter si aucun gène codant pour de la thioredoxine ou du glutathion n'est exprimé. Par une approche métabolomique, l'absence de croissance ou d'acidification en condition aérobie et une croissance ou acidification en condition aérobie peuvent indiquer cette sensibilité au stress oxydant. L'association d'une telle souche avec une souche produisant du glutathion pourrait conduire ainsi à une interaction positive.

B. Comprendre les interactions entre BL en fermentation de jus de soja.

Des approches protéomiques permettraient sans doute d'identifier d'autres complémentarités métaboliques. Une communication cellule-cellule induite par *Lactobacillus sanfranciscencis* CB1 en réponse au stress induit en levain de panification a, par exemple, été observée par des approches protéomiques (Di Cagno et al., 2011). Des études en fermenteurs à double compartiments pourraient permettre d'identifier l'effet des contacts cellules-cellules dans la coopération comme développé pour l'étude de la fermentation œnologique (Renault et al., 2013; Tannenbaum and Kornfeld, 1975). La multiplication d'études avec d'autres souches pourrait permettre de développer des modèles prédictifs, des interactions positives qui pourraient avoir lieu en fermentation de jus de soja (Zomorodi and Segre, 2016). Divers outils et techniques se développent actuellement. Des méthodes à haut-débit (en cultures

miniatures), d'impression 3D, des approches de micro fluidiques (Hays et al., 2015; Nai and Meyer, 2018) ou encore de « phenomics » (Acin-Albiac et al., 2020) donnent de nouvelles perspectives d'études des cocultures. L'utilisation d'OGM en laboratoire peut faciliter un grand nombre d'études. Lors de mon stage de master à l'INRAE SPO de Montpellier, nous avons par exemple utilisé une souche de *S. cerevisiae* modifiée pour émettre de la GFP. Cela avait permis de différencier et de dénombrer deux populations de levures en coculture par cytométrie en flux (Olivier Harlé et al., 2020). Dans notre cas, modifier *Ld865* pour qu'elle puisse produire du glutathion peut par exemple permettre d'indiquer s'il s'agit d'un facteur limitant sa croissance en jus de soja.

Cette thèse a révélé divers facteurs influant sur la coopération entre BL en fermentation de jus de soja. Les limites à la compréhension complète de cette coopération sont la compréhension des régulations des métabolismes impliqués dans cette coopération. Par exemple, les connaissances qui concernent l'implication du potentiel d'oxydoréduction en fermentation sont encore peu étudiées (Hansen, 2018). Via les cofacteurs comme le NADPH, le potentiel d'oxydoréduction constitue un lien avec l'ensemble du réseau métabolique (Xu et al., 2018). Des biosenseurs, par exemple du ratio NADH/NAD⁺ peuvent être utilisés pour étudier les effets du potentiel d'oxydoréduction (Liu et al., 2019).

Il y a un flux toujours plus important de publications qui permet de mieux appréhender le fonctionnement et les régulations des métabolismes de BL (Stefanovic et al., 2017). Au fur et à mesure des découvertes, le front de science de l'étude et du développement d'aliments fermentés devient de plus en plus interdisciplinaire. Cette thèse ouvre des perspectives de recherche d'intérêt pour des applications « industrielles ». L'utilisation d'approches de métaheuristiques pourrait également permettre de mieux comprendre le métabolisme des BL, de mieux détecter les trous de connaissances et ainsi d'optimiser la recherche et les procédés de fermentation (Wari and Zhu, 2016; Yang, 2010).

ANNEXES

A. Caractéristiques des BL

Caractéristiques différenciant les espèces et sous espèces de BL des groupes A (espèces dont plus de 90% des souches sont obligatoirement homofermentaires), B (espèces dont plus de 90% des souches sont facultativement hétérofermentaires), C (espèces dont plus de 90% des souches sont obligatoirement hétérofermentaires) des genres *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Lactococcus*. Symboles et abréviations: +, plus de 90% des souches de l'espèce sont capable de métaboliser le substrat carboné ; -, moins de 10% des souches de l'espèce sont capables de métaboliser le substrat carboné ; d, 11 à 89% des souches de l'espèce sont capable de métaboliser le substrat carboné (Vos et al., 2009).

	A (obligately homofermentative)	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>indicus</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. amylolyticus</i>	<i>L. amylophilus</i>	<i>L. amylovorus</i>	<i>L. aviarius</i> subsp. <i>aviarius</i>	<i>L. aviarius</i> subsp. <i>araffinosus</i>	<i>L. crispatus</i>	<i>L. farciminis</i>	<i>L. gallinarum</i>	<i>L. gasserii</i>	<i>L. helveticus</i>	<i>L. iners</i>	<i>L. johnsonii</i>
Amygdalin	-	-	+	-	+	d	-	+	d	d	+	+	+	+	-	ND	+	
Cellobiose	-	d	d	-	+	-	-	+	+	d	+	+	+	+	-	ND	+	
Galactose	-	-	d	-	+	+	+	+	d	-	+	+	+	+	+	ND	+	
Lactose	-	+	+	+	+	-	-	-	d	-	+	+	d	d	+	-	d	
Maltose	d	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	d	d	+	
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Mannose	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	ND	+
Melibiose	-	-	-	-	d	d	-	-	d	-	-	-	+	d	-	-	d	
Raffinose	-	-	-	-	d	d	-	-	+	-	-	-	+	d	-	-	d	
Salicin	-	-	+	-	+	d	-	+	+	d	+	+	+	+	-	ND	+	
Sucrose	+	-	+	d	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Trehalose	d	-	+	-	d	-	-	+	+	+	-	+	-	d	d	-	d	

	B (facultatively heterofermentative)																	
	<i>L. hamsteri</i>	<i>L. homohiochii</i>	<i>L. intestinalis</i>	<i>L. jensenii</i>	<i>L. kimchii</i>	<i>L. murinus</i>	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	<i>L. paralimentarius</i>	<i>L. paraplantarum</i>	<i>L. pentosus</i>	<i>L. perolens</i>	<i>L. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	<i>L. plantarum</i> subsp. <i>argenteratensis</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. sakei</i> subsp. <i>sakei</i>	<i>L. sakei</i> subsp. <i>carnosus</i>	<i>L. versmoldensis</i>
Amygdalin	ND	-	-	+	+	d	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Arabinose	+	-	-	-	+	+	-	-	-	d	+	d	d	d	d	d	d	-
Cellobiose	+	d	d	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	d	d	-
Esculin	+	ND	-	+	+	+	+	-	+	+	ND	+	+	+	+	+	+	-
Gluconate	+	-	ND	-	+	-	+	w	-	+	+	+	+	+	+	+	+	ND
Mannitol	+	d	+	d	-	d	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
Melezitose	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	d	+	+	-	+	-	-	-
Melibiose	+	-	d	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Raffinose	+	-	d	-	-	+	-	-	-	d	+	+	+	+	-	-	-	-
Ribose	+	d	d	##	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	-	-	-	-	-	d	-	-	d	+	d	+	+	+	-	-	-
Sucrose	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Xylose	d	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	d	d	d	-	-	-	-

	Lactococcus species							
	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>L. lactis</i> subsp. <i>hordniae</i>	<i>L. garviae</i>	<i>L. piscium</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. raffinolactis</i>	
Galactose	+	+	-	+	+	-	+	
Lactose	+	+	-	+	+	-	+	
Maltose	+	-	-	√	+	+	+	
Melibiose	-	-	-	√	+	++	+	
Melizitose	-	-	-	-	+	+	√	
Raffinose	-	-	-	-	+	-	+	
Ribose	+	-	-	+	-	-	√	

	<i>Streptococcus species</i>												
	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. acidominimus</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. alactolyticus</i>	<i>S. anginosus</i>	<i>S. australis</i>	<i>S. canis</i>	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>pharyngis</i>	<i>S. criceti</i>	<i>S. cristatus</i>	<i>S. devriesei</i>	<i>S. didelphis</i>
N-Acetyl-glucosamine	+	ND	+	+	d	ND	+	+	+	+	+	-	ND
Adonitol	-	-	-	-	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	-	ND
Amygdalin	-	ND	-	d	+	ND	-	d	+	+	-	+	ND
Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arbutin	-	ND	-	d	+	ND	+	d	+	+	+	+	ND
Arabitol	-	-	-	-	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	-e	ND
Cellulose	d	ND	d	+	d	ND	ND	d	ND	+	ND	+	ND
Cyclodextrin	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	-	ND	-	ND
Dextran	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Dulcitol	-	-	-	-	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	d	ND
Erythritol	-	-	-	-	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	-	ND
Esculin	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND
Fructose	+	+	+	+	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	+	ND
Fucose	ND	-	ND	-	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	-	ND
Galactose	+	ND	+	+	ND	ND	+	ND	ND	+	d	+	ND
Gentiobiose	ND	ND	ND	d	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	+	ND
Gluconate	-	-	-	-	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	+	ND
2-Ketogluconate	ND	-	ND	-	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	-	ND
5-Ketogluconate	ND	-	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND
Glucose	+	+	+	+	+	ND	+	+	+	+	ND	+	ND
Glycerol	d	ND	+	d	-	ND	ND	-	-	-	ND	-	ND
Glycogen	d	-	-	-	-	-	-g	-	ND	-	ND	-	-
Inositol	ND	-	ND	-	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	-	ND
Inulin	ND	+	-	-	-	ND	-	-	-	+	-	d	-
Lactose	+	+	d	-	+	+	+	d	+	d	d	+	d
Lyxose	ND	-	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND
Maltose	+	ND	+	+	+	+	+	+	ND	+	+	+	ND
Mannose	ND	ND	ND	+	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	+	ND
Mannitol	-	+	-	dh	(dh	(-	-	-	-	+	-	+	-
Melibiose	-	ND	-	d	d	-	-	-	-	+	-	+	ND
Melezitose	-	ND	-	d	ND	-	-	ND	ND	-	-	-	ND
Methyl-D-mannoside	-	-	-	-	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	-	ND
Methyl-D-glucoside	+	-	+	d	+	-	d	d	ND	-	ND	+	ND
β-Methylxyloside	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	-	ND
Methyl-D-xyloside	-	-	d	-	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	-	ND
Pullulan	d	-	+	-	d	+	ND	-	ND	ND	d	-	ND
Raffinose	-	ND	-	+	d	-	-	-	-	+	-	+	d
Rhamnose	ND	-	ND	-	ND	ND	-	ND	ND	-	-	-	ND
Ribose	-	-	+	-	-	-	+	-	ND	-	-	-	+
Salicin	+	ND	d	d	+	ND	+	ND	ND	+	ND	+	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Sorbose	-	-	-	-	ND	ND	-	ND	ND	-	-	d	ND
Starch	ND	-	ND	d	ND	ND	+	ND	ND	-	ND	ND	d
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND	+	ND	+	ND
Tagatose	-	ND	d	-	-	-	-	-	ND	ND	-	+	ND
Trehalose	+	-	+	d	+	-	d	d	+	d	+	+	+
D-Turanose	ND	-	ND	d	ND	ND	-	ND	ND	ND	-	-	ND
Xylose	-	-	-	-	ND	ND	-	ND	ND	-	ND	-	ND
Xylitol	ND	-	ND	-	ND	ND	-	ND	ND	ND	-	-	ND

	<i>Streptococcus species</i>													
	<i>S. pluranimalium</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. porcinus</i>	<i>S. ratti</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>S. sanguinis</i>	<i>S. sinensis</i>	<i>S. sobrinus</i>	<i>S. suis</i>	<i>S. thermophilus</i>	<i>S. thoraltensis</i>	<i>S. uberis</i>	<i>S. urinalis</i>	<i>S. vestibularis</i>
N-Acetyl-glucosamine	d	d	+	+	+	+	ND	-	ND	-	+	+	-	d
Adonitol	-	ND	-	-	-	-	ND	-	ND	-	-	-	ND	-
Amygdalin	dd	-	d	+	+	d	ND	-	ND	-	d	+	ND	d
Arabinose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Arbutin	dd	-	d	+	+	d	ND	-	ND	d	+	+	ND	d
Arabitol	-	ND	-	ND	-	-	-	ND	-	-	-	-	-	-
Cellobiose	dd	ND	d	+	+	d	+	+	ND	-	+	+	ND	d
Cyclodextrin	-	-	-	ND	-	-	-	ND	-	-	-	ND	-	-
Dextran	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	ND	-	ND	-	-	-	ND	-
Erythritol	-	+	-	-	ND	ND	ND	-	ND	-	-	-	ND	ND
Esculin	ND	ND	ND	ND	+	d	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fructose	+	+	+	ND	+	+	ND	ND	ND	+	+	+	ND	+
Fucose	-	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	ND	-
Galactose	d	+	+	+	d	+	ND	d	ND	d	+	+	ND	+
Gentiobiose	dd	ND	d	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	+	+	ND	ND
Gluconate	-	ND	-	ND	-	-	ND	-	ND	-	-	-	ND	ND
2-Ketogluconate	-	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	ND	ND
5-Ketogluconate	-	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	ND	ND
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycerol	ND	+	d	-	-	-	ND	-	-	-	-	-	-	-
Glycogen	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	d	-	-
Inositol	-	ND	-	-	ND	ND	-	ND	ND	-	-	ND	-	-
Inulin	-	+	-	d	d	d	-	d	+	-	+	+	-	-
Lactose	d	+	d	d	d	+	+	d	+	+	+	+	+	d
Lyxose	-	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	ND	ND
Maltose	d	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Mannose	d	ND	+	+	+	+	+	+	ND	+	+	+	ND	+
Mannitol	dd, f	dh (d	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
Melibiose	d - h	(+)	-	d	-	d	-	-	dh (d	d	d	-	-	-
Melezitose	dd	ND	-	-	-	-	-	-	-	d	d	-	-	-
Methyl-D-mannoside	-	ND	-	-	ND	-	ND	-	ND	-	-	-	ND	ND
Methyl-D-glucoside	-	d	-	-	d	d	+	-	d	-	d	d	-	d
β-Methylxyloside	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND
Methyl-D-xyloside	-	ND	-	-	ND	-	ND	-	ND	-	-	-	ND	ND
Pullulan	-	ND	ND	-	+	d	+	-	d	-	+	ND	-	-
Raffinose	d	+	-	+	d	d	-	-	d	d	d	-	-	-
Rhamnose	-	ND	-	-	-	-	ND	-	ND	-	-	-	ND	ND
Ribose	dd	-	+	-	-	-	-	-	-	d	+	+	+	-
Salicin	d	d	d	+	+	+	+	-	+	-	+	+	ND	+
Sorbitol	dd, f	-	+	+	-	d	-	dh (-	-	-	dh (+	-	-	-
Sorbose	-	ND	-	-	-	-	ND	-	ND	ND	-	-	-	ND
Starch	-	d	d	-	-	d	+	-	ND	ND	+	d	ND	-
Sucrose	d	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tagatose	d	-	-	ND	-	-	-	+	-	-	d	d	-	-
Trehalose	+	+	(d)	+	d	+	+	+	+	-	+	+	+	d
D-Turanose	-	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	d	-	ND	ND
Xylose	-	+	-	-	-	-	ND	-	ND	-	d	-	ND	-
Xylitol	-	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	ND	ND

B. Diversité des jus de soja

Diversité de compositions des jus de soja de la littérature, des BL testées et des conditions de fermentations.

Références bibliographiques	Composition jus de soja (en g/L)	pH du jus de soja non fermenté	Conditions de fermentation: taux inoculation par LAB en UFC/mL ou % (v/v), temps en h et température de fermentation en °C	Nombre de LAB testées par espèces	Total
Zhao 2014	protéines 36	6,7	10 ⁶ , 24h, 37°C	1 S. thermophilus, 1 L. delbrueckii, 1 L. acidophilus, 1 L. paracasei	4
Yin 2014	protéines 10	7,2	10 ⁶ , 24h, 37°C	1 L. johnsonii	1
Farnworth 2007	saccharose 4,8; glucose 3,3; fructose 18; raffinose 0,2; stachyose 2,5; protéines 24; lipides 12	6,8	10 ⁵ , 12h, 37°C	1 S. thermophilus, 1 L. delbrueckii, 1 L. johnsonii, 1 L. acidophilus, 1 L. rhamnosus, 5 Bifidobacteria	10
Angeles et marth 1971	saccharose 14; raffinose 3; stachyose 11;	6,5	1%, 16h, 30/45°C	1 S. thermophilus, 3 L. lactis, 1L. Mesenteroides, 1 L. citrovorum, 1 P. cerevisiae, 1 L. casei, 1 L. helveticus, 1 L. pentosus, 1 L. brevis, 1 L. fermenti	12
Scalabrini 1998	saccharose 20; raffinose 5; stachyose 5; protéines 36; lipides 21	7	5%, 48h/12h, 37°C	6 B. breve, 3 B. infantis, 4 B. bifidum, 1 B. adolescentis, 13 B. longum	27
Hou 2000	saccharose 4,9; glucose-galactose 0,1; fructose 0,1; raffinose 0,7; stachyose 3,9	ND	1%, 48h, 37°C	1 B. longum, 1 B. infantis	2
Bao 2012	saccharose 2,1; glucose-galactos 0,2; fructose 0,1 raffinose 0,7; stachyose 4,0	6,6	10 ⁷ , 24h/3h, 42°C	6 L. plantarum	12
granata 1996	sucre 22 ; protéines 34/75; lipides 15/23	ND	10 ⁷ , 8h, 40°C	1 S. thermophilus, 1 L. delbrueckii	
Chien 2006	saccharose 2,1; glucose-galactos 0,2; fructose 0,1 raffinose 0,7; stachyose 4,0	6,5	0.1%/10 ⁴ , 24h-32h, 37°C	1 S. thermophilus, 1L. Acidophilus, 1 B. infantis, 1 B. longum	4
wang 2002	saccharose 2,1; glucose-galactos 0,2; fructose 0,1 raffinose 0,7; stachyose 4,0	6,5	0.1%/10 ⁴ , 48h, 5/25/37°C	1 S. thermophilus, 1L. Acidophilus, 1 B. infantis, 1 B. longum, 1 L. bulgaricus	5
Wang 2003	saccharose 2,1; glucose-galactos 0,2; fructose 0,1 raffinose 0,7; stachyose 4,0	6,5	0.1%/10 ⁴ , 24h-32h, 37°C	1 S. thermophilus, 1L. Acidophilus, 1 B. infantis, 1 B. longum	4
Wang 2012	saccharose 5,4; glucose 15; raffinose 0,8; stachyose 3,5	6,4	10 ⁷ , 2-16h, 37°C	1 L. casei	1
Murti 1993	ND	6,5	5%, 2-16h, 39-42°C	1 S. thermophilus, 1 L. delbrueckii, 1 Bifidobacterium	3
Santos 2014	saccharose 12,2; fructose 1,3; raffinose 0,8; stachyose 5,5; protéines 43	6,6	10 ⁷ , 36h, 37°C	1 L. rhamnosus, 1 L. acidophilus, 1 L. delbrueckii, 1 P. acidilactici	4
Rui 2019	ND	6,3	3%, 48h, 37°C	1 L. plantarum	1
Leblanc 2004	ND	7,2	2%, 16h, 37°C	1 L. fermentum	1
Albuquerque 2017	sucre totaux 15; protéines 31; lipides 17	8,2	10 ⁵ , 24h, 37°C	3 S. thermophilus, 1 L. acidophilus, 1 L. rhamnosus, 1 L. fermentum and 1 L. reuteri	7
Marazza 2009	saccharose 23; raffinose 5; stachyose 13	6,4	10 ⁷ , 24h, 37°C	1 L. rhamnosus	1
Fakri 2016	glucides 89; proteines 51; lipides 23	6,7	5%, 48h, 37°C	3 L. plantarum, 5 P. pentosaceus, 2 P. acidilactici, 2 L. fermentum	12
Ewe 2009	saccharose 0,09; glucose 0,32; fructose 0,12; raffinose 0,13; stachyose 2,01	6,3	5%, 24h, 37°C	6 L. acidophilus, 3 L. delbrueckii, 1 L. gasserii	10
Yamamoto 2019	sucre totaux 20; protéines 50; lipides 30	7	2% 24h, 37°C	2 L. gasserii, 6 L. sakei, 2 L. curvatus, 1 L. paracasei, 2 L. mesenteroides, 3 L. plantarum, 6 P. pentosaceus, 4 L. reuteri	26
Zhu 2020	sucre totaux 5,9; protéines 12,4; lipides 2,6	7,2	10 ⁷ , 32h, 37°C	1 L. plantarum and 1 L. fermentum	2
Omogbai 2005	glucides 21; stachyose 0,3; protéines 32; lipides 18	6,4	5%, 36h, 44°C	1 L. bulgaricus, 1 S. thermophilus	2
Matejcekova 2018	soya mash; saccharose 20 g/L; raffinose and stachyose 4,8 g/L	6,2	10 ⁶ , 8h, 37°C	1 L. plantarum, 2 L. lactis, 1 S. thermophilus	4
Park 2020	soy bean; saccharose 19,3; glucose 0,7; fructose 0,7 (concentration relative)	ND	5*10 ⁶ , 30h, 30°C	1 L. fermentum, 1 L. plantarum	2
Kamaly 1997	glucose 20; cysteine 0,5	7	10 ⁶ , 24h, 37°C	1 B. longum, 1 B. bifidum	2
Sebastian 2018	ND	6,7	1%, 20h, 37°C	1 S. thermophilus and 1 L. delbrueckii	2
Delgado et al 2019	sucre totaux 27-25; protéines 31-30; lipides 17-18	6,4 - 7,2	10 ⁷ , 72h, 37°C	2 L. casei, 2 L. plantarum, 2 L. rhamnosus, 1 L. murinus, 1 L. ruminis and 2 B. pseudocatenulatum	10
Patrignani 2018	sucre totaux 21; protéines 30; lipides 44	6,4	0,1%, 14h, 37°C	7 B. aesculapii, 1 B. longum, 1 B. sanguini	9
Cui 2020	protéines 33,3	6,8	10 ⁷ , 12h, 30°C	1 S. thermophilus, 1 L. bulgaricus, 1 B. animalis, 1 L. acidophilus and 1 L. rhamnosus	5
Sertovic 2020	ND	ND	ND	1 S. thermophilus, 1 L. delbrueckii and 1 L. acidophilus	3
Battistini 2017	raffinose 0,4; stachyose 0,6; protéines 23; lipides 13	ND	10 ⁷ , 4h, 37°C	1 L. acidophilus, 1 B. animalis, 1 S. thermophilus	3

Références bibliographiques	Composition jus de soja (en g/L)	pH du jus de soja non fermenté	Conditions de fermentation: taux inoculation par LAB en UFC/mL ou % (v/v), temps en h et température de fermentation en °C	Nombre de LAB testées par espèces	Total
Singh et Vij 2017	saccharose 0,26; raffinose 0,13; stachyose 0,35; protéines 4,4; lipides 2,1	6,8	1%; 24h/6h; 37°C	1 L. plantarum	1
Singh et Vij 2018	saccharose 0,26; raffinose 0,13; stachyose 0,35; protéines 4,4; lipides 2,2	7	1%; 24h/6h; 37°C	4 L. rhamnosus, 1 L. helveticus, 1 L. plantarum	6
Mital et Steinkraus 1975	saccharose 4,8; raffinose 0,7; stachyose 3,9; protéines 98; lipides 22	6,5	1%; 18h; 30-37°C	1 S. thermophilus, 1 L. plantarum, 1 L. cellobiosis, 1 L. fermentii	4
Garro 1998	saccharose 28; raffinose 0; stachyose 7; protéines 30; lipides 25	6,9	10 ⁷ ; 24h/2h, 37°C	1 S.thermophilus, 1 L. casei, 1 L. fermentum	3
Garro 2004	saccharose 28; raffinose 0; stachyose 7; protéines 30; lipides 26	6,9	10 ⁷ ; 24h/2h, 37°C	1 B. longum, 1 L. fermentum	2
Yoon et Hwang 2008	saccharose 5,1; raffinose 2,4; stachyose 4,2	6	2 %, 48h/6h, 37°C	1 L. curvatus; 1 L. mesenteroides	2
Chumchuere 1999	saccharose 22,6; raffinose 4,9; stachyose 8,5; protéines 59; lipides 11	6,5	1%, 24h, 37 °C	1 S.thermophilus, 1 L. delbrueckii, 1 L. fermentii, 1 L. fermentum	4
Chen et al 2011	saccharose 6,5; raffinose 1,2; stachyose 4,0	6,8	10 ⁴ , 48 h, 37°C	1 L. paracasei, 1 B. longum	2
Hati 2015	saccharose 3,6; raffinose 1,5; stachyose 1,9	ND	10 ⁵ , 24h/12h, 37°C	4 L. rhamnosus, 2 L. casei	6
Hati 2014	saccharose 3,6; raffinose 1,5; stachyose 1,9	ND	10 ⁵ , 24h/12h, 37°C	4 L. rhamnosus, 2 L. casei	6
Hati 2020	ND	6,5	1-4%, 18h, 30-42°C	1 S. thermophilus and 1 L. bulgaricus	2
Donkor 2007	saccharose 2,0; raffinose 0,03; stachyose 0,14	7,1	1%, 48h , 42°C	1 S. thermophilus, 1 L. delbrueckii, 1 B. lactis, 2 L. acidophilus, 2 L. casei	7
Donkor 2007	saccharose 2,0; raffinose 0,03; stachyose 0,14	7,1	10 ⁷ , 48h , 42°C	1 S. thermophilus, 1 L. delbrueckii, 1 B. animalis, 1 L. acidophilus, 1 L. casei	5
Donkor 2005	saccharose 2,0; raffinose 0,03; stachyose 0,14	7,1	1%, 9h, 42°C	1 S. thermophilus, 1 L. delbrueckii, 1 B. lactis, 1 L. acidophilus, 1 L. casei	5
Liu 2000	ND	ND	10 ⁶ , 32h, 20°C	LAB from Kefir grain	
Blagden 2005	ND	6,4	10 ⁷ , 12h, 37°C	2 L. acidophilus, 2 L. casei, 3 S. thermophilus, 1 L. delbrueckii	8
Iancu 2010	sucres 5, protéines 18, lipides 15	ND	10 ⁶ , 24h, 37°C	1 L. plantarum, 1 L. brevis, 1 L. johnsonii, 1 L. delbrueckii	4
Li 2018	ND	ND	10 ⁵ , 12h, 37°C	1 L. plantarum, 1 L. delbrueckii	2
Li 2014	saccharose 2,1; glucose-galactos 0,2; fructose 0,1 raffinose 0,7; stachyose 4,0	6,5	10 ⁶ , 12h, 37°C	1 L. plantarum, 1 L. rhamnosus	2
Wang 2006	saccharose 2,1; glucose-galactos 0,2; fructose 0,1 raffinose 0,7; stachyose 4,0	6,5	0.1%/10 ⁴ , 24h-32h, 37°C	1 L. acidophilus, 1 S. thermophilus, 1 B. infantis, 1 B. longum	4
Pyo et al 2005	sucres 4,6; protéines 40; lipides 20	6,6	10 ⁵ , 48h/24h, 37°C	1 L. plantarum, 1 L. delbrueckii, 1 B. breve, 1 B. thermophilum	4
Cruz 2009	sucres 8, protéines 36; lipides 20	7	10 ⁶ , 5h, 45°C	1 L. delbrueckii, 1 S. thermophilus	2
Shelif 1988	saccharose 12/10; protéines 19/33; lipides 12/18	6,6	10 ⁶ , 8h, 43°C	1 L. acidophilus, 1 S. thermophilus, 1 L. delbrueckii	
Kim 1999	saccharose 4,3; glucose 0,6; fructose 0,6; raffinose 1,1; stachyose 3,5	7,2	0,5%, 12h, 37°C	1 L. acidophilus, 1 S.thermophilus	2
Cheng 1988	saccharose 5,0; raffinose 1,1; stachyose 3,8	ND	2%, 18h, 30/45°C	1 S.thermophilus, 1 L. casei, 1 L. delbrueckii, 1 L. mesenteroides	4
Cheng 1990	saccharose 5,0; raffinose 1,1; stachyose 3,8	ND	2%, 18h, 30/45°C	1 S.thermophilus, 1 L. casei	2
Kaneko 2014	saccharose 4,2; protéines 33; lipides 21	ND	10 ⁶ , 16h, 37°C	1 L. delbrueckii, 2 S. thermophilus	3
Chang 1990	glucides 26/38; protéines 32/49	6,5	2%, 16h, 37°C	1 L. fermentum, 2 L. acidophilus	3
Wu 2012	saccharose 6,8; raffinose 3,6; stachyose 4,5	6,5	10 ⁶ , 16h, 33°C	1 B. adoescentis, 1 P. freudenreichii	2
Karki 2014	ND	5,5	10 ⁶ , 24h, 37°C	1 L. rhamnosus	1
Sumarna 2008	saccharose 21; raffinose 0,6; stachyose 0,4; protéines 36; lipides 13	6,4	1%, 48h/6h, 41°C	2 L. rhamnosus, 2 L. plantarum, 1 S. thermophilus, 1 L. delbrueckii, 1 L. pentosus	7
Champagne 2009	saccharose 9; glucose 1; fructose 1; raffinose 2; stachyose 9; protéines 29	6,5	10 ⁷ , 24h, 37°C	1 S.thermophilus, 1 L. helveticus, 1 B. longum, 1 L. delbrueckii	4
Dujmic 2017	ND	6,5	10 ⁶ , 8h, 37°C	1 L. plantarum, 1 S. thermophilus, 1 L. lactis	3
Rekha 2010	ND	6,6	10 ⁶ , 24h, 37°C	1 L. acidophilus, 1 L. delbrueckii, 1 L. casei, 1 L. plantarum, 1 L. fermentum	5
Pinthong 1980	ND	ND	1%, 16h, 37/43°C	1 S. thermophilus, 1 L. delbrueckii	2
Wang 1974	ND	6,7	2%, 24h, 37°C	8 L. acidophilus, 4 L. delbrueckii	12
Tsuda 2017	sucres 20 ; protéines 47	ND	1%, 48 h, 30°C	1 S. thermophilus, 8 L. plantarum, 1 L. casei, 1 L. farciminis, 1 L. buchneri, 6 P. parvulus, 3 P. ethanolidurans, 3 L. coryniformis, 1 L. alimentarius, 1 L. curvatus, 6 L. sakei	32
Chun 2007	ND	6,4	10 ⁶ , 12h, 37°C	1 L. paraplantarum, 1 E. durans, 1 S. thermophilus, 1 W. confusa	4
Matsumaya, 1992	saccharose 6,2; fructose 0,3; raffinose 0,8; stachyose 4,3; protéines 41; lipides 12	7	10 ⁶ , 24h, 37°C	1 S. thermophilus, 1 L. delbrueckii, 1 L. acidophilus, 1 B. breve, 1 B. infantis, 1 B. bifidum, 1 B. Longum, 1 B. adolescentis	7
Zhao 2014	protéines 36	6,7	10 ⁶ , 24h, 37°C	1 L. acidophilus, 1 L. paracasei, 1 L. zeae, 1 L. rhamnosus	4

C. Grille d'analyse sensorielle

Grille d'analyses sensorielles des essais de jus de soja fermenté.

Dégustateur : Date Evaluation : Objectifs : Ordre de dégustation :

	Essai Lab 1 : Age / DLC :	Essai Lab 2 : Age / DLC :	Essai Lab 3 : Age / DLC :	Essai Lab 4 : Age / DLC :
Odeurs	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> NC <input type="checkbox"/> Autres :	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> NC <input type="checkbox"/> Autres :	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> NC <input type="checkbox"/> Autres :	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> NC <input type="checkbox"/> Autres :
Texture	0-1-2-3-4-5 Epais <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Autres :	0-1-2-3-4-5 Epais <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Autres :	0-1-2-3-4-5 Epais <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Autres :	0-1-2-3-4-5 Epais <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Autres :
Sensation	0-1-2-3-4-5 Astringence <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Autres :	0-1-2-3-4-5 Astringence <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Autres :	0-1-2-3-4-5 Astringence <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Autres :	0-1-2-3-4-5 Astringence <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Autres :
Arômes	0-1-2-3-4-5 Aigre <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Vert <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Autres :	0-1-2-3-4-5 Aigre <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Vert <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Autres :	0-1-2-3-4-5 Aigre <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Vert <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Autres :	0-1-2-3-4-5 Aigre <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Vert <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Autres :
NOTE /9	.../9	.../9	.../9	.../9

D. Performances du panel d'analyses sensoriels

Résultats des tests statistiques de l'analyse *panlperf* du package *SensoMineR*. Les lignes correspondent aux différents descripteurs : tEp correspond à l'appréciation de l'épaisseur de la texture, sAigre à la saveur aigre, Note correspond à la note d'appréciation globale du produit, gAstr au goût astringent et sVert à la saveur « verte » du produit. Les colonnes correspondent aux différents facteurs qui peuvent influencer les notes. En rouge, cela signifie que le descripteur permet significativement de différencier le facteur selon le descripteur correspondant (avec un risque $\alpha < 0.05$).

p.value<0.05	Essai	Juge	seance	Essai:Juge
tEp	1.83E-04	4.67E-05	0.11	0.99
sAigre	2.50E-04	2.50E-04	0.82	0.96
Note	4.39E-04	2.27E-03	0.71	0.66
gAstr	6.46E-04	2.42E-03	0.58	0.91
sVert	6.08E-03	2.94E-05	0.60	0.84

E. Métabolisme de *Lp777* et *Ld865* : galeries API® 50 CH

Résultats de la galerie API® 50 CH de *Lp777* et *Ld865* réalisé à 30 et 43°C, respectivement. Les capacités fermentaires de ces deux souches à cataboliser les différentes sources de carbones sont marquées par le signe '+' lorsque le résultat du test est positif et par le signe '-' lorsque le résultat du test est négatif.

Ref. CIRM-BIA	CIRM-BIA865	CIRM-BIA777		CIRM-BIA865	CIRM-BIA777
Taxon	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>		<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
Biotope d'origine	Plante	Fromage		Plante	Fromage
API - amidon	-	-	API - dulcitol	-	-
API - amygdaline	+	+	API - D-xylose	-	-
API - arbutine	+	+	API - erythritol	-	-
API - D-adonitol	-	-	API - esculine citrate de fer	+	+
API - D-arabinose	-	-	API - gentiobiose	+	+
API - D-arabitol	-	+	API - glycérol	-	-, +
API - D-celiobiose	+	+	API - glycogène	-	-
API - D-fructose	+	+	API - inositol	-	-
API - D-fucose	-	-	API - inuline	-	-
API - D-galactose	-	+	API - L-arabinose	-	-
API - D-glucose	+	+	API - L-arabitol	-	-
API - D-lactose	-	+	API - L-fucose	-	-
API - D-lyxose	-	-	API - L-rhamnose	-	-, +
API - D-maltose	+	+	API - L-sorbose	-	-
API - D-mannitol	-	+	API - L-xylose	-	-
API - D-mannose	+	+	API - méthyl- α D-glucopyranoside	-	-
API - D-mélézitose	-	+	API - méthyl- α D-mannopyranoside	-	+
API - D-melibiose	-	+	API - méthyl- β D-xylopyranoside	-	-
API - D-raffinose	-	+	API - N-acétyl-glucosamine	+	+
API - D-ribose	-	-, +	API - potassium gluconate	-	-
API - D-saccharose	+	+	API - potassium-2-cétogluconate	-	-
API - D-sorbitol	-	-	API - potassium-5-cétogluconate	-	-
API - D-tagatose	-	-	API - salicine	+	+
API - D-trehalose	+	+	API - xylitol	-	-
API - D-turanose	-	+			

Bibliographie

- Abraham, S., Cachon, R., Jeanson, S., Ebel, B., Michelon, D., Aubert, C., Rojas, C., Feron, G., Beuquier, E., Gervais, P., De Coninck, J., 2013. A procedure for reproducible measurement of redox potential (E_h) in dairy processes. *Dairy Sci. & Technol.* 93, 675–690. <https://doi.org/10.1007/s13594-013-0134-5>
- Achilleos, C., Berthier, F., 2017. Evaluation of qPCR and plate counting for quantifying thermophilic starters in cheese. *Food Microbiology* 65, 149–159. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.01.024>
- Acin-Albiac, M., Filannino, P., Gobbetti, M., Di Cagno, R., 2020. Microbial high throughput phenomics: The potential of an irreplaceable omics. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 18, 2290–2299. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.08.010>
- Adhikari (Nee Pramanik), S., 2019. Chapter 41 - Application of Immobilized Enzymes in the Food Industry, in: Kuddus, M. (Ed.), *Enzymes in Food Biotechnology*. Academic Press, pp. 711–721. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00041-4>
- Aguirre, L., Garro, M.S., Savoy de Giori, G., 2008. Enzymatic hydrolysis of soybean protein using lactic acid bacteria. *Food Chemistry* 111, 976–982. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.018>
- Aguirre, L., Hebert, E.M., Garro, M.S., Savoy de Giori, G., 2014. Proteolytic activity of *Lactobacillus* strains on soybean proteins. *LWT - Food Science and Technology* 59, 780–785. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.061>
- Albuquerque, M.A.C., Bedani, R., LeBlanc, J.G., Saad, S.M.I., 2017. Passion fruit by-product and fructooligosaccharides stimulate the growth and folate production by starter and probiotic cultures in fermented soymilk. *International Journal of Food Microbiology* 261, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.09.001>
- Al-Madboly, L.A., Ali, S.M., Fakharany, E.M.E., Ragab, A.E., Khedr, E.G., Elokely, K.M., 2020. Stress-Based Production, and Characterization of Glutathione Peroxidase and Glutathione S-Transferase Enzymes From *Lactobacillus plantarum*. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00078>
- Alwazeer, D., 2020. Importance of consideration of oxidoreduction potential as a critical quality parameter in food industries. *Food Research International* 132, 109108. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109108>
- Alwazeer, D., Bulut, M., Tunçtürk, Y., 2020. Fortification of milk with plant extracts modifies the acidification and reducing capacities of yoghurt bacteria. *International Journal of Dairy Technology* 73, 117–125. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12643>
- Anders, S., Pyl, P.T., Huber, W., 2015. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31, 166–169. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>
- Andersson, U., Molenaar, D., Rådström, P., M de Vos, W., 2005. Unity in organisation and regulation of catabolic operons in *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* and *Listeria monocytogenes*. *Systematic and Applied Microbiology* 28, 187–195. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2004.11.004>
- Andreevskaya, M., Jääskeläinen, E., Johansson, P., Ylinen, A., Paulin, L., Björkroth, J., Auvinen, P., 2018. Food Spoilage-Associated *Leuconostoc*, *Lactococcus*, and *Lactobacillus* Species Display Different Survival Strategies in Response to Competition. *Appl. Environ. Microbiol.* 84. <https://doi.org/10.1128/AEM.00554-18>
- Aryana, K.J., Olson, D.W., 2017. A 100-Year Review: Yogurt and other cultured dairy products. *Journal of Dairy Science* 100, 9987–10013. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12981>
- Ayad, E.H.E., Verheul, A., Engels, W.J.M., Wouters, J.T.M., Smit, G., 2001. Enhanced flavour formation by combination of selected lactococci from industrial and artisanal origin with focus on completion of a metabolic pathway. *Journal of Applied Microbiology* 90, 59–67. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01219.x>
- Barbieri, F., Montanari, C., Gardini, F., Tabanelli, G., 2019. Biogenic Amine Production by Lactic Acid Bacteria: A Review. *Foods* 8, 17. <https://doi.org/10.3390/foods8010017>
- Baron, F., Cochet, M.-F., Ablain, W., Grosset, N., Madec, M.-N., Gonnet, F., Jan, S., Gautier, M., 2006. Rapid and cost-effective method for micro-organism enumeration based on miniaturization of the conventional plate-counting technique. *Lait* 86, 251–257. <https://doi.org/10.1051/lait:2006005>

- Baú, T.R., Garcia, S., Ida, E.I., 2015. Changes in soymilk during fermentation with kefir culture: oligosaccharides hydrolysis and isoflavone aglycone production. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 66, 845–850. <https://doi.org/10.3109/09637486.2015.1095861>
- Benjamini, Y., Hochberg, Y., 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)* 57, 289–300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>
- Benozzi, E., Romano, A., Capozzi, V., Makhoul, S., Cappellin, L., Khomenko, I., Aprea, E., Scampicchio, M., Spano, G., Märk, T.D., Gasperi, F., Biasioli, F., 2015. Monitoring of lactic fermentation driven by different starter cultures via direct injection mass spectrometric analysis of flavour-related volatile compounds. *Food Research International* 76, 682–688. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.043>
- Bertsch, A., Roy, D., LaPointe, G., 2019. Enhanced Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus rhamnosus* in Co-Culture with *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Sciences* 9, 4026. <https://doi.org/10.3390/app9194026>
- Bhatia, S., Singh, A., Batra, N., Singh, J., 2020. Microbial production and biotechnological applications of α -galactosidase. *International journal of biological macromolecules* 150, 1294–1313.
- Billot-Klein, D., Legrand, R., Schoot, B., Heijenoort, J. van, Gutmann, L., 1997. Peptidoglycan structure of *Lactobacillus casei*, a species highly resistant to glycopeptide antibiotics. *Journal of Bacteriology* 179, 6208–6212. <https://doi.org/10.1128/jb.179.19.6208-6212.1997>
- Biscola, V., de Olmos, A.R., Choiset, Y., Rabesona, H., Garro, M. s., Mozzi, F., Chobert, J.-M., Drouet, M., Haertlé, T., Franco, B. d. g. m., 2017. Soymilk fermentation by *Enterococcus faecalis* VB43 leads to reduction in the immunoreactivity of allergenic proteins β -conglycinin (7S) and glycinin (11S). *Beneficial Microbes* 8, 635–643. <https://doi.org/10.3920/BM2016.0171>
- Blagden, T.D., Gilliland, S.E., 2005. Reduction of Levels of Volatile Components Associated with the “Beany” Flavor in Soymilk by *Lactobacilli* and *Streptococci*. *Journal of Food Science* 70, M186–M189. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb07148.x>
- Bogachev, A.V., Bertsova, Y.V., Bloch, D.A., Verkhovskiy, M.I., 2012. Urocanate reductase: identification of a novel anaerobic respiratory pathway in *Shewanella oneidensis* MR-1. *Molecular Microbiology* 86, 1452–1463. <https://doi.org/10.1111/mmi.12067>
- Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarme, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D., Sorokin, A., 2001. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome research* 11, 731–753.
- Botma, I.J., 2018. *Lactobacillus plantarum* : amino acid utilization (Thesis). Stellenbosch : Stellenbosch University.
- Boucher, B., Brothersen, C., Broadbent, J., 2006. Influence of starter and nonstarter lactic acid bacteria on medium redox. *Australian journal of dairy technology* 61, 116.
- Boulay, M., Al Haddad, M., Rul, F., 2020. *Streptococcus thermophilus* growth in soya milk: Sucrose consumption, nitrogen metabolism, soya protein hydrolysis and role of the cell-wall protease PrtS. *International Journal of Food Microbiology* 335, 108903. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108903>
- Boumerdassi, H., Desmazeaud, M., Monnet, C., Boquien, C.Y., Corrieu, G., 1996. Improvement of Diacetyl Production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CNRZ 483 Through Oxygen Control. *Journal of Dairy Science* 79, 775–781. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76425-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76425-1)
- Brasca, M., Morandi, S., Lodi, R., Tamburini, A., 2007. Redox potential to discriminate among species of lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 103, 1516–1524. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03392.x>
- Bren, A., Eisenbach, M., 2000. How Signals Are Heard during Bacterial Chemotaxis: Protein-Protein Interactions in Sensory Signal Propagation. *Journal of Bacteriology* 182, 6865–6873. <https://doi.org/10.1128/JB.182.24.6865-6873.2000>
- Brenner, K., You, L., Arnold, F.H., 2008. Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. *Trends in Biotechnology* 26, 483–489. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.05.004>
- Cachon, R., Jeanson, S., Aldarf, M., Divies, C., 2002. Characterisation of lactic starters based on acidification and reduction activities. *Lait* 82, 281–288. <https://doi.org/10.1051/lait:2002010>
- Calderini, E., Celebioglu, H.U., Villarroel, J., Jacobsen, S., Svensson, B., Pessione, E., 2017. Comparative proteomics of oxidative stress response of *Lactobacillus acidophilus* NCFM reveals effects on DNA repair and cysteine de novo synthesis. *PROTEOMICS* 17, 1600178. <https://doi.org/10.1002/pmic.201600178>
- Canon, F., Mariadassou, M., Maillard, M.-B., Falentin, H., Parayre, S., Madec, M.-N., Valence, F., Henry, G., Laroute, V., Daveran-Mingot, M.-L., Coccagn-Bousquet, M., Thierry, A., Gagnaire, V., 2020a.

- Function-Driven Design of Lactic Acid Bacteria Co-cultures to Produce New Fermented Food Associating Milk and Lupin. *Front. Microbiol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.584163>
- Canon, F., Mariadassou, M., Maillard, M.-B., Falentin, H., Parayre, S., Madec, M.-N., Valence, F., Henry, G., Laroute, V., Daveran-Mingot, M.-L., Coccagn-Bousquet, M., Thierry, A., Gagnaire, V., 2020b. Function-Driven Design of Lactic Acid Bacteria Co-cultures to Produce New Fermented Food Associating Milk and Lupin. *Front. Microbiol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.584163>
- Canon, F., Neiers, F., Guichard, E., 2018. Saliva and Flavor Perception: Perspectives. *J. Agric. Food Chem.* 66, 7873–7879. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01998>
- Canon, F., Nidelet, T., Guédon, E., Thierry, A., Gagnaire, V., 2020c. Understanding the mechanisms of positive microbial interactions that benefit lactic acid bacteria co-cultures. *Frontiers in Microbiology* 11.
- Cappello, M.S., Zapparoli, G., Logrieco, A., Bartowsky, E.J., 2017. Linking wine lactic acid bacteria diversity with wine aroma and flavour. *International Journal of Food Microbiology* 243, 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.025>
- Carević, M., Banjanac, K., Corović, M., Jakovetić, S., Milivojević, A., Vukašinić-Sekulić, M., Bezbradica, D., 2016. Selection of lactic acid bacteria strain for simultaneous production of α - and β -galactosidases. *Zaštita materijala* 57, 265–273. <https://doi.org/10.5937/ZasMat1602265c>
- Caspi, R., Billington, R., Fulcher, C.A., Keseler, I.M., Kothari, A., Krummenacker, M., Latendresse, M., Midford, P.E., Ong, Q., Ong, W.K., Paley, S., Subhraveti, P., Karp, P.D., 2018. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes. *Nucleic Acids Res* 46, D633–D639. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx935>
- Cayron, J., Dedieu, A., Lesterlin, C., 2020. Bacterial filament division dynamics allows rapid post-stress cell proliferation. *bioRxiv* 2020.03.16.993345. <https://doi.org/10.1101/2020.03.16.993345>
- Chaix, E., Deléger, L., Bossy, R., Nédellec, C., 2019. Text mining tools for extracting information about microbial biodiversity in food. *Food Microbiology, Microbial Spoilers in Food 2017 Symposium* 81, 63–75. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.04.011>
- Champagne, C.P., Green-Johnson, J., Raymond, Y., Barrette, J., Buckley, N., 2009. Selection of probiotic bacteria for the fermentation of a soy beverage in combination with *Streptococcus thermophilus*. *Food Research International* 42, 612–621. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.12.018>
- Champagne, C.P., Tompkins, T.A., Buckley, N.D., Green-Johnson, J.M., 2010. Effect of fermentation by pure and mixed cultures of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus helveticus* on isoflavone and B-vitamin content of a fermented soy beverage. *Food Microbiology* 27, 968–972. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.06.003>
- Champomier-Vergès, M.-C., Zagorec, M., Fadda, S., 2010. Proteomics: a tool for understanding lactic acid bacteria adaptation to stressful environments. *Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications*. Edited by F. Mozzi, RR Raya, and GM Vignolo. Wiley-Blackwell, Oxford, UK 57–72.
- Chapot-Chartier, M.-P., Kulakauskas, S., 2014. Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microb Cell Fact* 13, S9. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S9>
- Chien, H.-L., Huang, H.-Y., Chou, C.-C., 2006. Transformation of isoflavone phytoestrogens during the fermentation of soymilk with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology* 23, 772–778. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.01.002>
- CIQUAL, 2017. Ciqual Table de composition nutritionnelle des aliments [WWW Document]. URL <https://ciqual.anses.fr/#/aliments/20901/soja-graine-entiere> (accessed 3.2.20).
- Colombet, Z., Allès, B., Si Hassen, W., Lampuré, A., Kesse-Guyot, E., Péneau, S., Hercberg, S., Méjean, C., 2019. Individual characteristics associated with changes in the contribution of plant foods to dietary intake in a French prospective cohort. *Eur J Nutr* 58, 1991–2002. <https://doi.org/10.1007/s00394-018-1752-8>
- Comasio, A., Harth, H., Weckx, S., De Vuyst, L., 2019. The addition of citrate stimulates the production of acetoin and diacetyl by a citrate-positive *Lactobacillus crustorum* strain during wheat sourdough fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 289, 88–105. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.030>
- Corbo, M.R., Bevilacqua, A., Speranza, B., Gallo, M., Campaniello, D., Sinigaglia, M., 2017. Selection of wild lactic acid bacteria for sausages: Design of a selection protocol combining statistic tools, technological and functional properties. *LWT - Food Science and Technology* 81, 144–152. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.051>
- Courtin, P., Rul, F., 2004. Article. *Lait* 84, 125–134. <https://doi.org/10.1051/lait:2003031>
- Davin, A., Berot, S., 1996. Technologie de préparation de produits enrichis en protéines végétales destinés aux consommateurs. *Protéines Végétales* 389–390.

- De Angelis, M., Gobbetti, M., 2011. Stress Responses of Lactobacilli, in: Tsakalidou, E., Papadimitriou, K. (Eds.), *Stress Responses of Lactic Acid Bacteria*, Food Microbiology and Food Safety. Springer US, Boston, MA, pp. 219–249. https://doi.org/10.1007/978-0-387-92771-8_11
- de Gavelle, E., Davidenko, O., Fouillet, H., Delarue, J., Darcel, N., Huneau, J.-F., Mariotti, F., 2019. Self-declared attitudes and beliefs regarding protein sources are a good prediction of the degree of transition to a low-meat diet in France. *Appetite* 142, 104345. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2019.104345>
- de Oliveira, S.C., Deglaire, A., Ménard, O., Bellanger, A., Rousseau, F., Henry, G., Dirson, E., Carrière, F., Dupont, D., Bourlieu, C., 2016. Holder pasteurization impacts the proteolysis, lipolysis and disintegration of human milk under in vitro dynamic term newborn digestion. *Food Research International*, The 4th International Conference on Food Digestion 88, 263–275. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.11.022>
- Delbes, C., Monnet, C., Irlinger, F., 2015. Des communautés microbiennes au service de la qualité des fromages : diversité et dynamique adaptative et fonctionnelle des populations endogènes et ensemencées. *Innovations Agronomiques* (44), 69-86. (2015).
- Desfossés-Foucault, É., LaPointe, G., Roy, D., 2014. Transcription profiling of interactions between *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 and *Lactobacillus paracasei* ATCC 334 during Cheddar cheese simulation. *International Journal of Food Microbiology* 178, 76–86. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.03.004>
- Desmazeaud, M., 1983. L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques. *Le lait* 63, 267–316.
- Deutscher, J., Francke, C., Postma, P.W., 2006. How Phosphotransferase System-Related Protein Phosphorylation Regulates Carbohydrate Metabolism in Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 939–1031. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00024-06>
- Dhaisne, A., Guellerin, M., Laroute, V., Laguerre, S., Coccain-Bousquet, M., Le Bourgeois, P., Loubiere, P., 2013. Genotypic and Phenotypic Analysis of Dairy *Lactococcus lactis* Biodiversity in Milk: Volatile Organic Compounds as Discriminating Markers. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 4643–4652. <https://doi.org/10.1128/AEM.01018-13>
- Di Cagno, R., De Angelis, M., Calasso, M., Gobbetti, M., 2011. Proteomics of the bacterial cross-talk by quorum sensing. *Journal of Proteomics* 74, 19–34. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.09.003>
- Di Cagno, R., De Angelis, M., Upadhyay, V.K., McSweeney, P.L.H., Minervini, F., Gallo, G., Gobbetti, M., 2003. Effect of proteinases of starter bacteria on the growth and proteolytic activity of *Lactobacillus plantarum* DPC2741. *International Dairy Journal* 13, 145–157. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00143-7](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00143-7)
- Doeven, M.K., Kok, J., Poolman, B., 2005. Specificity and selectivity determinants of peptide transport in *Lactococcus lactis* and other microorganisms. *Molecular Microbiology* 57, 640–649. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04698.x>
- Doi, Y., 2019. Glycerol metabolism and its regulation in lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 103, 5079–5093. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09830-y>
- Donkor, O.N., Henriksson, A., Vasiljevic, T., Shah, N.P., 2007. α -Galactosidase and proteolytic activities of selected probiotic and dairy cultures in fermented soymilk. *Food Chemistry* 104, 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.10.065>
- Doré, C., Varoquaux, F., 2006. *Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées*. Editions Quae.
- Douillard, F.P., de Vos, W.M., 2014. Functional genomics of lactic acid bacteria: from food to health. *Microb Cell Fact* 13, S8. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S8>
- EFSA Journal, 2015. Risk assessment for peri- and post-menopausal women taking food supplements containing isolated isoflavones. *EFSA Journal* 13, 4246. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4246>
- EFSA Journal, 2011. Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal* 9, 2393. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2393>
- El Youssef, C., Bonnarne, P., Fraud, S., Péron, A.-C., Helinck, S., Landaud, S., 2020. Sensory Improvement of a Pea Protein-Based Product Using Microbial Co-Cultures of Lactic Acid Bacteria and Yeasts. *Foods* 9, 349. <https://doi.org/10.3390/foods9030349>
- Endo, A., Maeno, S., Tanizawa, Y., Kneifel, W., Arita, M., Dicks, L., Salminen, S., 2018. Fructophilic Lactic Acid Bacteria, a Unique Group of Fructose-Fermenting Microbes. *Appl. Environ. Microbiol.* 84. <https://doi.org/10.1128/AEM.01290-18>
- Evans, R.John., Bandemer, S.L., 1967. Nutritive value of legume seed proteins. *J. Agric. Food Chem.* 15, 439–443. <https://doi.org/10.1021/jf60151a011>
- Ezraty, B., Gennaris, A., Barras, F., Collet, J.-F., 2017. Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria. *Nat Rev Microbiol* 15, 385–396. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.26>

- Falentin, H., Deutsch, S.-M., Loux, V., Hammani, A., Buratti, J., Parayre, S., Chuat, V., Barbe, V., Aury, J.-M., Jan, G., Le Loir, Y., 2016. Permanent draft genome sequence of the probiotic strain *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA 129 (ITG P20). *Standards in Genomic Sciences* 11, 6. <https://doi.org/10.1186/s40793-015-0120-z>
- Falentin, H., Postollec, F., Parayre, S., Henaff, N., Le Bivic, P., Richoux, R., Thierry, A., Sohier, D., 2010. Specific metabolic activity of ripening bacteria quantified by real-time reverse transcription PCR throughout Emmental cheese manufacture. *International Journal of Food Microbiology, The 16th CBL (Club des Bactéries Lactiques) Symposium, May 2009, Toulouse, France* 144, 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.003>
- Famelart, M.-H., Guyomarc'h, F., Morand, M., Novales, B., 2011. Agrégation protéique et propriétés gélifiantes et moussantes des protéines laitières—quoi de neuf sur le plan des connaissances. *Innov Agron* 13, 117–132.
- FAOSTAT [WWW Document], 2018. URL <http://www.fao.org/faostat/fr/#compare> (accessed 5.24.19).
- FAOSTAT [WWW Document], n.d. URL <http://www.fao.org/faostat/en/#compare> (accessed 3.6.19).
- Farzadi, M., Khatami, S., Mousavi, M., Amirmozafari, N., 2011. Purification and characterization of β -D-galactosidase from *Lactobacillus acidophilus*. *African Journal of Biotechnology* 10, 1873–1879. <https://doi.org/10.4314/ajb.v10i10>.
- Faust, K., Raes, J., 2012. Microbial interactions: from networks to models. *Nat Rev Microbiol* 10, 538–550. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2832>
- Fernandez, A., Ogawa, J., Penaud, S., Boudebouze, S., Ehrlich, D., Guchte, M. van de, Maguin, E., 2008. Rerouting of pyruvate metabolism during acid adaptation in *Lactobacillus bulgaricus*. *PROTEOMICS* 8, 3154–3163. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700974>
- Fernández, M., Zúñiga, M., 2006. Amino Acid Catabolic Pathways of Lactic Acid Bacteria. *Critical Reviews in Microbiology* 32, 155–183. <https://doi.org/10.1080/10408410600880643>
- Fernandez-Espla, M.D., Garault, P., Monnet, V., Rul, F., 2000. *Streptococcus thermophilus* cell wall-anchored proteinase: release, purification, and biochemical and genetic characterization. *Appl Environ Microbiol* 66, 4772–4778. <https://doi.org/10.1128/aem.66.11.4772-4778.2000>
- Filannino, P., Angelis, M.D., Cagno, R.D., Gozzi, G., Riciputi, Y., Gobbetti, M., 2018. How *Lactobacillus plantarum* shapes its transcriptome in response to contrasting habitats. *Environmental Microbiology* 20, 3700–3716. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14372>
- Florilege web [WWW Document], n.d. URL <http://migale.jouy.inra.fr/Florilege/#&welcome> (accessed 2.22.19).
- Frey, L., Hubert, J.C., 1993. Lactobacilles, oxygène, métabolisme et antagonisme. *Lait* 73, 133–144. <https://doi.org/10.1051/lait:1993211>
- Fröhlich-Wyder, M.-T., Bisig, W., Guggisberg, D., Jakob, E., Turgay, M., Wechsler, D., 2017. Chapter 35 - Cheeses With Propionic Acid Fermentation, in: McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W. (Eds.), *Cheese (Fourth Edition)*. Academic Press, San Diego, pp. 889–910. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00035-1>
- Fujimaki, M., Arai, S., Kirigaya, N., Sakurai, Y., 1965. Studies on Flavor Components in Soybean. *Agricultural and Biological Chemistry* 29, 855–863. <https://doi.org/10.1080/00021369.1965.10858478>
- Ganesan, B., Weimer, B.C., 2017. Amino Acid Catabolism and Its Relationship to Cheese Flavor Outcomes, in: *Cheese*. Elsevier, pp. 483–516. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00019-3>
- Gänzle, M.G., 2015. Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science* 2, 106–117. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.03.001>
- Gänzle, M.G., Follador, R., 2012. Metabolism of Oligosaccharides and Starch in Lactobacilli: A Review. *Frontiers in Microbiology* 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00340>
- Gänzle, M.G., Loponen, J., Gobbetti, M., 2008. Proteolysis in sourdough fermentations: mechanisms and potential for improved bread quality. *Trends in Food Science & Technology* 19, 513–521. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.04.002>
- Garcia, C., Rendueles, M., Diaz, M., 2019. Liquid-phase food fermentations with microbial consortia involving lactic acid bacteria: A review. *Food Res. Int.* 119, 207–220. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.043>
- García, C., Rendueles, M., Díaz, M., 2017. Microbial amensalism in *Lactobacillus casei* and *Pseudomonas taetrolens* mixed culture. *Bioprocess & Biosystems Engineering* 40, 1111–1122. <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1773-3>
- García-Hernández, J., Moreno, Y., Amorocho, C. m., Hernández, M., 2012. A combination of direct viable count and fluorescence in situ hybridization for specific enumeration of viable

- Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *Letters in Applied Microbiology* 54, 247–254. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03201.x>
- Garrigues, C., Johansen, E., Crittenden, R., 2013. Pangenomics—an avenue to improved industrial starter cultures and probiotics. *Current opinion in biotechnology* 24, 187–191.
- Garro, M.S., de Valdez, G.F., de Giori, G.S., 2004. Temperature effect on the biological activity of *Bifidobacterium longum* CRL 849 and *Lactobacillus fermentum* CRL 251 in pure and mixed cultures grown in soymilk. *Food Microbiol.* 21, 511–518. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.01.001>
- Garro, M.S., de Valdez, G.F., Oliver, G., de Giori, G.S., 1996. Purification of α -galactosidase from *Lactobacillus fermentum*. *Journal of Biotechnology* 45, 103–109.
- Garro, M.S., de Valdez, G.F., Oliver, G., de Giori, G.S., 1998. Growth characteristics and fermentation products of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lactobacillus casei* and *L. fermentum* in soymilk. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* 206, 72–75. <https://doi.org/10.1007/s002170050217>
- Gobbetti, M., Smacchi, E., Fox, P., Stepaniak, L., Corsetti, A., 1996. The Sourdough Microflora. Cellular Localization and Characterization of Proteolytic Enzymes in Lactic Acid Bacteria. *LWT - Food Science and Technology* 29, 561–569. <https://doi.org/10.1006/fstl.1996.0086>
- Goh, Y.J., Klaenhammer, T.R., 2014. Insights into glycogen metabolism in *Lactobacillus acidophilus*: impact on carbohydrate metabolism, stress tolerance and gut retention. *Microbial Cell Factories* 13, 94. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0094-3>
- González-Royo, E., Pascual, O., Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Esteve-Zarzoso, B., Mas, A., Canals, J.M., Zamora, F., 2015. Oenological consequences of sequential inoculation with non-*Saccharomyces* yeasts (*Torulaspora delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production. *Eur Food Res Technol* 240, 999–1012. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2404-8>
- Görke, B., Stülke, J., 2008. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nature Reviews Microbiology* 6, 613–624. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1932>
- Granata, L.A., Morr, C.V., 1996. Improved Acid, Flavor and Volatile Compound Production in a High Protein and Fiber Soymilk Yogurt-like Product. *Journal of Food Science* 61, 331–336. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1996.tb14188.x>
- Grappin, R., Packard, V.S., Ginn, R.E., 1981. Variability and Interrelationship of Various Herd Milk Components. *J Food Prot* 44, 69–72. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-44.1.69>
- Green, J., Paget, M.S., 2004. Bacterial redox sensors. *Nat Rev Microbiol* 2, 954–966. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1022>
- Griffiths, M.W., Tellez, A.M., 2013. *Lactobacillus helveticus*: the proteolytic system. *Front. Microbiol.* 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00030>
- Grossiord, B.P., Luesink, E.J., Vaughan, E.E., Arnaud, A., Vos, W.M. de, 2003. Characterization, Expression, and Mutation of the *Lactococcus lactis* galPMKTE Genes, Involved in Galactose Utilization via the Leloir Pathway. *Journal of Bacteriology* 185, 870–878. <https://doi.org/10.1128/JB.185.3.870-878.2003>
- Gu, J., Liu, T., Hou, J., Pan, L., Sadiq, F.A., Yuan, L., Yang, H., He, G., 2018. Analysis of bacterial diversity and biogenic amines content during the fermentation processing of stinky tofu. *Food Research International* 111, 689–698. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.065>
- Gu, Q., Zhang, C., Song, D., Li, P., Zhu, X., 2015. Enhancing vitamin B12 content in soy-yogurt by *Lactobacillus reuteri*. *International Journal of Food Microbiology* 206, 56–59. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.033>
- Guédon, E., Sperandio, B., Pons, N., Ehrlich, S.D., Renault, P., 2005. Overall control of nitrogen metabolism in *Lactococcus lactis* by CodY, and possible models for CodY regulation in Firmicutes. *Microbiology*, 151, 3895–3909. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28186-0>
- Guéguen, J., Lemarié, J., 1996. Composition, structure et propriétés physiologiques des protéines légumineuses et d'oléagineux. *Protéines végétales*. Paris (France): Lavoisier Tec et Doc 80–119.
- Guéguen, J., Walrand, S., Bourgeois, O., 2016. Les protéines végétales : contexte et potentiels en alimentation humaine. *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 51, 177–185. <https://doi.org/10.1016/j.cnd.2016.02.001>
- Guillon, F., Champ, M.M.-J., 2002. Carbohydrate fractions of legumes: uses in human nutrition and potential for health. *Br J Nutr* 88, 293–306. <https://doi.org/10.1079/BJN2002720>
- Han, Y.R., Youn, S.Y., Ji, G.E., Park, M.S., 2014. Production of α - and β -galactosidases from *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* RD47. *J. Microbiol. Biotechnol* 24, 675–682.

- Hansen, E.B., 2018. Redox reactions in food fermentations. *Current Opinion in Food Science, Food Chemistry and Biochemistry * Food Bioprocessing* 19, 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.03.004>
- Harlé, Olivier, Falentin, H., Niay, J., Valence, F., Courselaud, C., Chuat, V., Maillard, M.-B., Guédon, É., Deutsch, S.-M., Thierry, A., 2020. Diversity of the metabolic profiles of a broad range of lactic acid bacteria in soy juice fermentation. *Food Microbiology* 103410. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103410>
- Harlé, Oliver, Legrand, J., Tesnière, C., Pradal, M., Mouret, J.-R., Nidelet, T., 2020. Investigations of the mechanisms of interactions between four non-conventional species with *Saccharomyces cerevisiae* in oenological conditions. *PLOS ONE* 15, e0233285. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233285>
- Hati, S., Vij, S., Mandal, S., Malik, R. k., Kumari, V., Khetra, Y., 2014. α -Galactosidase Activity and Oligosaccharides Utilization by Lactobacilli during Fermentation of Soy Milk. *Journal of Food Processing and Preservation* 38, 1065–1071. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12063>
- Hays, S.G., Patrick, W.G., Ziesack, M., Oxman, N., Silver, P.A., 2015. Better together: engineering and application of microbial symbioses. *Current opinion in biotechnology* 36, 40–49.
- Hébert, E.M., Raya, R.R., Giori, G.S. de, 2004. Nutritional Requirements of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* in a Chemically Defined Medium. *Curr Microbiol* 49, 341–345. <https://doi.org/10.1007/s00284-004-4357-9>
- Herve-Jimenez, L., Guillouard, I., Guedon, E., Gautier, C., Boudebbouze, S., Hols, P., Monnet, V., Rul, F., Maguin, E., 2008. Physiology of *Streptococcus thermophilus* during the late stage of milk fermentation with special regard to sulfur amino-acid metabolism. *Proteomics* 8, 4273–4286. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700489>
- Hexaresearch, 2019. Vegan Yogurt Market Size, Share, Trends, 2019-2025 | Industry Report [WWW Document]. URL <https://www.hexaresearch.com/research-report/vegan-yogurt-market> (accessed 9.7.20).
- Hols, P., Hancy, F., Fontaine, L., Grossiord, B., Prozzi, D., Leblond-Bourget, N., Decaris, B., Bolotin, A., Delorme, C., Dusko Ehrlich, S., Guédon, E., Monnet, V., Renault, P., Kleerebezem, M., 2005. New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 435–463. <https://doi.org/10.1016/j.fmre.2005.04.008>
- Holzapfel, W.H., Wood, B.J.B., 2014. *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*. John Wiley & Sons.
- Hou, J.-W., Yu, R.-C., Chou, C.-C., 2000. Changes in some components of soymilk during fermentation with bifidobacteria. *Food Research International* 33, 393–397. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00061-2](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00061-2)
- Inglin, R.C., Meile, L., Stevens, M.J.A., 2018. Clustering of Pan- and Core-genome of *Lactobacillus* provides Novel Evolutionary Insights for Differentiation. *BMC Genomics* 19, 284. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4601-5>
- Irmeler, S., Raboud, S., Beisert, B., Rauhut, D., Berthoud, H., 2008. Cloning and Characterization of Two *Lactobacillus casei* Genes Encoding a Cystathionine Lyase. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 99–106. <https://doi.org/10.1128/AEM.00745-07>
- Ito, A., Sato, Y., Kudo, S., Sato, S., Nakajima, H., Toba, T., 2003. The Screening of Hydrogen Peroxide-Producing Lactic Acid Bacteria and Their Application to Inactivating Psychrotrophic Food-Borne Pathogens. *Curr Microbiol* 47, 0231–0236. <https://doi.org/10.1007/s00284-002-3993-1>
- Jänsch, A., Korakli, M., Vogel, R.F., Gänzle, M.G., 2007. Glutathione Reductase from *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM20451T: Contribution to Oxygen Tolerance and Thiol Exchange Reactions in Wheat Sourdoughs. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4469–4476. <https://doi.org/10.1128/AEM.02322-06>
- Janßen, D., Dworschak, L., Ludwig, C., Ehrmann, M.A., Vogel, R.F., 2020. Interspecies assertiveness of *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus sakei* in sausage fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 331, 108689. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108689>
- Jeckelmann, J.-M., Erni, B., 2020. Transporters of glucose and other carbohydrates in bacteria. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02379-0>
- Kalisky, T., Oriol, S., Bar-Lev, T.H., Ben-Haim, N., Trink, A., Wineberg, Y., Kanter, I., Gilad, S., Pyne, S., 2018. A brief review of single-cell transcriptomic technologies. *Brief Funct Genomics* 17, 64–76. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elx019>
- Kanehisa, M., Sato, Y., Furumichi, M., Morishima, K., Tanabe, M., 2019. New approach for understanding genome variations in KEGG. *Nucleic Acids Res* 47, D590–D595. <https://doi.org/10.1093/nar/gky962>

- Kaneko, D., Igarashi, T., Aoyama, K., 2014. Reduction of the Off-Flavor Volatile Generated by the Yogurt Starter Culture Including *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in Soymilk. *J. Agric. Food Chem.* 62, 1658–1663. <https://doi.org/10.1021/jf404567e>
- Kaneko, S., Kumazawa, K., Nishimura, O., 2011. Studies on the Key Aroma Compounds in Soy Milk Made from Three Different Soybean Cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 59, 12204–12209. <https://doi.org/10.1021/jf202942h>
- Kano, M., Takayanagi, T., Harada, K., Sawada, S., Ishikawa, F., 2006. Bioavailability of Isoflavones after Ingestion of Soy Beverages in Healthy Adults. *J Nutr* 136, 2291–2296. <https://doi.org/10.1093/jn/136.9.2291>
- Karr-Lilienthal, L.K., Kadzere, C.T., Grieshop, C.M., Fahey, G.C., 2005. Chemical and nutritional properties of soybean carbohydrates as related to nonruminants: A review. *Livestock Production Science* 97, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.livprodsci.2005.01.015>
- Kieronczyk, A., Cachon, R., Feron, G., Yvon, M., 2006. Addition of oxidizing or reducing agents to the reaction medium influences amino acid conversion to aroma compounds by *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Microbiology* 101, 1114–1122. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02999.x>
- Kitahara, K., Kusaka, I., 1959. Pleomorphism in Bacterial Cells. *The Journal of General and Applied Microbiology* 5, 78–84. <https://doi.org/10.2323/jgam.5.78>
- Kleerebezemab, M., Hols, P., Hugenholtz, J., 2000. Lactic acid bacteria as a cell factory: rerouting of carbon metabolism in *Lactococcus lactis* by metabolic engineering. *Enzyme and Microbial Technology* 26, 840–848. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00180-0](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00180-0)
- Kobayashi, A., Tsuda, Y., Hirata, N., Kubota, K., Kitamura, K., 1995. Aroma Constituents of Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] Milk Lacking Lipoxygenase Isoenzymes. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2449–2452. <https://doi.org/10.1021/jf00057a025>
- Kobir, A., Shi, L., Boskovic, A., Grangeasse, C., Franjevic, D., Mijakovic, I., 2011. Protein phosphorylation in bacterial signal transduction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, Systems Biology of Microorganisms* 1810, 989–994. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.01.006>
- König, H., Uden, G., Fröhlich, J. (Eds.), 2009. *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-85463-0>
- Konings, W.N., Lolkema, J.S., Poolman, B., 1995. The generation of metabolic energy by solute transport. *Arch. Microbiol.* 164, 235–242. <https://doi.org/10.1007/BF02529957>
- Kort, R., Westerik, N., Mariela Serrano, L., Douillard, F.P., Gottstein, W., Mukisa, I.M., Tuijn, C.J., Basten, L., Hafkamp, B., Meijer, W.C., Teusink, B., de Vos, W.M., Reid, G., Sybesma, W., 2015. A novel consortium of *Lactobacillus rhamnosus* and *Streptococcus thermophilus* for increased access to functional fermented foods. *Microb Cell Fact* 14, 195. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0370-x>
- Kovachev, S., 2018. Defence factors of vaginal lactobacilli. *Critical Reviews in Microbiology* 44, 31–39. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1306688>
- Kreft, J.-U., Griffin, B.M., González-Cabaleiro, R., 2020. Evolutionary causes and consequences of metabolic division of labour: why anaerobes do and aerobes don't. *Current Opinion in Biotechnology* 62, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.08.008>
- Kullisaar, T., Zilmer, M., Mikelsaar, M., Vihalemm, T., Annuk, H., Kairane, C., Kilk, A., 2002. Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 72, 215–224. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00674-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00674-2)
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., Salzberg, S.L., 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology* 10, R25. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-3-r25>
- Larsen, Nadja, Moslehi-Jenabian, S., Werner, B.B., Jensen, M.L., Garrigues, C., Vogensen, F.K., Jespersen, L., 2016. Transcriptome analysis of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* during milk acidification as affected by dissolved oxygen and the redox potential. *International Journal of Food Microbiology* 226, 5–12. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.03.002>
- Larsen, N., Werner, B.B., Jespersen, L., 2016. Transcriptional responses in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* to the changes in oxygen and redox potential during milk acidification. *Letters in Applied Microbiology* 63, 117–123. <https://doi.org/10.1111/lam.12596>
- Lazdunski, A.M., Ventre, I., Sturgis, J.N., 2004. Regulatory circuits and communication in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 2, 581–592. <https://doi.org/10.1038/nrmicro924>
- Lê, S., Husson, F., 2008. *SensMineR: a package for sensory data analysis*. *Journal of Sensory Studies* 23, 14–25.

- Lê, S., Josse, J., Husson, F., 2008. **FactoMineR** : An R Package for Multivariate Analysis. J. Stat. Soft. 25. <https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01>
- Lebeer, S., Verhoeven, T.L.A., Francius, G., Schoofs, G., Lambrichts, I., Dufrière, Y., Vanderleyden, J., Keersmaecker, S.C.J.D., 2009. Identification of a Gene Cluster for the Biosynthesis of a Long, Galactose-Rich Exopolysaccharide in *Lactobacillus rhamnosus* GG and Functional Analysis of the Priming Glycosyltransferase. Appl. Environ. Microbiol. 75, 3554–3563. <https://doi.org/10.1128/AEM.02919-08>
- LeBlanc, J.G., Garro, M.S., Savoy de Giori, G., 2004. Effect of pH on *Lactobacillus fermentum* growth, raffinose removal, β -galactosidase activity and fermentation products. Applied Microbiology and Biotechnology 65. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1532-z>
- LeBlanc, J.G., Milani, C., de Giori, G.S., Sesma, F., van Sinderen, D., Ventura, M., 2013. Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. Current Opinion in Biotechnology, Food biotechnology • Plant biotechnology 24, 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.08.005>
- Lecerf, J.-M., Fressin, C., 1995. L'interet nutritionnel du soja 8.
- Letort, C., Nardi, M., Garault, P., Monnet, V., Juillard, V., 2002. Casein Utilization by *Streptococcus thermophilus* Results in a Diauxic Growth in Milk. AEM 68, 3162–3165. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.6.3162-3165.2002>
- Li, C., Li, W., Chen, X., Feng, M., Rui, X., Jiang, M., Dong, M., 2014. Microbiological, physicochemical and rheological properties of fermented soymilk produced with exopolysaccharide (EPS) producing lactic acid bacteria strains. LWT - Food Science and Technology 57, 477–485. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.02.025>
- Li, N., Wu, X., Zhuang, W., Xia, L., Chen, Y., Zhao, R., Yi, M., Wan, Q., Du, L., Zhou, Y., 2020. Soy and Isoflavone Consumption and Multiple Health Outcomes: Umbrella Review of Systematic Reviews and Meta-Analyses of Observational Studies and Randomized Trials in Humans. Molecular Nutrition & Food Research 64, 1900751. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201900751>
- Li, P., Zhou, Q., Gu, Q., 2016. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* LZ227, a potential probiotic strain producing B-group vitamins. Journal of Biotechnology 234, 66–70. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.07.020>
- Li, S., Tang, S., He, Q., Hu, J., Zheng, J., 2019. Changes in Proteolysis in Fermented Milk Produced by *Streptococcus thermophilus* in Co-Culture with *Lactobacillus plantarum* or *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* During Refrigerated Storage. Molecules 24, 3699. <https://doi.org/10.3390/molecules24203699>
- Li, T., Lu, X., Yang, X., 2013. Stachyose-Enriched α -Galacto-oligosaccharides Regulate Gut Microbiota and Relieve Constipation in Mice. J. Agric. Food Chem. 61, 11825–11831. <https://doi.org/10.1021/jf404160e>
- Little, A.E.F., Robinson, C.J., Peterson, S.B., Raffa, K.F., Handelsman, J., 2008. Rules of Engagement: Interspecies Interactions that Regulate Microbial Communities. Annual Review of Microbiology 62, 375–401. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.030608.101423>
- Liu, C.-J., Wu, B., Zhang, S.-Y., Li, Q.-K., Zeng, X.-Q., Yang, E., Luo, Y.-Y., Li, X.-R., 2019. Transcriptomic analysis of *de novo* folate biosynthetic genes in *Lactobacillus plantarum* strain 4_3 in fermented soybean. Food Funct. 10, 2426–2438. <https://doi.org/10.1039/C8FO01952E>
- Liu, E., Zheng, H., Shi, T., Ye, L., Konno, T., Oda, M., Shen, H., Ji, Z.-S., 2016. Relationship between *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* under whey conditions: Focus on amino acid formation. International Dairy Journal 56, 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.01.019>
- Liu, K., 1997. Chemistry and Nutritional Value of Soybean Components, in: Liu, K. (Ed.), Soybeans: Chemistry, Technology, and Utilization. Springer US, Boston, MA, pp. 25–113. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1763-4_2
- Lizardo, R.C.M., Cho, H.D., Won, Y.S., Seo, K.I., 2020. Fermentation with mono- and mixed cultures of *Lactobacillus plantarum* and *L. casei* enhances the phytochemical content and biological activities of cherry silverberry (*Elaeagnus multiflora* Thunb.) fruit. Journal of the Science of Food and Agriculture 100, 3687–3696. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10404>
- LLP, F.M.R., 2020. Global Vegan Yogurt Market is Expected to Reach USD 2.89 Billion by 2026 : Fior Markets [WWW Document]. GlobeNewswire News Room. URL <http://www.globenewswire.com/news-release/2020/01/23/1974349/0/en/Global-Vegan-Yogurt-Market-is-Expected-to-Reach-USD-2-89-Billion-by-2026-Fior-Markets.html> (accessed 7.16.20).

- Lo, R., Ho, V.T.T., Bansal, N., Turner, M.S., 2018. The genetic basis underlying variation in production of the flavour compound diacetyl by *Lactobacillus rhamnosus* strains in milk. *Int. J. Food Microbiol.* 265, 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.029>
- Loi, V.V., Rossius, M., Antelmann, H., 2015. Redox regulation by reversible protein S-thiolation in bacteria. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00187>
- Lorieau, L., Halabi, A., Ligneul, A., Hazart, E., Dupont, D., Floury, J., 2018. Impact of the dairy product structure and protein nature on the proteolysis and amino acid bioaccessibility during in vitro digestion. *Food Hydrocolloids* 82, 399–411. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.04.019>
- Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15, 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Luesink, E.J., Marugg, J.D., Kuipers, O.P., Vos, W.M. de, 1999. Characterization of the Divergent *sacBK* and *sacAR* Operons, Involved in Sucrose Utilization by *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology* 181, 1924–1926. <https://doi.org/10.1128/JB.181.6.1924-1926.1999>
- Ma, C., Cheng, G., Liu, Z., Gong, G., Chen, Z., 2016. Determination of the essential nutrients required for milk fermentation by *Lactobacillus plantarum*. *LWT - Food Science and Technology* 65, 884–889. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.003>
- Makarova, K.S., Koonin, E.V., 2007. Evolutionary Genomics of Lactic Acid Bacteria. *Journal of Bacteriology* 189, 1199–1208. <https://doi.org/10.1128/JB.01351-06>
- Mäkimattila, E., Kahala, M., Joutsjoki, V., 2011. Characterization and electrotransformation of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus paraplantarum* isolated from fermented vegetables. *World J Microbiol Biotechnol* 27, 371–379. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0468-6>
- Martin, C., Schoumacker, R., Bourjade, D., Thomas-Danguin, T., Guichard, E., Le Quéré, J.-L., Laboure, H., 2016. Sensory properties linked to fat content and tasting temperature in cottage cheese. *Dairy Sci. & Technol.* 96, 735–746. <https://doi.org/10.1007/s13594-016-0301-6>
- Martin, F., Cachon, R., Pernin, K., De Coninck, J., Gervais, P., Guichard, E., Cayot, N., 2011. Effect of oxidoreduction potential on aroma biosynthesis by lactic acid bacteria in nonfat yogurt. *Journal of Dairy Science* 94, 614–622. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3372>
- Martin, F., Ebel, B., Rojas, C., Gervais, P., Cayot, N., Cachon, R., 2013. Redox potential: Monitoring and role in development of aroma compounds, rheological properties and survival of oxygen sensitive strains during the manufacture of fermented dairy products. *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes* 73–94.
- McAuliffe, O., Kilcawley, K., Stefanovic, E., 2019. Symposium review: Genomic investigations of flavor formation by dairy microbiota. *Journal of Dairy Science* 102, 909–922. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15385>
- Memisi, N., Bogdanovic, V., Tomic, Z., Kasalica, A., Zujovic, M., Stanisic, N., Delic, N., 2011. Variability and correlation between basic quality parameters of raw cow milk. *Bio Anim Husb* 27, 959–967. <https://doi.org/10.2298/BAH1103959M>
- Mital, B.K., Steinkraus, K.H., 1979. Fermentation of soy milk by lactic acid bacteria. A review. *Journal of Food Protection* 42, 895–899.
- Mital, B.K., Steinkraus, K.H., 1975. Utilization of Oligosaccharides by Lactic Acid Bacteria During Fermentation of Soy Milk. *Journal of Food Science* 40, 114–118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1975.tb03749.x>
- Mital, B.K., Steinkraus, K.H., Naylor, H.B., 1974. Growth of Lactic Acid Bacteria in Soy Milks. *Journal of Food Science* 39, 1018–1022. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1974.tb07300.x>
- Morales-Quintana, L., Faúndez, C., Herrera, R., Zavaleta, V., Ravanal, M.C., Eyzaguirre, J., Moya-León, M.A., 2017. Biochemical and structural characterization of *Penicillium purpurogenum* α -D galactosidase: Binding of galactose to an alternative pocket may explain enzyme inhibition. *Carbohydrate Research* 448, 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2017.05.020>
- Morandi, S., Silvetti, T., Tamburini, A., Brasca, M., 2016. Changes in oxidation-reduction potential during milk fermentation by wild lactic acid bacteria. *J. Dairy Res.* 83, 387–394. <https://doi.org/10.1017/S0022029916000339>
- Mugula, J.K., Nnko, S.A.M., Narvhus, J.A., Sørhaug, T., 2003. Microbiological and fermentation characteristics of togwa, a Tanzanian fermented food. *International Journal of Food Microbiology* 80, 187–199. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00141-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00141-1)
- Munro, I.C., Harwood, M., Hlywka, J.J., Stephen, A.M., Doull, J., Flamm, W.G., Adlercreutz, H., 2003. Soy Isoflavones: a Safety Review. *Nutrition Reviews* 61, 1–33. <https://doi.org/10.1301/nr.2003.janr.1-33>
- Murti, T.W., Boullanne, C., Landon, M., Smazeaud, M.J.D., 1993. Bacterial Growth and Volatile Compounds in Yoghurt-Type Products from Soymilk Containing *Bifidobacterium* ssp. *Journal of Food Science* 58, 153–157. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb03233.x>

- Nai, C., Meyer, V., 2018. From axenic to mixed cultures: technological advances accelerating a paradigm shift in microbiology. *Trends in microbiology* 26, 538–554.
- Nguyen, A.T.-B., Picart-Palmade, L., Nigen, M., Jimenez, L., Ait-Abderahim, H., Marchesseau, S., 2019. Effect of mono or co-culture of EPS-producing *Streptococcus thermophilus* strains on the formation of acid milk gel and the appearance of texture defects. *International Dairy Journal* 98, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.06.007>
- Nishimura, J., Kawai, Y., Aritomo, R., Ito, Y., Makino, S., Ikegami, S., Isogai, E., Saito, T., 2013. Effect of Formic Acid on Exopolysaccharide Production in Skim Milk Fermentation by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1. *Bioscience of Microbiota, Food and Health* 32, 23–32. <https://doi.org/10.12938/bmfh.32.23>
- Oliveira, R.P. de S., Torres, B.R., Perego, P., Oliveira, M.N. de, Converti, A., 2012. Co-metabolic models of *Streptococcus thermophilus* in co-culture with *Lactobacillus bulgaricus* or *Lactobacillus acidophilus*. *Biochemical Engineering Journal* 62, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.01.004>
- Omogbai, B.A., Ikenebomeh, M.J., Ojeaburu, S.I., 2005. Microbial utilization of stachyose in soymilk yogurt production. *African Journal of Biotechnology* 4.
- Orberg, P.K., Sandine, W.E., 1985. Plasmid Linkage of Proteinase and Lactose Fermentation in *Streptococcus lactis* NCDO 14041. *Journal of Dairy Science* 68, 572–580. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(85\)80860-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(85)80860-2)
- Othman, M., Ariff, A.B., Rios-Solis, L., Halim, M., 2017. Extractive Fermentation of Lactic Acid in Lactic Acid Bacteria Cultivation: A Review. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02285>
- Ouvry, A., Waché, Y., Tourdot-Maréchal, R., Diviès, C., Cachon, R., 2002. Effects of oxidoreduction potential combined with acetic acid, NaCl and temperature on the growth, acidification, and membrane properties of *Lactobacillus plantarum*. *FEMS Microbiol Lett* 214, 257–261. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11356.x>
- Pallotta, M.L., 2019. Riboflavin/Vitamin B2 and Lactic Acid Bacteria. *Vitamin B 5*.
- Papadimitriou, K., Alegría, Á., Bron, P.A., Angelis, M. de, Gobbetti, M., Kleerebezem, M., Lemos, J.A., Linares, D.M., Ross, P., Stanton, C., Turrioni, F., Sinderen, D. van, Varmanen, P., Ventura, M., Zúñiga, M., Tsakalidou, E., Kok, J., 2016. Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80, 837–890. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00076-15>
- Pedersen, M.B., Gaudu, P., Lechardeur, D., Petit, M.-A., Gruss, A., 2012. Aerobic Respiration Metabolism in Lactic Acid Bacteria and Uses in Biotechnology. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 3, 37–58. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101255>
- Pederson, J.A., Steele, J.L., Christensen, J.E., Dudley, E.G., 1999. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria, in: Konings, W.N., Kuipers, O.P., In 't Veld, J.H.J.H. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 217–246. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2027-4_11
- Pelczar, n.d. *Microbiology: Application Based Approach*. Tata McGraw-Hill Education.
- Peñalvo, J.L., Nurmi, T., Adlercreutz, H., 2004. A simplified HPLC method for total isoflavones in soy products. *Food Chemistry* 87, 297–305. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.12.028>
- Peng, X., Guo, S., 2015. Texture characteristics of soymilk gels formed by lactic fermentation: A comparison of soymilk prepared by blanching soybeans under different temperatures. *Food Hydrocolloids* 43, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.04.034>
- Pescuma, M., Espeche Turbay, M.B., Mozzi, F., Font de Valdez, G., Savoy de Giori, G., Hebert, E.M., 2013. Diversity in proteinase specificity of thermophilic lactobacilli as revealed by hydrolysis of dairy and vegetable proteins. *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 7831–7844. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5037-0>
- Pieterse, B., Leer, R.J., Schuren, F.H.J., van der Werf, M.J., 2005. Unravelling the multiple effects of lactic acid stress on *Lactobacillus plantarum* by transcription profiling. *Microbiology* 151, 3881–3894. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28304-0>
- Pinthong, R., Macrae, R., Rothwell, J., 1980. The development of a soya-based yoghurt. *International Journal of Food Science & Technology* 15, 653–659. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1980.tb00986.x>
- Pontonio, E., Raho, S., Dingo, C., Centrone, D., Carofiglio, V.E., Rizzello, C.G., 2020. Nutritional, Functional, and Technological Characterization of a Novel Gluten- and Lactose-Free Yogurt-Style Snack Produced With Selected Lactic Acid Bacteria and Leguminosae Flours. *Front. Microbiol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01664>
- Poolman, B., 2002. Transporters and their roles in LAB cell physiology, in: Siezen, R.J., Kok, J., Abee, T., Schafsma, G. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*:

- Proceedings of the Seventh Symposium on Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications, 1–5 September 2002, Egmond Aan Zee, the Netherlands. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 147–164. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2029-8_10
- Protea, 2020. Soja. Wikipédia.
- Qiao, Y., Liu, G., Leng, C., Zhang, Y., Lv, X., Chen, H., Sun, J., Feng, Z., 2018. Metabolic profiles of cysteine, methionine, glutamate, glutamine, arginine, aspartate, asparagine, alanine and glutathione in *Streptococcus thermophilus* during pH-controlled batch fermentations. *Scientific Reports* 8, 12441. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30272-5>
- Rajab, S., Tabandeh, F., Shahraky, M.K., Alahyaribeik, S., 2020. The effect of lactobacillus cell size on its probiotic characteristics. *Anaerobe* 62, 102103. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.102103>
- Rathore, S., Salmeron, I., Pandiella, S.S., 2012. Production of potentially probiotic beverages using single and mixed cereal substrates fermented with lactic acid bacteria cultures. *Food Microbiol.* 30, 239–244. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.09.001>
- Ratzke, C., Gore, J., 2016. Self-organized patchiness facilitates survival in a cooperatively growing *Bacillus subtilis* population. *Nature Microbiology* 1, 1–5. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.22>
- Raynaud, S., 2006. Régulation métabolique et transcriptionnelle de l'autoacidification chez *Lactococcus lactis* (PhD Thesis). Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.
- Règlement (CEE) n° 1898/87 du Conseil du 2 juillet 1987 concernant la protection de la dénomination du lait et des produits laitiers lors de leur commercialisation, 1987. , OJ L.
- Reid, S.J., Abratt, V.R., 2005. Sucrose utilisation in bacteria: genetic organisation and regulation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67, 312–321. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1885-y>
- Renault, P.E., Albertin, W., Bely, M., 2013. An innovative tool reveals interaction mechanisms among yeast populations under oenological conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 4105–4119. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4660-5>
- Riondet, C., Cachon, R., Waché, Y., Alcaraz, G., Diviès, C., 2000. Extracellular Oxidoreduction Potential Modifies Carbon and Electron Flow in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 182, 620–626. <https://doi.org/10.1128/JB.182.3.620-626.2000>
- Riondet, C., Cachon, R., Waché, Y., Alcaraz, G., Diviès, C., 1999. Changes in the proton-motive force in *Escherichia coli* in response to external oxidoreduction potential. *European Journal of Biochemistry* 262, 595–599. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00429.x>
- Rodríguez Amor, D., Dal Bello, M., 2019. Bottom-Up Approaches to Synthetic Cooperation in Microbial Communities. *Life* 9, 22. <https://doi.org/10.3390/life9010022>
- Rodríguez-Serrano, G.M., Garcia-Garibay, J.M., Cruz-Guerrero, A.E., Gomez-Ruiz, L. del C., Ayala-Nino, A., Castaneda-Ovando, A., Gonzalez-Olivares, L.G., 2018. Proteolytic System of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 28, 1581–1588. <https://doi.org/10.4014/jmb.1807.07017>
- Rooijen, R.J. van, Schalkwijk, S. van, Vos, W.M. de, 1991. Molecular cloning, characterization, and nucleotide sequence of the tagatose 6-phosphate pathway gene cluster of the lactose operon of *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.* 266, 7176–7181.
- Roumet, P., 2001. AGROPOLIS-MUSEUM - Savoirs partagés - Le soja, trésor de vie - Diversité, origine et évaluation par Pierre Roumet (INRA) [WWW Document]. URL <http://museum.agropolis.fr/pages/savoirs/soja/soja.htm> (accessed 8.17.20).
- RStudio Team, 2016. RStudio: Integrated Development Environment for R. RStudio, Inc., Boston, MA.
- Ruiz-Barba, J.L., Jiménez-Díaz, R., 1994. Vitamin and amino acid requirements of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from green olive fermentations. *Journal of Applied Bacteriology* 76, 350–355. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb01639.x>
- Russo, P., Capozzi, V., Spano, G., Corbo, M.R., Sinigaglia, M., Bevilacqua, A., 2016. Metabolites of Microbial Origin with an Impact on Health: Ochratoxin A and Biogenic Amines. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00482>
- Salmeron, I., Fuciños, P., Charalampopoulos, D., Pandiella, S.S., 2009. Volatile compounds produced by the probiotic strain *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 in cereal-based substrates. *Food Chemistry* 117, 265–271. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.112>
- Sanada, C.T.N., Karp, S.G., Spier, M.R., Portella, A.C., Gouvêa, P.M., Yamaguishi, C.T., Vandenberghe, L.P.S., Pandey, A., Soccol, C.R., 2009. Utilization of soybean vinasse for α -galactosidase production. *Food Research International, Bioprocesses in Food Industries* 42, 476–483. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.01.017>

- Sasaki, M., Bosman, B.W., Tan, P.S.T., 1995. Comparison of proteolytic activities in various lactobacilli. *Journal of Dairy Research* 62, 601–610. <https://doi.org/10.1017/S0022029900031332>
- Sasaki, Y., Horiuchi, H., Kawashima, H., Mukai, T., Yamamoto, Y., 2014. NADH Oxidase of *Streptococcus thermophilus* 1131 is Required for the Effective Yogurt Fermentation with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038. *Bioscience of Microbiota, Food and Health* 33, 31–40. <https://doi.org/10.12938/bmfh.33.31>
- Satoh, E. (Tokyo U. of A. (Japan) F. of A.B.-S., Endo, M., Okada, S., Uchimura, T., Hols, P., 2008. Production of succinic acid by *Lactobacillus plantarum* using metabolic rerouting. *Food Preservation Science (Japan)*.
- Savijoki, K., Ingmer, H., Varmanen, P., 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 71, 394–406. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0427-1>
- Seefeldt, K., Weimer, B.C., 2000. Diversity of sulfur compound production in lactic acid bacteria. *Journal of dairy science* 83, 2740–2746.
- Serata, M., Iino, T., Yasuda, E., Sako, T., 2012. Roles of thioredoxin and thioredoxin reductase in the resistance to oxidative stress in *Lactobacillus casei*. *Microbiology*, 158, 953–962. <https://doi.org/10.1099/mic.0.053942-0>
- Serrano, L.M., Molenaar, D., Wels, M., Teusink, B., Bron, P.A., de Vos, W.M., Smid, E.J., 2007. Thioredoxin reductase is a key factor in the oxidative stress response of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Microbial Cell Factories* 6, 29. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-6-29>
- Settachaimongkon, S., Nout, M.J.R., Antunes Fernandes, E.C., Hettinga, K.A., Vervoort, J.M., van Hooijdonk, T.C.M., Zwietering, M.H., Smid, E.J., van Valenberg, H.J.F., 2014. Influence of different proteolytic strains of *Streptococcus thermophilus* in co-culture with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* on the metabolite profile of set-yoghurt. *International Journal of Food Microbiology* 177, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.008>
- Shewry, P.R., 2007. Improving the protein content and composition of cereal grain. *Journal of Cereal Science, The Contribution of Cereals to a Healthy Diet* 46, 239–250. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.06.006>
- Sieuwert, S., 2016. Microbial Interactions in the Yoghurt Consortium: Current Status and Product Implications. *SOJ MID* 4, 01–05. <https://doi.org/10.15226/sojmid/4/2/00150>
- Sieuwert, S., Bok, F.A.M. de, Hugenholtz, J., Vlieg, J.E.T. van H., 2008. Unraveling Microbial Interactions in Food Fermentations: from Classical to Genomics Approaches. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4997–5007. <https://doi.org/10.1128/AEM.00113-08>
- Sieuwert, S., Molenaar, D., Hijum, S.A.F.T. van, Beerthuyzen, M., Stevens, M.J.A., Janssen, P.W.M., Ingham, C.J., Bok, F.A.M. de, Vos, W.M. de, Vlieg, J.E.T. van H., 2010. Mixed-Culture Transcriptome Analysis Reveals the Molecular Basis of Mixed-Culture Growth in *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7775–7784. <https://doi.org/10.1128/AEM.01122-10>
- Silvestroni, A., Connes, C., Sesma, F., Savoy de Giori, G., Piard, J.-C., 2002. Characterization of the *melA* Locus for α -Galactosidase in *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol* 68, 5464–5471. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5464-5471.2002>
- Sime-Ngando, T., Bertrand, J.-C., Bogusz, D., Brugère, J.-F., Franche, C., Fardeau, M.-L., Froussart, E., Geiger, A., Goñi-Urriza, M.S., Ollivier, B., O'Toole, P.W., 2018. The Evolution of Living Beings Started with Prokaryotes and in Interaction with Prokaryotes, in: Bertrand, J.-C., Normand, P., Ollivier, B., Sime-Ngando, T. (Eds.), *Prokaryotes and Evolution*. Springer International Publishing, Cham, pp. 241–338. https://doi.org/10.1007/978-3-319-99784-1_5
- Singh, B.P., Vij, S., 2018. α -Galactosidase activity and oligosaccharides reduction pattern of indigenous lactobacilli during fermentation of soy milk. *Food Bioscience*. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.01.002>
- Singh, B.P., Vij, S., 2017. Growth and bioactive peptides production potential of *Lactobacillus plantarum* strain C2 in soy milk: A LC-MS/MS based revelation for peptides biofunctionality. *LWT - Food Science and Technology* 86, 293–301. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.013>
- Siroli, L., Camprini, L., Pisano, M.B., Patrignani, F., Lanciotti, R., 2019. Volatile Molecule Profiles and Anti-*Listeria monocytogenes* Activity of Nisin Producers *Lactococcus lactis* Strains in Vegetable Drinks. *Front. Microbiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00563>
- Smid, E.J., Lacroix, C., 2013. Microbe–microbe interactions in mixed culture food fermentations. *Current Opinion in Biotechnology, Food biotechnology • Plant biotechnology* 24, 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.11.007>
- Song, T., Barua, K., Buseman, G., Murphy, P.A., 1998. Soy isoflavone analysis: quality control and a new internal standard. *Am J Clin Nutr* 68, 1474S-1479S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/68.6.1474S>

- Springmann, M., Clark, M., Mason-D'Croz, D., Wiebe, K., Bodirsky, B.L., Lassaletta, L., Vries, W. de, Vermeulen, S.J., Herrero, M., Carlson, K.M., Jonell, M., Troell, M., DeClerck, F., Gordon, L.J., Zurayk, R., Scarborough, P., Rayner, M., Loken, B., Fanzo, J., Godfray, H.C.J., Tilman, D., Rockström, J., Willett, W., 2018. Options for keeping the food system within environmental limits. *Nature* 562, 519. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0594-0>
- Srisukchayakul, P., Charalampopoulos, D., Karatzas, K.A., 2018. Study on the effect of citric acid adaptation toward the subsequent survival of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 in low pH fruit juices during refrigerated storage. *Food Research International* 111, 198–204. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.018>
- Stanborough, T., Fegan, N., Powell, S.M., Singh, T., Tamplin, M., Chandry, P.S., 2018. Genomic and metabolic characterization of spoilage-associated *Pseudomonas* species. *International Journal of Food Microbiology* 268, 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.01.005>
- Statistics | SOPA, 2020. URL <http://www.sopa.org/statistics/> (accessed 7.22.20).
- Stefanovic, E., Fitzgerald, G., McAuliffe, O., 2017. Advances in the genomics and metabolomics of dairy lactobacilli: A review. *Food Microbiology* 61, 33–49. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.08.009>
- T. R. Chen, 2011. Effect of oligosaccharides and isoflavones aglycones in defatted soy meal fermented by *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium longum*. *African Journal of Microbiology Research* 5. <https://doi.org/10.5897/AJMR10.553>
- Tachon, S., Brandsma, J.B., Yvon, M., 2010. NoxE NADH Oxidase and the Electron Transport Chain Are Responsible for the Ability of *Lactococcus lactis* To Decrease the Redox Potential of Milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1311–1319. <https://doi.org/10.1128/AEM.02120-09>
- Tamang, J.P., Cotter, P.D., Endo, A., Han, N.S., Kort, R., Liu, S.Q., Mayo, B., Westerik, N., Hutkins, R., 2020. Fermented foods in a global age: East meets West. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 19, 184–217. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12520>
- Tamang, J.P., Kailasapathy, K., 2010. *Fermented Foods and Beverages of the World*. CRC Press.
- Tang, X., Wu, Q., Le, G., Shi, Y., 2012. Effects of heat treatment on structural modification and in vivo antioxidant capacity of soy protein. *Nutrition* 28, 1180–1185.
- Tangyu, M., Muller, J., Bolten, C.J., Wittmann, C., 2019. Fermentation of plant-based milk alternatives for improved flavour and nutritional value. *Appl Microbiol Biotechnol* 103, 9263–9275. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10175-9>
- Tannenbaum, M., Kornfeld, J.M., 1975. Multiple diffusion chamber. Google Patents.
- Tannock, G.W., 2004. A Special Fondness for Lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3189–3194. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3189-3194.2004>
- Teixeira, J.S., Abdi, R., Su, M.S.-W., Schwab, C., Gänzle, M.G., 2013. Functional characterization of sucrose phosphorylase and scrR, a regulator of sucrose metabolism in *Lactobacillus reuteri*. *Food Microbiology* 36, 432–439. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.07.011>
- Terres Univia, 2016. Statistiques des oléagineux et plantes riches en protéines 2015-2016 44.
- Thiele, C., Gänzle, M.G., Vogel, R.F., 2002. Contribution of Sourdough Lactobacilli, Yeast, and Cereal Enzymes to the Generation of Amino Acids in Dough Relevant for Bread Flavor. *Cereal Chemistry* 79, 45–51. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.2002.79.1.45>
- Thierry, A., Pogacic, T., Weber, M., Lortal, S., 2015. Production of flavor compounds by lactic acid bacteria in fermented foods. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*; Mozzi, F., Raya, RR, Vignolo, GM, Eds 314–340.
- Timmerman, H.M., Koning, C.J.M., Mulder, L., Rombouts, F.M., Beynen, A.C., 2004. Monostrain, multistrain and multispecies probiotics—A comparison of functionality and efficacy. *International Journal of Food Microbiology* 96, 219–233. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.012>
- Tsau, J.-L., Guffanti, A.A., Montville, T.J., 1992. Conversion of Pyruvate to Acetoin Helps To Maintain pH Homeostasis in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 891–894.
- Tsuji, A., Okada, S., Hols, P., Satoh, E., 2013. Metabolic engineering of *Lactobacillus plantarum* for succinic acid production through activation of the reductive branch of the tricarboxylic acid cycle. *Enzyme and Microbial Technology* 53, 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.04.008>
- Ultee, E., Ramijan, K., Dame, R.T., Briegel, A., Claessen, D., 2019. Stress-induced adaptive morphogenesis in bacteria, in: *Advances in Microbial Physiology*. Elsevier, pp. 97–141. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2019.02.001>
- Uden, G., Eirich, T., Richter, H., 2017. Metabolism and Transport of Sugars and Organic Acids by Lactic Acid Bacteria from Wine and Must, in: König, H., Uden, G., Fröhlich, J. (Eds.), *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer International Publishing, Cham, pp. 215–229. https://doi.org/10.1007/978-3-319-60021-5_9
- USDA, 2019. FoodData Central [WWW Document]. URL <https://fdc.nal.usda.gov/> (accessed 7.21.20).

- Vallenet, D., Calteau, A., Dubois, M., Amours, P., Bazin, A., Beuvin, M., Burlot, L., Bussell, X., Fouteau, S., Gautreau, G., Lajus, A., Langlois, J., Planel, R., Roche, D., Rollin, J., Rouy, Z., Sabatet, V., Médigue, C., 2020. MicroScope: an integrated platform for the annotation and exploration of microbial gene functions through genomic, pangenomic and metabolic comparative analysis. *Nucleic Acids Res* 48, D579–D589. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz926>
- Varet, H., Brillet-Guéguen, L., Coppée, J.-Y., Dillies, M.-A., 2016. SARTools: A DESeq2- and EdgeR-Based R Pipeline for Comprehensive Differential Analysis of RNA-Seq Data. *PLoS One* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157022>
- Vermeulen, N., Gánzle, M.G., Vogel, R.F., 2006. Influence of Peptide Supply and Cosubstrates on Phenylalanine Metabolism of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM20451^T and *Lactobacillus plantarum* TMW1.468. *J. Agric. Food Chem.* 54, 3832–3839. <https://doi.org/10.1021/jf052733e>
- Vinusha, K.S., Deepika, K., Johnson, T.S., Agrawal, G.K., Rakwal, R., 2018. Proteomic studies on lactic acid bacteria: A review. *Biochem Biophys Rep* 14, 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2018.04.009>
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H., Whitman, W. (Eds.), 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*, 2nd ed, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer-Verlag, New York.
- Wang, H.K., Ng, Y.K., Koh, E., Yao, L., Chien, A.S., Lin, H.X., Lee, Y.K., 2015. RNA-Seq reveals transcriptomic interactions of *Bacillus subtilis* natto and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in whole soybean solid-state co-fermentation. *Food Microbiol.* 51, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.04.012>
- Wang, H.L., Kraidej, L., Hesseltine, C.W., 1974. LACTIC ACID FERMENTATION OF SOYBEAN MILK. *Journal of Milk and Food Technology* 37, 71–73. <https://doi.org/10.4315/0022-2747-37.2.71>
- Wang, J., Wu, R., Zhang, W., Sun, Z., Zhao, W., Zhang, H., 2013. Proteomic comparison of the probiotic bacterium *Lactobacillus casei* Zhang cultivated in milk and soy milk. *Journal of Dairy Science* 96, 5603–5624. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6927>
- Wang, J.-C., Zhang, W.-Y., Zhong, Z., Wei, A.-B., Bao, Q.-H., Zhang, Y., Sun, T.-S., Postnikoff, A., Meng, H., Zhang, H.-P., 2012. Transcriptome analysis of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang during fermentation in soymilk. *J Ind Microbiol Biotechnol* 39, 191–206. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1015-7>
- Wang, T., Lu, W., Lu, S., Kong, J., 2015. Protective role of glutathione against oxidative stress in *Streptococcus thermophilus*. *International Dairy Journal* 45, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.01.015>
- Wang, T., Xu, Z., Lu, S., Xin, M., Kong, J., 2016. Effects of glutathione on acid stress resistance and symbiosis between *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *International Dairy Journal* 61, 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.03.012>
- Wang, Yang, Wu, Y., Wang, Yuanyuan, Xu, H., Mei, X., Yu, D., Wang, Yibing, Li, W., 2017. Antioxidant Properties of Probiotic Bacteria. *Nutrients* 9, 521. <https://doi.org/10.3390/nu9050521>
- Wang, Y.-C., Yu, R.-C., Chou, C.-C., 2006. Antioxidative activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology* 23, 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.01.020>
- Wang, Y.C., Yu, R.C., Yang, H.Y., Chou, C.C., 2003. Sugar and acid contents in soymilk fermented with lactic acid bacteria alone or simultaneously with bifidobacteria. *Food Microbiol.* 20, 333–338. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(02\)00125-9](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(02)00125-9)
- Wari, E., Zhu, W., 2016. A survey on metaheuristics for optimization in food manufacturing industry. *Applied Soft Computing* 46, 328–343. <https://doi.org/10.1016/j.asoc.2016.04.034>
- WHO, Joint Expert Consultation on Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition, United Nations University (Eds.), 2007. *Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation*; [Geneva, 9 - 16 April 2002], WHO technical report series. Presented at the Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation on Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition, WHO, Geneva.
- Wick, R.R., Judd, L.M., Gorrie, C.L., Holt, K.E., 2017. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLOS Computational Biology* 13, e1005595. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>
- World Health Organization, U.N., 2007. *Protein and amino acid requirements in human nutrition*. World Health Organization.
- Wu, Q.Q., You, H.J., Ahn, H.J., Kwon, B., Ji, G.E., 2012. Changes in growth and survival of *Bifidobacterium* by coculture with *Propionibacterium* in soy milk, cow's milk, and modified MRS medium. *International Journal of Food Microbiology* 157, 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.013>

- Wüthrich, D., Wenzel, C., Bavan, T., Bruggmann, R., Berthoud, H., Irmeler, S., 2018. Transcriptional Regulation of Cysteine and Methionine Metabolism in *Lactobacillus paracasei* FAM18149. *Front Microbiol* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01261>
- Xu, J.-Z., Yang, H.-K., Zhang, W.-G., 2018. NADPH metabolism: a survey of its theoretical characteristics and manipulation strategies in amino acid biosynthesis. *Critical Reviews in Biotechnology* 38, 1061–1076. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1437387>
- Yang, M., Kwak, J.S., Jang, S., Jia, Y., Park, I., 2013. Fermentation Characteristics of Soybean Yogurt by Mixed Culture of *Bacillus* sp. and Lactic Acid Bacteria. *The Korean Journal of Food And Nutrition* 26, 273–279. <https://doi.org/10.9799/ksfan.2013.26.2.273>
- Yang, X., Teng, K., Su, R., Li, L., Zhang, T., Fan, K., Zhang, J., Zhong, J., 2019. AcrR and Rex Control Mannitol and Sorbitol Utilization through Their Cross-Regulation of Aldehyde-Alcohol Dehydrogenase (AdhE) in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 85. <https://doi.org/10.1128/AEM.02035-18>
- Yang, X.-S., 2010. *Engineering optimization: an introduction with metaheuristic applications*. John Wiley & Sons.
- Yoon, M., Hwang, H., 2008. Reduction of soybean oligosaccharides and properties of α -d-galactosidase from *Lactobacillus curvatus* R08 and *Leuconostoc mesenteroides* JK55. *Food Microbiology* 25, 815–823. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.04.008>
- Yukalo, V., Krupa, O., 2017. Proteolytic systems of lactic acid microorganisms.
- Yvon, M., 2006. Key enzymes for flavour formation by lactic acid bacteria. *Australian journal of dairy technology* 61, 88.
- Zaheer, K., Humayoun Akhtar, M., 2017. An updated review of dietary isoflavones: Nutrition, processing, bioavailability and impacts on human health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 57, 1280–1293. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.989958>
- Zannini, E., Waters, D.M., Coffey, A., Arendt, E.K., 2016. Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100, 1121–1135. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7172-2>
- Zarour, K., Llamas, M.G., Prieto, A., Rúa-Madiedo, P., Dueñas, M.T., de Palencia, P.F., Aznar, R., Kihal, M., López, P., 2017. Rheology and bioactivity of high molecular weight dextrans synthesised by lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers* 174, 646–657. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.06.113>
- Zhai, Z., Yang, Y., Wang, H., Wang, G., Ren, F., Li, Z., Hao, Y., 2020. Global transcriptomic analysis of *Lactobacillus plantarum* CAUH2 in response to hydrogen peroxide stress. *Food Microbiology* 87, 103389. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103389>
- Zhang, C., Brandt, M.J., Schwab, C., Gänzle, M.G., 2010. Propionic acid production by cofermentation of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus diolivorans* in sourdough. *Food microbiology* 27, 390–395.
- Zhang, G., Liu, L., Li, C., 2020. Effects of *ccpA* gene deficiency in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* under aerobic conditions as assessed by proteomic analysis. *Microbial Cell Factories* 19, 9. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-1278-7>
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C.M.A.P., Harris, H.M.B., Mattarelli, P., O'Toole, P.W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G.E., Gänzle, M.G., Lebeer, S., 2020. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70, 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>
- Zhou, Y., Cui, Y., Qu, X., 2019. Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: Structure, bioactivity and associations: A review. *Carbohydrate Polymers* 207, 317–332. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.093>
- Zhu, X., 2020. Vitamin B12 Production during Tofu Fermentation by *Lactobacillus reuteri* and *Propionibacterium freudenreichii*.
- Zhu, Y.-Y., Thakur, K., Feng, J.-Y., Cai, J.-S., Zhang, J.-G., Hu, F., Russo, P., Spano, G., Wei, Z.-J., 2020. Riboflavin-overproducing lactobacilli for the enrichment of fermented soymilk: insights into improved nutritional and functional attributes. *Appl Microbiol Biotechnol* 104, 5759–5772. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10649-1>
- Zomorodi, A.R., Segrè, D., 2016. Synthetic Ecology of Microbes: Mathematical Models and Applications. *Journal of Molecular Biology, Engineering Tools and Prospects in Synthetic Biology* 428, 837–861. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.10.019>

Zúñiga, M., Yebra, M.J., Monedero, V., 2021. Complex Oligosaccharide Utilization Pathways in *Lactobacillus*. *Current Issues in Molecular Biology* 49–80.
<https://doi.org/10.21775/cimb.040.049>

Valorisation de la thèse

I. Publication acceptée dans une revue internationale à comité de lecture

Harlé, Olivier, Falentin, H., Niay, J., Valence, F., Courselaud, C., Chuat, V., Maillard, M.-B., Guédon, É., Deutsch, S.-M., Thierry, A., 2020. Diversity of the metabolic profiles of a broad range of lactic acid bacteria in soy juice fermentation. Food Microbiology 103410. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103410>

II. Publications à soumettre dans des revues internationales

Harlé Olivier, Stéphanie-Marie Deutsch, Jérôme Niay, Florence Valence, Sandrine Parayre, Aurélie Nicolas, Marie-Bernadette Maillard, Gwenaele Henry, Anne Thierry, Éric Guédon, Hélène Falentin*. Molecular bases of *Lactobacillus delbrueckii* and *Lactiplantibacillus plantarum* cooperation, an effective duo to improve soy juice fermentation.

Harlé Olivier, Stéphanie-Marie Deutsch, Jérôme Niay, Florence Valence, Sandrine Parayre, Aurélie Nicolas, Julie Aubert, Marie-Bernadette Maillard, Gwenaele Henry, Anne Thierry, Éric Guédon, Hélène Falentin*. Metabolic complementarities of *Lactiplantibacillus plantarum* CIRM-BIA777 and *Lactobacillus delbrueckii* CIRM-BIA865 help to predict interactions in soy juice fermentation.

III. Communications orales

Harlé, Olivier, Falentin, H., Niay, J., Valence, F., Courselaud, C., Chuat, V., Maillard, M.-B., Guédon, É., Deutsch, S.-M., Thierry, A., 22e Colloque du Club des Bactéries Lactiques, Caen, 2019. Comparative study of lactic acid bacteria in soy juice fermentation

Harlé Olivier, Stéphanie-Marie Deutsch, Jérôme Niay, Florence Valence, Sandrine Parayre, Aurélie Nicolas, Julie Aubert, Marie-Bernadette Maillard, Gwenaele Henry, Anne Thierry, Éric Guédon, Hélène Falentin*. NIZO Plant Protein Functionality Conference, Web, 2020. How LAB can cooperate to improve soy juice fermentation?

IV. Communication affichée

Harlé Olivier, STLOpen Days, Rennes, 2019. Optimizing lactic fermentation of soy juice.



Olivier HARLE



CIFRE PhD

2017-2020



UMR INRA - Agrocampus Ouest
Science and Technology of
Milk and Eggs

MicroBio Team
Microbiology of
Milk and Egg Sectors

Key words

Lactic acid bacteria
Soy fermentation
Sensorial analyses
Genomics
Metatranscriptomics

Financiers



Collaborators



Bactéries d'intérêt alimentaire



Optimizing lactic fermentation of soy juice

Social and economic situation

- Diet in developed countries is composed of 40 % of $\frac{\text{Plant based proteins}}{\text{Plant + Animal based proteins}}$
- WHO advises to shift this ratio to 50 %
 - ① for nutritional aspect
 - ② to lower environmental impact
- Soybean contains 40 % of protein in dry matter
- The market of fermented soy products is in expansion in France
 - + 19 % of turnover in 2016
 - + 18 % of total sales volumes in 2016
- Only 25 % of consumers do like soy flavors

Scientific context

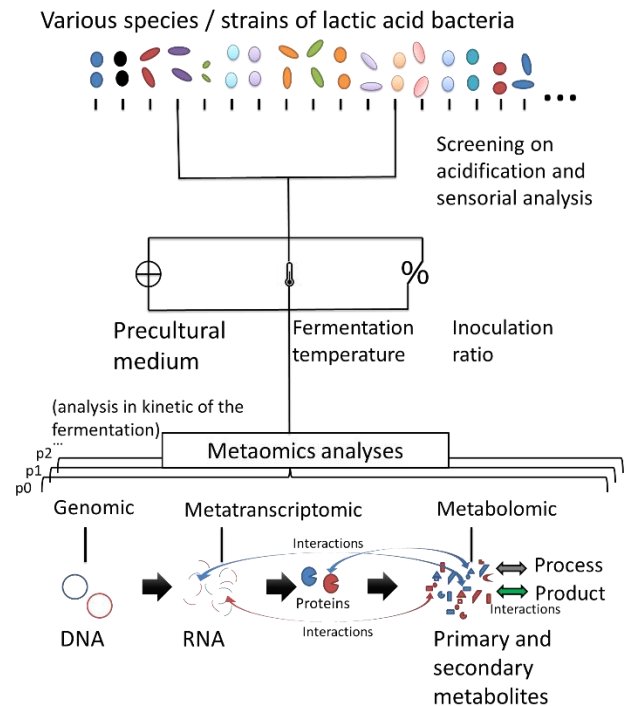
- Soy products present off-flavors (green, earthy, musty, cereal and hay flavors)
- Strains of lactic acid bacteria are diverse and do have diverse phenotypes
 - Associations of food grade bacteria have great potential to:
 - ① Improve the rate of lactic fermentation of soy juice
 - ② Improve the organoleptic properties of fermented soy juice
- There is little knowledge over soy juice fermentation with consortia of lactic acid bacteria

Research question

- How to optimize the lactic fermentation of soy juice and the organoleptic properties of the fermented soy juice?

Expected results

- Understand the impact of technological parameters on the fermentation of soy juice by a consortium of lactic acid bacteria
- Understand the interactions between lactic acid bacteria, their impact on fermentation rate and on product composition
- Develop consortia of bacteria to improve the organoleptic properties of fermented soy juice



Perspective

- Develop models of association and interactions of lactic acid bacteria for soy juice fermentation
- Study and develop nutritional aspect of fermented soy juice

Titre : Identification des interactions positives entre bactéries lactiques en fermentation de jus de soja

Mots clés : soja, fermentation lactique, complémentarité métabolique, transcriptomique, coopération

Résumé : Le jus de soja lactofermenté représente une alternative intéressante au yaourt laitier pour augmenter la part de protéines végétales dans l'alimentation. Le choix des bactéries lactiques (LAB) utilisées pour la fermentation du jus de soja est crucial car il détermine les qualités organoleptiques et nutritionnelles des produits. Les métabolismes des LAB sont cependant mal connus en jus de soja. Dans cette thèse 276 souches de 25 espèces de LAB ont été évaluées sur leur aptitude à fermenter du jus de soja ou des milieux de culture contenant du stachyose, du raffinose ou du saccharose comme unique source de carbone. Nous avons montré que i) la capacité à cataboliser le saccharose est un critère déterminant pour identifier des souches capables de fermenter le jus de soja, ii) les souches de *S. thermophilus* sont les plus efficaces pour fermenter le jus de soja, iii) les *Lactobacillus* apportent des notes aromatiques variées selon l'espèce et la souche. L'association de LAB pour améliorer les qualités

fermentaires, organoleptiques et nutritionnelles a été évaluée. Nous avons associé des LAB en duos selon leurs complémentarités métaboliques. Une coculture sur 32 a permis d'améliorer les qualités organoleptiques du produit par rapport aux monocultures. Une coculture sur 12 a permis de réduire de 30% le temps de fermentation du jus de soja par rapport aux monocultures (*L. plantarum* CIRM-BIA777 (*Lp777*) et *L. delbrueckii* CIRM-BIA865 (*Ld865*)).

Des approches génomiques, métabolomiques et transcriptomiques ont alors été mises en œuvre pour identifier les bases moléculaires de la coopération entre ces deux souches. Cela a permis de mettre en évidence trois facteurs de stress des LAB en fermentation du jus de soja : la limitation en saccharose, la limitation en acides aminés libres et le stress oxydant. Ces trois stress sont diminués dans la coculture de *Lp777* et de *Ld865* en jus de soja. Limiter ces stress est donc d'intérêt afin d'améliorer la fermentation de jus de soja.

Title : Identification of positive interactions between LAB in soy juice fermentation

Keywords : soy, lactic fermentation, metabolic complementarity, dual transcriptomic, cooperation

Abstract : Lactofermented soy juices represent an interesting alternative to milk yogurt to increase the part of plant-based proteins in our diet. The choice of lactic acid bacteria (LAB) used for soy juice fermentation is crucial as it determines the organoleptic and nutritional properties of the product. LAB metabolisms are however not well known in soy juice fermentation. In this thesis, 276 strains of 25 species were screened in synthetic media on their ability to ferment stachyose, raffinose and sucrose as unique source of carbon and soy juice. We showed that i) LAB capacity to catabolize sucrose is important to ferment soy juice ii) *S. thermophilus* strains are the most efficient to ferment soy juice iii) *Lactobacillus* LAB produce diverse aromatic notes according to the specie and the strain. LAB association can help to improve fermentation, the organoleptic and the nutritional properties.

We associated then LAB in duo according to their metabolic complementarities. One coculture out of 32 improved the organoleptic properties of fermented soy juices compared to the monocultures. One coculture out of 12 reduced of 30% the SJ fermentation time (*L. plantarum* CIRM-BIA777 (*Lp777*) and *L. delbrueckii* CIRM-BIA865 (*Ld865*)).

Genomic, metabolomics and transcriptomics approaches were set up to identify the molecular bases of these two LAB cooperation. These approaches revealed three factors of stress of LAB in soy juice fermentation: the limitation of sucrose, the limitation of free amino acids and the oxidative stress. The level of these three stresses were lowered with *Lp777* and *Ld865* coculture in soy juice. Limiting these stresses is then of interest in order to improve soy juice fermentations.